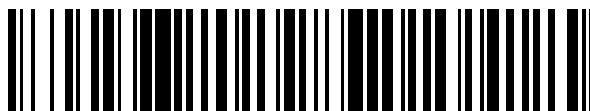


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 099**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2007 E 07762730 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 1981902**

54 Título: **Antagonistas del receptor Nogo**

30 Prioridad:

27.01.2006 US 762487 P

19.07.2006 US 831659 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.11.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LEE, DANIEL H.S.;
WEN, DINGYI;
PEPINSKY, R. BLAKE;
RELTON, JANE K.;
WANG, XINZHONG;
LUGOVSKOY, ALEXEY;
MEIER, WERNER;
GARBER, ELLEN A.;
SILVIAN, LAURA y
WEINREB, PAUL H.**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 550 099 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

Antagonistas del receptor Nogo

- 5 **[0001]** Esta invención se refiere a neurobiología y a biología molecular. Más particularmente, esta invención se refiere a receptores Nogo solubles y, en particular, a proteínas de fusión de los mismos.

- [0002]** Esta divulgación se refiere adicionalmente a polinucleótidos antagonistas del receptor Nogo-1. Esta divulgación se refiere adicionalmente a composiciones que comprenden, y a los métodos para la elaboración y el
10 uso de, dichos anticuerpos del receptor Nogo, fragmentos de unión al antígeno de los mismos, polipéptidos inmunógenos del receptor Nogo-1, receptores solubles Nogo y proteínas de fusión de los mismos, ácidos nucleicos que codifican para los mismos y polinucleótidos antagonistas.

Antecedentes de la invención

- 15 **[0003]** Los axones y las dendritas de las neuronas son largas prolongaciones celulares desde las neuronas. La punta distal de un axón o de una neurita en extensión comprende una región especializada conocida como cono de crecimiento. Los conos de crecimiento detectan el entorno local y guían el crecimiento del axón hacia la célula objetivo de la neurona. Los conos de crecimiento responden a diversas señales del entorno, por ejemplo, la
20 adhesividad superficial, los factores de crecimiento, los neurotransmisores y los campos eléctricos. El guiado del crecimiento del cono implica diversas clases de moléculas de adhesión, señales intercelulares, así como factores que estimulan e inhiben los conos de crecimiento. El cono de crecimiento de una neurita avanza a distintas velocidades, pero normalmente a una velocidad de uno o dos milímetros por día.

- 25 **[0004]** Los conos de crecimiento tienen forma de mano, con una amplia expansión plana (micropúas o filopodios) que se adhiere de forma diferencial a las superficies del embrión. Los filopodios están activos de forma continua, algunos filopodios se retrorretiraen hacia el cono de crecimiento, mientras que otros continúan alargándose a través del sustrato. Las prolongaciones entre los diferentes filopodios forman los lamelipodios.

- 30 **[0005]** El cono de crecimiento explora el área que está por delante de él a cualquier lado con sus lamelipodios y sus filopodios. Cuando una prolongación entra en contacto con una superficie que no es favorable para el crecimiento, la abandona. Cuando una prolongación entra en contacto con una superficie de crecimiento favorable, continúa prolongándose y guiando al cono de crecimiento en esa dirección. El cono de crecimiento puede ser guiado por pequeñas variaciones en las propiedades superficiales de los sustratos. Cuando el cono de crecimiento alcanza
35 una célula objetivo apropiada se crea una conexión sináptica.

- [0006]** La función de la célula nerviosa está muy influenciada por el contacto entre la neurona y otras células de su entorno inmediato (U. Rutishauser, T. M. Jessell, *Physiol. Rev.* 68: 819 (1988)). Estas células incluyen células gliales especializadas, oligodendrocitos del sistema nervioso central (CNS) y células de Schwann del sistema
40 nervioso periférico (PNS), que envuelven el axón neuronal con mielina (una estructura aislante de membranas multilaminares) (G. Lemke, en *An introduction to Molecular Neurobiology*, Z. Hall, Ed. (Sinauer, Sunderland, Mass.), pág. 281 (1992)).

- [0007]** Mientras que las neuronas del CNS tienen la capacidad de regenerarse después de una lesión, son
45 inhibidas de hacerlo debido a la presencia de proteínas inhibitoras presentes en la mielina, o simplemente también por otros tipos de moléculas que se encuentran en su entorno local (Brittis y Flanagan, *Neuron* 30: 11 - 14 (2001); Jones y col., *J. Neurosci.* 22: 2792 - 2803 (2002); Grimpe y col., *J. Neurosci.* 22: 3144 - 3160 (2002)).

- [0008]** Se han caracterizado numerosas proteínas inhibitoras de la mielina que se encuentran en los
50 oligodendrocitos, por ejemplo, la NogoA (Chen y col., *Nature* 403: 434 - 439 (2000); Grandpre y col., *Nature* 403: 439 - 444 (2000)), la glucoproteína asociada a la mielina (MAG, McKerracher y col., *Neuron* 13: 805 - 811 (1994); Mukhopadhyay y col., *Neuron* 13: 757 - 767 (1994)) y la glucoproteína de oligodendrocito (OM-gp, Mikol y Stefansson, *J. Cell. Biol.* 106: 1273 - 1279 (1988)). Se ha demostrado que cada una de estas proteínas es por separado un ligando del receptor neuronal Nogo-1 (Wang y col., *Nature* 417: 941 - 944 (2002); Liu y col., *Science*
55 297: 1190 - 93 (2002); Grandpre y col., *Nature* 403: 439 - 444 (2000); Chen y col., *Nature* 403: 434 - 439 (2000); Domeniconi y col., *Neurons* 35: 283 - 90 (2002)).

- [0009]** El receptor Nogo es una proteína de membrana anclada a GPI que contiene 8 repeticiones ricas en leucina (Fournier y col., *Nature* 409: 341 - 346 (2001)). Después de la interacción con una proteína inhibidora (por
60 ejemplo, NogoA, MAG y OM-gp), el complejo del receptor Nogo-1 transduce las señales que dan lugar al colapso del

cono de crecimiento y a la inhibición del crecimiento de la neurita.

[0010] Existe una necesidad urgente de moléculas que inhiban la unión del receptor Nogo-1 a sus ligandos y atenúen el colapso del cono de crecimiento y la inhibición del crecimiento de la neurita mediados por la mielina.

5

Resumen de la Invención

[0011] La presente invención se refiere a antagonistas del receptor Nogo-1 para estimular el crecimiento de la neurita, la supervivencia de las neuronas y la regeneración de los axones en las neuronas del CNS. La invención
10 presenta moléculas útiles para la inhibición de la inhibición del crecimiento de la neurita, para la estimulación de la supervivencia de las neuronas y/o para la estimulación de la regeneración de los axones en las neuronas del CNS.

[0012] Más particularmente, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende:

15 (a) una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de referencia excepto porque al menos un residuo de cisteína de dicha secuencia de aminoácidos de referencia está sustituido por un aminoácido diferente, en el que dicha secuencia de aminoácidos de referencia se elige de entre el grupo que consiste en:

(i) los aminoácidos a hasta 445 del ID. SEC. Nº: 49,

20

(ii) los aminoácidos 27 hasta b del ID. SEC. Nº: 49 y

(iii) los aminoácidos a hasta b del ID. SEC. Nº: 49,

25 b) un polipéptido heterólogo;

en el que dicho polipéptido inhibe la inhibición del crecimiento de la neurita mediada por el receptor nogo

en el que el uno o más residuos de cisteína que se van a sustituir se eligen de entre: el residuo de cisteína
30 correspondiente al residuo de cisteína que se encuentra en el aminoácido 266 del ID. SEC. Nº: 49 (C266); el residuo de cisteína correspondiente al residuo de cisteína que se encuentra en el aminoácido 309 del ID. SEC. Nº: 49 (C309); el residuo de cisteína correspondiente al residuo de cisteína que se encuentra en el aminoácido 335 del ID. SEC. Nº: 49 (C335); o combinaciones de los mismos.

35 **[0013]** En algunas formas de realización, la C266 y la C309 de dicha secuencia de aminoácidos de referencia se han sustituido por aminoácidos diferentes. En algunas formas de realización, la C309 y la C335 de dicha secuencia de aminoácidos de referencia se han sustituido por aminoácidos diferentes. En algunas formas de realización, dicho aminoácido diferente es alanina.

40 **[0014]** En algunas formas de realización la invención también proporciona que el polipéptido heterólogo que se elige de entre el grupo que consiste en: (a) albúmina sérica, (b) una región Fc, (c) un péptido de señalización, (d) una etiqueta polipeptídica y (e) una combinación de dos o más de dichos polipéptidos heterólogos. En algunas formas de realización, la invención también prevé que la región Fc se elige de entre el grupo que consiste en: una región Fc de la IgA; una región Fc de la IgD; una región Fc de la IgG, una región Fc de la IgE; y una región Fc de la
45 IgM. En una forma de realización, la región Fc es una región Fc de la IgG. En algunas formas de realización, la invención también proporciona que la etiqueta polipeptídica se elige de entre el grupo que consiste en: una etiqueta de FLAG; una etiqueta de Strep; una etiqueta de poli-histidina; una etiqueta de VSV-G; una etiqueta de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe; y una etiqueta de c-Myc.

50 **[0015]** En algunas formas de realización, la invención proporciona un polipéptido de la invención unido a una o más fracciones de polialquilenglicol. En algunas formas de realización, la invención también proporciona que la una o más fracciones de polialquilenglicol es una fracción de polietilenglicol (PEG). En algunas formas de realización, la invención también proporciona un polipéptido de la invención unido a entre 1 y 5 fracciones de PEG.

55 **[0016]** La presente invención y las formas de realización de la misma se establecen en las reivindicaciones anexas.

Breve descripción de los dibujos

60 **[0017]**

La Figura 1 es una representación esquemática de la estructura del receptor Nogo-1. El sNogoR310 humano contiene los residuos 26 - 310 del ID. SEC. N°: 7 y el sNogoR344 contiene los residuos 26 - 344 del ID. SEC. N°: 6. El sNogoR310 de rata contiene los residuos 27 - 310 del ID. SEC. N°: 9 y el sNogoR344 contiene los residuos 27 - 344 del ID. SEC. N°: 8.

La Figura 2 representa una gráfica de la antigenicidad para la proteína del receptor Nogo-1 mediante el uso del programa informático Vector Nti™. La P-617 de rata es el ID. SEC. N°: 10 y la P-618 de rata es el ID. SEC. N°: 11. La P-617 humana es el ID. SEC. N°: 47 y la P-618 humana es el ID. SEC. N°: 48.

La Figura 3A es una gráfica que representa la actividad de unión del anticuerpo anti-receptor Nogo-1, el 7E11. La gráfica presenta el efecto de la concentración del 7E11 sobre la unión del Nogo66 al receptor Nogo-1. La Figura 3B representa la actividad de unión de un anticuerpo anti-receptor Nogo-1, el 1H2. La gráfica presenta el efecto de la concentración de 1H2 sobre la unión del Nogo66 al sNogoR344-Fc (también denominado en el presente documento Fc-sNogoR344 o Ig-sNogoR344). El Fc-MAG no compete con el Nogo66 por la unión al sNogoR344-Fc.

La Figura 4 representa los resultados de un ELISA para los anticuerpos anti-Nogo-R-1 1H2, 3G5 y 2F7. Se determinó el efecto de los anticuerpos sobre la DO₄₅₀ en presencia de antígenos inmovilizados. Los antígenos inmovilizados eran sNogoR310-Fcm (también denominado en el presente documento Fc-sNogoR310 o Ig-NogoR310), sNogoR344-Fc, p-617, p-618, p-4, p-5 y ovalbúmina y BSA.

La Figura 5 es una gráfica que representa los efectos del anticuerpo monoclonal, el 7E11, sobre el crecimiento de los DRG de la neurita de rata en presencia de cantidades variables de mielina.

La Figura 6A es una gráfica que representa el efecto de la unión de sNogoR310 a ¹²⁵I-Nogo66 y a ¹²⁵I-Nogo40 en presencia de los siguientes competidores: Nogo66, Nogo40 y el anticuerpo monoclonal anti-receptor Nogo-1 sobrenadante. La Figura 6B representa la actividad de ¹²⁵I-Nogo66 hacia sNogoR310.

La Figura 7 es una gráfica que representa el efecto de sNogoR310-Fc sobre la unión de ¹²⁵I-Nogo40 a sNogoR310.

La Figura 8 es una gráfica que representa la actividad de unión de sNogoR310-Fc a ¹²⁵I-Nogo40.

La Figura 9A es una gráfica de el efecto de sNogoR310 sobre el crecimiento de la neurita / célula en presencia o en ausencia de mielina. La Figura 9B es una gráfica del efecto de la unión de sNogoR310 sobre el crecimiento de la neurita en presencia o en ausencia de mielina.

La Figura 10A es una gráfica que representa el efecto de sNogoR310-Fc sobre el crecimiento de los DRG de la neurita de la P4 de rata Nogo40 en presencia de unas cantidades crecientes de mielina. La Figura 10B representa el número de neuritas / célula después del tratamiento con PBS, con PBS + sNogoR310-Fc, con 20 ng de mielina y con mielina + sNogoR310-Fc.

La Figura 11 es una gráfica que representa el efecto del anticuerpo monoclonal 5B10 sobre el crecimiento de los DRG de la neurita / célula en presencia de unas cantidades crecientes de mielina.

La Figura 12 es una gráfica que representa el efecto de sNogoR310-Fc sobre la puntuación de BBB hasta 30 días después de la inducción de una lesión en un modelo de sección transversal de médula espinal de rata.

Las Figuras 13A y 13B indican la puntuación locomotora BBB en función del tiempo después de una hemisección dorsal en ratones naturales o transgénicos de la Línea 08 o de la Línea 01. La Figura 13C representa gráficamente el ángulo máximo tolerado de plano inclinado en función del tiempo después de una lesión en ratones naturales y transgénicos. La Figura 13D muestra los errores en las extremidades posteriores durante el ascenso en una rejilla inclinada en función del tiempo después de la lesión. En todas las gráficas se indican las medias ± e.e.m. de 7 - 9 ratones en cada grupo. Los valores del grupo transgénico son estadísticamente diferentes a los de los ratones naturales (asteriscos dobles, P < 0,01; prueba de la t de Student).

La Figura 14A muestra la puntuación locomotora BBB en función del tiempo después de una hemisección dorsal en animales tratados con vehículo o con sNogoR310-Fc. La Figura 14B muestra los errores en las extremidades posteriores durante el paseo por una rejilla en función del tiempo después de la lesión. La Figura 14C muestra el análisis de las huellas de las patas, que revela un acortamiento de la zancada y un ensanchamiento de la zancada en los ratones de control con respecto a las ratas no lesionadas o lesionadas + sNogoR310-Fc. En todas las gráficas

se indican las medias $\pm$ e.e.m. de 7 - 9 ratas en cada grupo. Los valores del grupo con sNogoR310-Fc son estadísticamente diferentes a los del control (Figuras 14A - B). Los valores del control son estadísticamente diferentes a los de las ratas sin lesión de la médula espinal o con lesión de la médula espinal + sNogoR310-Fc de la Figura 14C (asterisco, $p < 0,05$; asteriscos dobles, $p < 0,01$; prueba de la t de Student).

5

La Figura 15 muestra un modelo de la unión del anticuerpo anti-rNgR1, el 1D9, al fragmento soluble del NgR1 de rata (srNgR310).

La Figura 16A muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc del receptor Nogo humano. El codón de inicio y el de detención están subrayados. Las regiones seleccionadas del ARNi objetivo están en cursiva. Los objetivos ARNi-1 y ARNi-3 del gen del NgR humano, específicamente el ARNi-2, fueron diseñados para dirigirse a los genes objetivo NgR humano, de ratón y de rata. La Figura 16B muestra las secuencias de nucleótidos de los oligonucleótidos del ADN usados para la construcción del ARNi del NgR en el vector de expresión pU6.

La Figura 17 representa los resultados del ensayo de transfección transitoria del ARNi inactivado en células L de ratón.

La Figura 18 muestra la transfección del vector de expresión del NgR humano en células SKN y 293.

La Figura 19 representa el ensayo de transfección transitoria del ARNi inactivado en células SKN humanas.

La Figura 20 muestra una representación esquemática de un vector lentivírico de ARNi. El casete de expresión del ARNi puede ser insertado en el sitio PacI o en el sitio EcoRI. LTR, repetición terminal larga; RRE-Rev, elementos de respuesta; tracto de poli-purina cPPT-central; actina beta de pollo CBA; elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota WPRE; SIN LTR de inactivación LTR-seld.

La Figura 21 muestra un análisis de inmunotransferencia western mediante el uso del anticuerpo 7E11 para demostrar la inactivación del NgR1 en células Neuro-screen clonadas.

La Figura 22 muestra un resumen de la expresión del NgR en células Neuro-screen clonadas transducidas con células LV (clon nº 3G9, 1E5 1E9 1E10), con el ARNi del LV-NgR o sin tratar. Los resultados de las señales del NgR y del GAPDH de la inmunotransferencia western se cuantificaron mediante un barrido por densitometría.

La Figura 23 muestra cuatro clones celulares NeuroScreen que se establecieron con diferentes niveles de inactivación del NgR. La expresión del NgR se muestra como un porcentaje de la del NgR: proporción de señales de GAPDH en células NeuroScreen sin tratar.

Las Figuras 24A - B muestran el efecto del ectodominio del NgR1 de rata (27 - 310) condensado con una IgG de rata [NgR(310)ecto-Fc] y metilprednisolona (MP) sobre la inhibición inducida por mielina del crecimiento de la neurita en los ganglios de las raíces dorsales (DRG) de pollo *in vitro*. (A) Las neuronas de los DRG embrionarios de pollo disociadas el día 13 se colocaron en placas con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o con mielina (400 ng/pocillo) en presencia de NgR(310)ecto-Fc o de MP. (B) Cuantificación del crecimiento de la neurita por célula (η -3) expresada como un porcentaje del EEM del control de PBS (η -3). Barra de escala, 200 μ m. $P < 0,05$ en comparación con el control de PBS.

45

Las Figuras 25A - E muestran el efecto del ectodominio del NgR1 de rata (27 - 310) condensado con una IgG de rata [NgR(310)ecto-Fc] y metilprednisolona (MP) sobre la recuperación funcional después de una lesión en la médula espinal (SCI). (A) La puntuación BBB se registró semanalmente durante 4 semanas. (B) Puntuación BBB en ratas tratadas con MP 2 días después de la SCI. (C) Puntuaciones BBB normalizadas al día 2 para animales individuales. (D) Frecuencia del paso plantar coherente y coordinación entre las extremidades posteriores y anteriores, que ilustran la proporción de ratas de cada grupo que alcanzaban una puntuación de 14 o más entre 3 y 4 semanas después de la SCI. (E) Longitud media de la zancada en los grupos tratados con NgR(310)ecto-Fc-y MP + NgR(310)ecto-Fc en comparación con los controles.

La Figuras 26A - B muestran el efecto del ectodominio del NgR1 de rata (27 - 310) condensado con una IgG de rata [NgR(310)ecto-Fc] y del tratamiento con metilprednisolona (MP) en el número de axones caudales a la lesión de la médula espinal.

La Figura 27 muestra el efecto del ectodominio del NgR1 de rata (27 - 310) condensado con una IgG de rata [NgR(310)ecto-Fc] y del tratamiento con metilprednisolona (MP) sobre el número de axones marcados con biotina

dextrano amina (BDA) que entran en contacto con las neuronas motoras del asta anterior.

Descripción detallada de la invención

5 Definiciones y técnicas generales

[0018] Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado al comprendido normalmente por el experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, predominará la presente solicitud incluyendo las definiciones.
10 También, salvo que el contexto lo requiera de otro, los términos en singular deben incluir los plurales, y los términos plurales deben incluir los singulares.

[0019] Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o en el ensayo de la presente invención, a continuación se describen los métodos y los
15 materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y de las reivindicaciones.

[0020] A lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones, se entenderá que la palabra
20 "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implican la inclusión de un número entero establecido o de un grupo de números enteros, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

[0021] Con objeto de definir adicionalmente esta invención, se proporcionan los siguientes términos y
25 definiciones en el presente documento.

[0022] Debe apreciarse que el término "un/a" o "uno/a" entidad, se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que "una molécula de inmunoglobulina", representa una o más moléculas de inmunoglobulina. Como tales, los términos "un/a" (o "uno/a"), "uno/a o más" y "al menos uno" pueden usarse de forma intercambiable
30 en el presente documento.

[0023] Según se usa en el presente documento, el término "consistir en", o variaciones tales como "consiste en" o "que consiste en", según se usan a lo largo de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, indican la inclusión de cualquier número entero o grupo de números enteros mencionado, pero que no puede añadirse ningún
35 número entero o grupo de números enteros adicional al método, la estructura o la composición especificados.

[0024] Según se usa en el presente documento, el término "consistir esencialmente en", o variaciones tales como "consiste esencialmente en" o "que consiste esencialmente en", según se usa a lo largo de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, indican la inclusión de cualquier número entero o grupo de números enteros
40 mencionado y la inclusión opcional de cualquier número entero o grupo de números enteros mencionado que no cambie materialmente las propiedades básicas o nuevas del método, la estructura o la composición especificados.

[0025] Según se usa en el presente documento, "anticuerpo" significa una inmunoglobulina intacta, o un fragmento de unión al antígeno de la misma. Los anticuerpos de esta divulgación pueden ser de cualquier isotipo o
45 clase (por ejemplo, M, D, G, E y A) o de cualquier subclase (por ejemplo, G1-4, A1-2) y pueden tener cualquier cadena ligera kappa (κ) o lambda (λ).

[0026] Según se usa en el presente documento, "Fc" significa una porción de una cadena pesada de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios de la región constante de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3.
50 Por ejemplo, una porción de la región constante de la cadena pesada de un anticuerpo que puede obtenerse mediante una digestión con papaína.

[0027] Según se usa en el presente documento, "proteína de fusión Nogo" significa una proteína que comprende una fracción del receptor soluble Nogo-1 condensada con un polipéptido heterólogo.
55

[0028] Según se usa en el presente documento, "anticuerpo humanizado" significa un anticuerpo en el que al menos una porción de las secuencias no humanas son sustituidas por secuencias humanas. Algunos ejemplos de cómo elaborar anticuerpos humanizados pueden encontrarse en las Patentes de EE.UU. N° 6.054.297, 5.886.152 y 5.877.293.
60

[0029] Según se usa en el presente documento, "anticuerpo quimérico" significa un anticuerpo que contiene una o más regiones de un primer anticuerpo y una o más regiones de al menos otro anticuerpo. El primer anticuerpo y los anticuerpos adicionales pueden ser de la misma especie o de especies diferentes.

5 **[0030]** Según se usa en el presente documento cada uno de "receptor Nogo", "NogoR", "NogoR-1", "NgR", "NgR-1", "NgR1" y "NGR1" significan el receptor Nogo-1.

[0031] Según se usa en el presente documento, el término "polipéptido" pretende incluir un "polipéptido" singular así como "polipéptidos" plurales, y se refiere a una molécula formada por monómeros (aminoácidos) unidos
10 linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos y no se refiere a la longitud específica del producto. Por lo tanto, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácido" o cualquier otro término usado con referencia a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, está incluido en la definición de "polipéptido" y el término "polipéptido" puede usarse en lugar de, o de forma intercambiable con, cualquiera de estos
15 términos. El término "polipéptido" también pretende referirse a los productos de las modificaciones posteriores la expresión del polipéptido, incluyendo sin limitación, una glucosilación, una acetilación, una fosforilación, una amidación, una derivatización mediante grupos protectores / bloqueantes conocidos, una escisión proteolítica o una modificación con aminoácidos no naturales. Un polipéptido puede derivar de un agente biológico natural o ser producido mediante tecnología recombinante, pero no es necesariamente traducido desde una secuencia de ácidos
20 nucleicos designada. Puede ser generado de cualquier forma, incluyendo mediante síntesis química.

[0032] Un polipéptido puede tener un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1.000 o más, o 2.000 o más aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no tienen necesariamente dicha estructura.
25 Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se denominan plegados, y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida sino que más bien pueden adoptar un gran número de conformaciones diferentes, se denominan no plegados. Según se usa en el presente documento, el término glucoproteína se refiere a una proteína acoplada a al menos una fracción de carbohidrato que está unida a la proteína a través de una cadena lateral que contiene oxígeno o que contiene nitrógeno de un residuo de un aminoácido, por ejemplo, un
30 residuo de serina o un residuo de asparragina.

[0033] Por un polipéptido "aislado" o un fragmento, una variante o un derivado del mismo se entiende un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere ningún nivel de purificación en particular. Por ejemplo, un polipéptido aislado puede ser extraído a partir de su entorno nativo o natural. Los polipéptidos y las proteínas
35 producidos recombinantemente expresados en células hospedadoras se consideran aislados para el propósito de la invención, ya que son polipéptidos nativos o recombinantes que han sido separados, fraccionados o purificados parcial o sustancialmente mediante cualquier técnica adecuada.

[0034] En la presente divulgación, un "fragmento de polipéptido" se refiere a una secuencia corta de
40 aminoácidos de un polipéptido mayor. Los fragmentos de proteínas pueden ser "libres" o están comprendidos en un polipéptido mayor del cual los fragmentos forman una parte de la región. Algunos ejemplos representativos de fragmento de polipéptidos, incluyen, por ejemplo, fragmentos que comprenden aproximadamente 5 aminoácidos, aproximadamente 10 aminoácidos, aproximadamente 15 aminoácidos, aproximadamente 20 aminoácidos, aproximadamente 30 aminoácidos, aproximadamente 40 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos,
45 aproximadamente 60 aminoácidos, aproximadamente 70 aminoácidos, aproximadamente 80 aminoácidos, aproximadamente 90 aminoácidos y aproximadamente 100 aminoácidos o más de longitud.

[0035] Los términos "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo", cuando se refieren a un polipéptido, incluyen cualquier polipéptido que conserve al menos alguna actividad biológica. Los polipéptidos según se
50 describen en el presente documento pueden incluir fragmentos, variantes biomoléculas derivadas de los mismos sin limitación, siempre que el polipéptido todavía realice su función. Los polipéptidos y los fragmentos de polipéptidos del NgR1 pueden incluir fragmentos proteolíticos, fragmentos de delección y en particular, fragmentos que alcanzan más fácilmente el sitio de acción cuando son administrados a un animal. Los fragmentos de polipéptidos incluyen adicionalmente cualquier porción del polipéptido que comprenda un epítipo antigénico o inmunógeno del polipéptido
55 nativo, incluyendo tanto epítopos lineales como tridimensionales. Los polipéptidos y los fragmentos de polipéptidos del NgR1 pueden comprender regiones variantes, incluyendo fragmentos como se han descrito anteriormente, y también polipéptidos con las secuencias de aminoácidos alteradas debido a sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos. Las variantes también pueden aparecer de forma natural, tales como una variante alélica. Por una "variante alélica" se entienden formas alternativas de un gen que ocupa un *locus* dado en un cromosoma de un
60 organismo. Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1985). Las variantes que se producen de forma

no natural pueden ser producidas mediante el uso de técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica. Los polipéptidos y los fragmentos de polipéptidos de NgR1 pueden comprender sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos conservativas o no conservativas. Los polipéptidos y los fragmentos de polipéptidos del NgR1 también pueden incluir moléculas derivadas. Los polipéptidos variantes también pueden denominarse en el presente documento como "análogos de polipéptidos". Según se usa en el presente documento un "derivado" de un polipéptido o de un fragmento de un polipéptido se refiere a un polipéptido en cuestión que tiene uno o más residuos derivatizados químicamente mediante la reacción de un grupo lateral funcional. También están incluidos como "derivados" aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos habituales. Por ejemplo, la 4-hidroxiprolina puede ser sustituida por prolina; la 5-hidroxilisina puede ser sustituida por lisina; la 3-metilhistidina puede ser sustituida por histidina; la homoserina puede ser sustituida por serina; y la ornitina puede ser sustituida por lisina.

[0036] Según se usa en el presente documento el término "enlace de disulfuro" incluye el enlace covalente formado entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace o un puente de disulfuro con un segundo grupo tiol.

[0037] Según se usa en el presente documento, "proteína de fusión" significa una proteína que comprende un primer polipéptido conectado linealmente, a través de enlaces peptídicos, con un segundo polipéptido. El primer polipéptido y el segundo polipéptido pueden ser idénticos o diferentes, y pueden estar conectados directamente o conectados a través de un péptido conector (véase a continuación).

[0038] El término "polinucleótido" pretende incluir un ácido nucleico singular así como ácidos nucleicos plurales, y se refiere a una molécula aislada o a un constructo de un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN mensajero (ARNm) o un ADN de plásmido (ADNp). Un polinucleótido puede contener la secuencia de nucleótidos de la secuencia completa del ADNc, incluyendo las secuencias no traducidas en 5' y en 3', las secuencias codificantes. Un polinucleótido puede comprender un enlace convencional de fosfodiéster y un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como se encuentra en los ácidos nucleicos peptídicos (PNA)). El polinucleótido puede estar formado por cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que pueden ser de ARN o de ADN no modificado, o de ARN o de ADN modificado. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden estar formados por ADN mono y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenario o, más normalmente, bicatenario o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, los polinucleótidos pueden estar formados por regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Los polinucleótidos también pueden contener una o más bases modificadas, o esqueletos de ADN o de ARN codificados por razones de estabilidad o por otras razones. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases poco habituales como inosina. Puede realizarse una variedad de modificaciones al ADN y al ARN; por lo tanto, un "polinucleótido" engloba las formas modificadas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente.

[0039] El término "ácido nucleico" se refiere a uno o más segmentos de un ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o de ARN, presentes en un polinucleótido. Por ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que ha sido extraída de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica para un polipéptido o un fragmento de polipéptido del NgR contenido en un vector se considera aislado para el propósito de la presente divulgación. Algunos ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en célula hospedadoras heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en disolución. Las moléculas de ARN aislado incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de los polinucleótidos de la presente divulgación. Los polinucleótidos aislados o los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente divulgación incluyen adicionalmente aquellas moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico pueden ser o pueden incluir un elemento regulador tal como un promotor, un sitio de unión al ribosoma o un terminador de la transcripción.

[0040] Según se usa en el presente documento, una "región codificante" es una porción de un ácido nucleico que consiste en los codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de detención" (TAG, TGA, o TAA) no es traducido en un aminoácido, puede considerarse que es parte de una región codificante, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión de ribosoma, terminadores de la transcripción, intrones, y similares, no son parte de una región codificante. Puede haber presentes dos o más regiones codificantes de la presente divulgación en un único constructo de polinucleótido, por ejemplo, en un único vector, o en constructos del polinucleótido por separado, por ejemplo, en vectores por separado (diferentes). Adicionalmente, cualquier vector puede contener una única región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un único vector puede codificar por separado para una región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina y una región variable de la cadena ligera de una inmunoglobulina. Además, un vector, un polinucleótido o un ácido

nucleico de la divulgación puede codificar para regiones codificantes heterólogas, tanto condensadas como no condensadas con un ácido nucleico que codifica para un polipéptido o un fragmento de polipéptido del NgR de la presente divulgación. Las regiones codificantes heterólogas incluyen sin limitación elementos o motivos especializados, tales como un péptido de señalización secretor o un dominio funcional heterólogo.

5

[0041] En ciertos casos, el polinucleótido o el ácido nucleico es ADN. En el caso del ADN, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica para un polipéptido puede incluir normalmente un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o de la traducción asociados operativamente con una o más regiones codificantes. Una asociación operativa es cuando una región codificante para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, está asociada con una o más secuencias reguladoras de una forma tal que colocan el producto de la expresión del gen bajo la influencia o el control del (las) secuencia(s) reguladora(s). Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificante de un polipéptido y un promotor asociado a la misma) están "asociados operativamente" si la inducción de la función del promotor da como resultado la transcripción del ARNm que codifica para el producto génico deseado, y si la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de expresión para dirigir la expresión del producto génico o para interferir en la capacidad del molde de ADN de ser transcrito. Por lo tanto, una región promotora estará asociada operativamente con un ácido nucleico que codifica para un polipéptido si el promotor es capaz de efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico celular que dirige la transcripción sustancial del ADN únicamente en unas células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, aparte de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, pueden estar asociados operativamente con el polinucleótido para dirigir una transcripción específica celular. Algunos promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción se divulgan en el presente documento.

[0042] Los expertos en la materia conocen una variedad de regiones de control de la transcripción. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción que aún funcionan en células de vertebrados, tales como, pero no se limitan a, segmentos promotores y potenciadores procedentes de citomegalovirus (el promotor temprano intermedio, junto con el intrón-A), virus 40 de simios (el promotor temprano) y retrovirus (tales como el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones del control de la transcripción incluyen las obtenidas a partir de genes de vertebrados tales como actina, proteína de choque térmico, hormona de crecimiento bovina y β -globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Algunas regiones de control de la transcripción adicionales adecuadas incluyen promotores y potenciadores específicos tisulares, así como promotores inducibles por linfocinas (por ejemplo, los promotores inducibles por interferones o por interleucinas).

[0043] De forma análoga, los expertos habituales en la materia conocen una variedad de elementos de control de la traducción. Estos incluyen, pero no se limitan, sitios de unión al ribosoma, codones de inicio y de terminación de la traducción y elementos derivados de picornavirus (particularmente un sitio interno de entrada al ribosoma, o IRES, también denominado secuencia CITE).

[0044] En otros casos, un polinucleótido de la presente divulgación es un ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm).

[0045] Las regiones codificantes para los polinucleótidos y los ácidos nucleicos de la presente divulgación pueden estar asociadas con regiones codificantes adicionales que codifican para péptidos secretores o de señalización, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente divulgación. De acuerdo con la hipótesis de la señal, las proteínas secretadas por las células de mamífero tienen un péptido de señalización o secuencia líder secretada que es escindida de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de proteínas en crecimiento a través del retículo endoplásmico rugoso. Los expertos habituales en la materia son conscientes de que los polipéptidos secretados por las células de vertebrados tienen generalmente un péptido de señalización condensado con el N-terminal del polipéptido, que es escindido del polipéptido completo para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En ciertos casos, se usa un péptido de señalización nativo, por ejemplo, el péptido de señalización de una cadena ligera o de una cadena pesada de una inmunoglobulina, o un derivado funcional de esta secuencia que conserva la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido que está operativamente asociado con él. Alternativamente, puede usarse un péptido de señalización heterólogo de mamífero, o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder natural puede ser sustituida por la secuencia líder del activador del plasminógeno tisular humano (TPA) o de la β -glucuronidasa de ratón.

[0046] Según se usa en el presente documento el término "modificado" incluye la manipulación de moléculas de un ácido nucleico o de un polipéptido a través de un medio sintético (por ejemplo, mediante técnicas

recombinantes, síntesis peptídica *in vitro*, mediante el acoplamiento enzimático o químico de péptidos o alguna combinación de estas técnicas).

- [0047]** Según se usa en el presente documento, los términos "conectado", "condensado" y "fusión" se usan de forma intercambiable. Estos términos se refieren a la unión conjunta de dos o más elementos o componentes, mediante cualquier medio, incluyendo un medio de conjugación química o recombinante. Una "fusión en marco" se refiere a la unión de dos o más marcos abiertos de lectura de un polinucleótido (ORF) para formar un ORF continuo más largo, de tal forma que se conserve el marco de lectura traduccional correcto de los ORF originales. Por lo tanto, una proteína de fusión recombinante es una proteína individual que contiene dos o más segmentos que se corresponden con los polipéptidos codificados por los ORF originales (segmentos que normalmente no están unidos así en la naturaleza). Aunque el marco de lectura se hace por tanto continuo a lo largo de los segmentos condensados, los segmentos pueden estar separados física o espacialmente mediante, por ejemplo, una secuencia conectora en marco.
- [0048]** Una secuencia "conectora" es una serie de uno o más aminoácidos que separa dos regiones codificantes de un polipéptido en una proteína de fusión. Un conector típico comprende al menos 5 aminoácidos. Algunos conectores adicionales comprenden al menos 10 o al menos 15 aminoácidos. En ciertas formas de realización, los aminoácidos de un conector peptídico se eligen de forma que el conector sea hidrófilo. El conector (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (G4S)₃ (ID. SEC. N°: 65) es un conector preferido que es ampliamente aplicable a muchos anticuerpos ya que proporciona la suficiente flexibilidad. Otros conectores incluyen (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂ (G4S)₂ (ID. SEC. N°: 66), Glu Ser Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser (ID. SEC. N°: 67), Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr (ID. SEC. N°: 68), Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr Gln (ID. SEC. N°: 69), Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp (ID. SEC. N°: 70), Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly (ID. SEC. N°: 71), Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser Leu Asp (ID. SEC. N°: 72) y Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Glu Leu Ala Phe Arg Ser Leu Asp (ID. SEC. N°: 73). Algunos ejemplos de conectores más cortos incluyen fragmentos de los conectores anteriores, y algunos ejemplos de conectores más largos incluyen combinaciones de los conectores anteriores, combinaciones de fragmentos de los conectores anteriores y combinaciones de los conectores anteriores con fragmentos de los conectores anteriores.
- [0049]** En el contexto de polipéptidos, una "secuencia lineal" o una "secuencia" es el orden de los aminoácidos en un polipéptido en una dirección desde amino hacia carboxilo terminal, en la que los residuos que están próximos entre sí en la secuencia están contiguos en la estructura primaria del polipéptido.
- [0050]** El término "expresión", según se usa en el presente documento, se refiere a un proceso mediante el cual un gen produce un producto bioquímico, por ejemplo, un ARN o un polipéptido. El proceso incluye cualquier manifestación de la presencia funcional del gen en la célula, incluyendo, sin limitación, el gen inactivado así como tanto la expresión transitoria como la expresión estable. Incluye, sin limitación, la transcripción del gen en ARN mensajero (ARNm), en ARN de transferencia (ARNt), en ARN pequeño en horquilla (ARNph), en ARN de interferencia pequeño (ARNip) o en cualquier otro producto de ARN, y la traducción de dicho ARNm en polipéptido(s), así como cualquier proceso que regula la transcripción o la traducción. Si el producto final deseado es un producto bioquímico, la expresión incluye la creación de ese producto bioquímico y de cualquier precursor. La expresión de un gen produce un "producto génico". Según se usa en el presente documento, un producto génico puede ser un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN mensajero producido mediante la transcripción de un gen, o un polipéptido que es traducido a partir de un transcrito. Los productos génicos descritos en el presente documento incluyen adicionalmente ácidos nucleicos con modificaciones post-transcripcionales, por ejemplo, poliadenilación, o polipéptidos con modificaciones post-traduccionales, por ejemplo, metilación, glucosilación, adición de lípidos, asociación con otras subunidades de proteínas, escisión proteolítica, y similares.
- [0051]** El término "ARN de interferencia" o "ARNi" se refiere al silenciamiento o la disminución de la expresión génica por parte de ARNip. Es el proceso de silenciamiento génico específico de secuencia post-transcripcional en animales y plantas, iniciado por un ARNip que es homólogo en su región dúplex de la secuencia del gen silenciado. El gen puede ser endógeno o exógeno al organismo, estar integrado en un cromosoma o presente en un vector de transfección que no está integrado en el genoma. La expresión del gen está completamente o parcialmente inhibida. También puede considerarse que el ARNi inhibe la función de un ARN objetivo; la función del ARN objetivo puede ser completa o parcial.
- [0052]** Según se usa en el presente documento, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como al profiláctico o a medidas preventivas, en los que el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) un cambio o un trastorno fisiológico indeseado, tal como la progresión de la esclerosis múltiple. Algunos

resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, el alivio de los síntomas, la disminución de la magnitud de la enfermedad, la estabilización (es decir, la ausencia de empeoramiento) del estado de una enfermedad, el retraso o la ralentización en la progresión de la edad, la mejora o el alivio del estado de la enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), tanto detectable como indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe el tratamiento. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen los que ya tienen la afección o la enfermedad, así como aquellos con tendencia a tener la afección o el trastorno, o aquellos en los que va a prevenirse la afección o el trastorno.

[0053] Por "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero", se entiende cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para quien se desea un diagnóstico, un pronóstico o una terapia. Algunos sujetos mamíferos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, animales domésticos, animales de granja, animales de zoo, animales de deporte, mascotas tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas; primates tales como simios, monos, orangutanes y chimpancés; cánidos tales como perros y lobos; félidos tales como gatos, leones y tigres; équidos tales como caballos, burros y cebras; animales para el consumo tales como vacas, cerdos y ovejas; ungulados tales como renos y jirafas; roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y cobayas; y así sucesivamente. En ciertas formas de realización, el mamífero es un sujeto humano.

[0054] Según se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz a unas dosis y durante unos periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Un resultado terapéutico puede ser, por ejemplo, una reducción en los síntomas, una prolongación en la supervivencia, una mejora en la movilidad, y similares. No es necesario que un resultado terapéutico sea un "proceso".

[0055] Según se usa en el presente documento, una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a unas dosis y durante unos periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, dado que en los sujetos se usa una dosis profiláctica antes o en una fase temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

[0056] La divulgación, incluyendo la presente invención, se refiere a ciertos antagonistas del NgR1 que promueven la supervivencia neuronal, el crecimiento de la neurita y la regeneración axonal de neuronas, por ejemplo, de neuronas del CNS. Por ejemplo, la presente divulgación proporciona polipéptidos y fragmentos de polipéptidos del NgR1, anticuerpos y fragmentos de los mismos y polinucleótidos que estimulan el crecimiento axonal en unas condiciones en las que normalmente el crecimiento axonal está inhibido. Por lo tanto, los antagonistas del NgR1 de la divulgación, incluyendo la invención, son útiles en el tratamiento de lesiones, de enfermedades o de trastornos que pueden ser aliviados promoviendo la supervivencia neuronal, o mediante la estimulación del crecimiento o de la regeneración axonal en el CNS.

[0057] Algunos ejemplos de enfermedades, trastornos o lesiones del CNS incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple (MS), leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML), encefalomiелitis (EPL), mielolisis pontocerebelosa central (CPM), adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander, enfermedad de Pelizaeus Merzbacher (PMZ), leucodistrofia flobaide (enfermedad de Krabbe) y degeneración walleriana, neuritis óptica, miелitis transversa, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, lesiones de la médula espinal, lesiones cerebrales traumáticas, lesiones posteriores a radiación, complicaciones neurológicas de la quimioterapia, apoplejía, neuropatía óptica isquémica aguda, deficiencia en la vitamina E, síndrome aislado de deficiencia en la vitamina E, AR, síndrome de Bassen-Kornzweig, síndrome de Marchiafava-Bignami, leucodistrofia metacromática, neuralgia del trigémino y parálisis de Bell. De entre estas enfermedades, la MS es la más extendida, afectando aproximadamente a 2,5 millones de personas en todo el mundo.

Polipéptidos del Receptor Nogo-1

[0058] En un caso, la presente divulgación se refiere a polipéptidos del receptor Nogo-1 que son inmunógenos. En algunos casos de la divulgación, el polipéptido inmunógeno consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos elegida de entre el grupo que consiste en: LDLSADNQLRVVDPTT (de rata) (ID. SEC. Nº: 1); LDLSADNQLRSVDPAT (humana) (ID. SEC. Nº: 2); AVASGPFPRPFQTNQLTDEELLGLPKCCQPDAADKA (de rata) (ID. SEC. Nº: 3); AVATGPYHPIWTGRATDEEPLGLPK-CCQPDAADKA (humana) (ID. SEC. Nº: 4); y CRLGQAGSGA (de ratón) (ID. SEC. Nº: 5).

[0059] En algunos casos, la divulgación se refiere a polipéptidos del receptor Nogo 1 que son unidos por un

anticuerpo monoclonal que se une al receptor Nogo-1. En algunos casos, el polipéptido es reconocido por el anticuerpo monoclonal 7E11. En algunos casos, el polipéptido se elige de entre el grupo que consiste en: LDLSADNQLR (ID. SEC. N°: 27); LDLSDDAELR (ID. SEC. N°: 29); LDLASADNQLR (ID. SEC. N°: 30); LDLASDDAELR (ID. SEC. N°: 31); LDALSADNQLR (ID. SEC. N°: 32); LDALSDDAELR (ID. SEC. N°: 33); 5 LDLSADNQLR (ID. SEC. N°: 34); LDLSDDAELR (ID. SEC. N°: 35); ADNQLRVVDPTT (ID. SEC. N°: 36); ADNQLR (ID. SEC. N°: 37); ADLSADNQLRVVDPTT (ID. SEC. N°: 41); LA-LSADNQLRVVDPTT (ID. SEC. N°: 42); LDLSADNALRVVDPTT (ID. SEC. N°: 43); LDLSADNQLHVVDPTT (ID. SEC. N°: 44); y LDLSADNQLAVVDPTT (ID. SEC. N°: 46).

10 **[0060]** En algunos casos, la divulgación se refiere a un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de los ID. SEC. N°: 1 - 5, 26 - 27, 29 - 37 y 41 - 45. En algunos casos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico está unida a una secuencia de control de la expresión (por ejemplo, pCADN(I)).

[0061] La presente divulgación también se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico que codifica 15 para un polipéptido de la divulgación. En algunos casos de la divulgación, el vector es un vector de clonación. En algunos casos de la divulgación, el vector es un vector de expresión. En algunos casos de la divulgación, el vector contiene al menos un marcador seleccionable.

[0062] La presente divulgación también se refiere a células hospedadoras que comprenden el anteriormente 20 descrito ácido nucleico o vector.

[0063] La presente divulgación también se refiere a un método para la producción de un polipéptido 25 inmunógeno de la divulgación que comprende la etapa de cultivar una célula hospedadora. En algunos casos, la célula hospedadora es procariota. En algún caso, la célula hospedadora es eucariota. En algún caso, la célula hospedadora es de levadura.

[0064] La presente invención también se refiere a ciertos polipéptidos del receptor Nogo-1 útiles, por ejemplo, 30 para promover el crecimiento de la neurita, para promover la supervivencia neuronal, para promover la supervivencia axonal o para inhibir la transducción de señales del complejo de señalización del NgR1. Normalmente, los polipéptidos de la invención actúan para bloquear la inhibición mediada por el NgR1 de la supervivencia neuronal, del crecimiento de la neurita o de la regeneración axonal de las neuronas del sistema nervioso central (CNS).

[0065] A continuación se muestra el polipéptido humano NgR1 como el ID. SEC. N°: 49.

35 **[0066]** NgR1 humano completo (ID. SEC. N°: 49):

**MKRASAGGSRLLAWLWLQAWQVAAPCPGACVCYNEPKVTTSCPQQGLQAVPVGIPA
ASQRIFLHGNRISHVPAASFRA CRNL TILWLHSNVLARIDAAFTGLALLEQLDLSDNAQ
LRSDPATFHGLGRLHTLHLDRCGLQELGPGFLFRGLAALQYLYLQDNALQALPDDTFR
DLGNLTHLFLHGNRISSVPERAFRGLHSLDRLLLHQNRVAHVHPHAFRDLGRLMTLYLF
ANNLSALPTEALAPLRALQYLRINDNPWVCDRCARPLWAWLQKFRGSSSEVPCLPQR
LAGRDLKRLAANDLQGCATGPHYPIWTGRATDEEPLGLPKCCQPDAAADKASVLEPG
RPASAGNALKGRVPPGDSPPGNGSGPRHINDSPFGTLPGSAEPPLTAVRPEGSEPPGFPTS
GPRRRPGCSRKNRTRSHCRLGQAGSGGGGTGDSESGALPSLTCSLTPLGLALVLWTVL
GPC**

[0067] A continuación se muestra el polipéptido de rata NgR1 polipéptido como el ID. SEC. N°: 50.

40

[0068] NgR1 de rata completo (ID. SEC. N°: 50):

MKRASSGGSRLAWVLWLQAWRVATPCPGACVCYNEPKVTTSCPQQGLQAVP
 TGIPASSQRIFLHGNRISHVPAASFQSCRNLTLWLHSNALARIDAAFTGLTLLEQLDLSDNAQL
 HVVDPTTFHGLGHLHTLHLDRCGLRELGPGLFRGLAALQYLYLQDNNLQALPDNTFRDLGNLT
 HLFLHGNRIPSVPEHAFRGLHSLDRLLLHQNHVARVHPHAFRDLGRMLTYLFANNLSMLPAEV
 LMPLRSLQYLRNDNPWVCDRCRARPLWAWLQKFRGSSSEVPCNLPQRLADRDLKRLAASDLEG
 CAVASGPFRIQTSQLTDEELSLPKCCQPDAADKASVLEPGRPASAGNALKGRVPPGDTPPGNG
 SGPRHINDSPFGTLPSSAEPPLTALRPGGSEPPGLPTTGPRRRPGCSRKNRTRSHCRLGQAGSGAS
 GTGDAEGSGALPALACSLAPLGLALVLWTVLGPC

[0069] A continuación se muestra el polipéptido de ratón NgR1 como el ID. SEC. N°: 51.

5 [0070] NgR1 de ratón completo (ID. SEC. N°: 51:)

MKRASSGGSRLAWVLWLQAWRVATPCPGACVCYNEPKVTTSCPQQGLQAVP
 TGIPASSQRIFLHGNRISHVPAASFQSCRNLTLWLHSNALARIDAAFTGLTLLEQLDLSDNAQL
 HVVDPTTFHGLGHLHTLHLDRCGLRELGPGLFRGLAALQYLYLQDNNLQALPDNTFRDLGNLT
 HLFLHGNRIPSVPEHAFRGLHSLDRLLLHQNHVARVHPHAFRDLGRMLTYLFANNLSMLPAEV
 LMPLRSLQYLRNDNPWVCDRCRARPLWAWLQKFRGSSSEVPCNLPQRLADRDLKRLAASDLEG
 CAVASGPFRIQTSQLTDEELSLPKCCQPDAADKASVLEPGRPASAGNALKGRVPPGDTPPGNG
 SGPRHINDSPFGTLPSSAEPPLTALRPGGSEPPGLPTTGPRRRPGCSRKNRTRSHCRLGQAGSGAS
 GTGDAEGSGALPALACSLAPLGLALVLWTVLGPC

Anticuerpos

10

[0071] La presente divulgación se refiere adicionalmente a un anticuerpo o a un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al polipéptido del receptor Nogo-1 de la divulgación. En algunos casos, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno se une a un polipéptido que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos elegida de entre el grupo que consiste en los ID. SEC. N°: 1 - 5, 26 - 27, 29 - 37 y 41 - 45.

15

El anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de la presente divulgación puede ser producido *in vivo* o *in vitro*. La producción del anticuerpo o del fragmento de unión al antígeno se analiza a continuación.

[0072] Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la divulgación inhibe la unión del receptor Nogo-1 a un ligando (por ejemplo, NogoA, NogoB, NogoC, MAG, OM-gp) y disminuye la inhibición mediada por la mielina del crecimiento y la germinación de la neurita, particularmente del crecimiento axonal, y atenúa el colapso del cono de crecimiento mediado por la mielina.

20

[0073] En algún caso, el anticuerpo anti-receptor Nogo-1 o el fragmento de unión al antígeno del mismo es murino. En algún caso, el receptor Nogo-1 es de rata. En otro caso, el receptor Nogo-1 es humano. En algún caso el anticuerpo anti-receptor Nogo-1 o el fragmento de unión al antígeno del mismo es recombinante, modificado, humanizado y/o quimérico.

25

[0074] En algún caso, el anticuerpo se elige de entre el grupo que consiste en: 7E11 monoclonal (N° de acceso de la ATCC® PTA-4587); 1H2 monoclonal (N° de acceso de la ATCC® PTA-4584); 2F7 monoclonal (N° de acceso de la ATCC® PTA-4585); 3G5 monoclonal (N° de acceso de la ATCC® PTA-4586); y 5B10 monoclonal (N° de acceso de la ATCC® PTA-4588). En algún caso, el anticuerpo es el anticuerpo policlonal 46.

30

[0075] Algunos ejemplos de fragmentos de unión al antígeno son Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, dAb y fragmentos que contienen fragmentos de la región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena única (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir al polipéptido una unión específica al antígeno (por ejemplo,

35

inmunoadhesinas).

[0076] Según se usa en el presente documento, Fd significa un fragmento que consiste en los dominios VH y CH; Fv significa un fragmento que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; y dAb significa un fragmento que consiste en un dominio VH (Ward y col., Nature 341: 544 - 546 (1989)). Según se usa en el presente documento, un anticuerpo cadena única (scFv) significa un anticuerpo en el que una región VL y una región VH se emparejan para formar moléculas monovalentes a través de un conector sintético que permite que sean creadas como una cadena proteica única (Bird y col., Science 242: 423 - 426 (1988) y Huston y col., Prog. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85: 5879 - 5883 (1988)). Según se usa en el presente documento, diacuerpo significa un anticuerpo biespecífico en el que los dominios VH y VL están expresados en una única cadena polipeptídica, pero mediante el uso de un conector que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, forzando así a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 6444 - 6448 (1993) y Poljak, R. J., y col., Structure 2: 1121 - 1123 (1994)). Según se usa en el presente documento, una inmunoadhesina que se une específicamente a un antígeno de interés significa una molécula en la que pueden incorporarse una o más CDR ya sea covalentemente o no covalentemente.

[0077] En algunos casos, la divulgación proporciona un polipéptido de subunidad de un anticuerpo del receptor Nogo-1 de la divulgación, en el que el polipéptido de subunidad se elige de entre el grupo que consiste en: (a) una cadena pesada o una región variable de la misma; y (b) una cadena ligera o una región variable de la misma.

[0078] En algunos casos, la divulgación proporciona un ácido nucleico que codifica para la cadena pesada o la región variable de la misma, o para la cadena ligera y la región variable de la misma de un polipéptido de subunidad de un anticuerpo del receptor Nogo-1 de la divulgación.

[0079] En algunos casos, la divulgación proporciona una región hipervariable (CDR) de un anticuerpo del receptor Nogo-1 de la divulgación o un ácido nucleico que codifica para una CDR.

Inmunización

[0080] Los anticuerpos de la divulgación pueden ser generados mediante la inmunización de un hospedador adecuado (por ejemplo, vertebrados, incluyendo seres humanos, ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, ganado, caballos, reptiles, peces, anfibios y en huevos de aves, de reptiles y de peces). Dichos anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales.

[0081] En algunos casos, el hospedador es inmunizado con un polipéptido inmunógeno del receptor Nogo-1 de la divulgación. En otros casos, el hospedador es inmunizado con el receptor Nogo-1 asociado a la membrana celular de una célula intacta o disrupida, y los anticuerpos de la divulgación son identificados mediante la unión a un polipéptido del receptor Nogo-1 de la divulgación.

[0082] En algunos casos, el antígeno del receptor Nogo-1 se administra con un coadyuvante para estimular la respuesta inmunitaria. Los coadyuvantes a menudo deben ser administrados junto con el antígeno con objeto de desencadenar una respuesta inmunitaria frente al antígeno. Estos coadyuvantes son habitualmente sustancias insolubles o no degradables que promueven una inflamación no específica, con el reclutamiento de fagocitos mononucleares en el sitio de inmunización. Algunos ejemplos de coadyuvantes incluyen, pero no se limitan a, coadyuvante de Freund, RIBI (dipéptidos de muramilo), ISCOM (complejo inmunoestimulantes) o fragmentos de los mismos.

[0083] Para una revisión de los métodos de elaboración de anticuerpos, véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988); Yelton, D.E. y col., Ann. Rev. of Biochem. 50: 657 - 80 (1981); y Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology (Nueva York: John Wiley & Sons) (1989). La determinación de la inmunorreactividad con un polipéptido inmunógeno del receptor Nogo-1 de la divulgación puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los diversos métodos bien conocidos en la materia, incluyendo, por ejemplo, un ensayo de inmunotransferencia y un ELISA.

Producción de anticuerpos y líneas celulares productoras de anticuerpos

[0084] Los anticuerpos monoclonales de la divulgación pueden ser elaborados mediante procedimientos habituales según se describe, por ejemplo, en Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988), *supra*.

[0085] En resumen, en un periodo de tiempo apropiado el animal es sacrificado y los linfocitos B de los nódulos linfáticos y/o esplénicos son immortalizados mediante una cualquiera de las diversas técnicas que son bien conocidas en la materia, e incluyen, pero no se limitan a, una transformación, tal como con el EBV o una fusión con una línea celular immortalizada, tal como con células de mieloma. A continuación, las células se separan por clones y los sobrenadantes de cada clon se ensayan para comprobar la producción de un anticuerpo específico para un polipéptido inmunógeno del receptor Nogo-1 de la divulgación. Los métodos de selección, clonación y expansión de hibridomas son bien conocidos en la materia. De forma análoga, los métodos para la identificación de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los genes de las inmunoglobulinas son conocidos en la materia.

10 **[0086]** Otras técnicas adecuadas para la producción de un anticuerpo de la divulgación implica la exposición *in vitro* de linfocitos contra el receptor Nogo-1 o contra un polipéptido inmunógeno de la divulgación, o como alternativa, la selección de genotecas de anticuerpos en fagos o en vectores similares. Véase Huse y col., Science, 246: 1275 - 81 (1989). Los anticuerpos útiles en la presente divulgación pueden ser empleados con o sin modificación.

15 **[0087]** Los antígenos (en este caso el receptor Nogo-1 o un polipéptido inmunógeno de la divulgación y los anticuerpos pueden ser marcados mediante la unión, tanto covalentemente como no covalentemente, de una sustancia que proporciona una señal detectable. En la materia se conocen diversos marcadores y técnicas de conjugación y pueden ser empleados en la práctica de la invención. Algunos marcadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, radionucleótidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Algunas patentes que enseñan el uso de dichos marcadores incluyen las Patentes de EE.UU. 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. También pueden producirse inmunoglobulinas recombinantes (véase la Patente de EE.UU. 4.816.567).

25 **[0088]** En algunos casos de la divulgación, un anticuerpo tiene múltiples especificidades de unión, tal como un anticuerpo bifuncional preparado mediante una cualquiera de las diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia, incluyendo la producción de hibridomas híbridos, el intercambio de disulfuro, la reticulación química, la adición de péptidos conectores entre dos anticuerpos monoclonales, la introducción de dos conjuntos de cadenas pesada y ligera de una inmunoglobulina en una línea celular en particular, y así sucesivamente (véase a continuación para un análisis más detallado).

30 **[0089]** Los anticuerpos de esta divulgación también pueden ser anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, producidos por células humanas immortalizadas, por ratones SCID-hu o por otros animales no humanos capaces de producir anticuerpos "humanos".

35 Bibliotecas de expresión en fago

[0090] Los anticuerpos anti-receptor Nogo-1 de esta divulgación pueden ser aislados mediante el cribado de una biblioteca de anticuerpos combinatoria recombinante. Algunos ejemplos de bibliotecas combinatorias son para la unión a un polipéptido inmunógeno del receptor Nogo-1 de la divulgación, tal como la expresión de un scFv en una biblioteca de fagos, preparada mediante el uso de ADNcs de VL y de VH preparados a partir del ARNm derivado de un animal inmunizado con un polipéptido inmunógeno del receptor Nogo-1 de la divulgación. Las metodologías para la preparación y el cribado de dichas bibliotecas son conocidas en la materia. En el mercado hay disponibles métodos y materiales para la generación de bibliotecas de expresión en fago (por ejemplo, el Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, nº de catálogo 27-9400-01; el kit de expresión en fago Stratagene SurfZAP™, nº de catálogo 240612; y otros de MorphoSys). También existen otros métodos y reactivos que pueden usarse en la generación y el cribado de bibliotecas de expresión de anticuerpos (véase, por ejemplo, Ladner y col., Patente de EE.UU. Nº 5.223.409; Kang y col., Publicación PCT Nº WO 92/18619; Dower y col., Publicación PCT Nº WO 91/17271; Winter y col., Publicación PCT Nº WO 92/20791; Markland y col., Publicación PCT Nº WO 92/15679; Breitling y col., Publicación PCT Nº WO 93/01288; McCafferty y col., Publicación PCT Nº WO 92/01047; Garrard y col., Publicación PCT Nº WO 92/09690; Fuchs y col., Bio/Technology 9: 1370 - 1372 (1991); Hay y col., Hum. Antibod. Hybridomas 3: 81 - 85; (1992) Huse y col., Science 246: 1275 - 1281 (1989); McCafferty y col., Nature 348: 552 - 554 (1990); Griffiths y col., EMBO J. 12: 725 - 734 (1993); Hawkins y col., J. Mol. Biol. 226: 889 - 896 (1992); Clackson y col., Nature 352: 624 - 628 (1991); Gram y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 3576 - 3580 (1992); Garrard y col., Bio/Technology 9: 1373 - 1377 (1991); Hoogenboom y col., Nucl. Acids Res. 19: 4133 - 4137 (1991); y Barbas y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88: 7978 - 7982 (1991).

[0091] Después del cribado y el aislamiento de un anticuerpo anti-receptor Nogo-1 de la divulgación a partir de una biblioteca de expresión en inmunoglobulina recombinante, el ácido nucleico que codifica para el anticuerpo seleccionado puede ser recuperado a partir del conjunto de expresión (por ejemplo, a partir del genoma del fago) y

subclonarse en otros vectores de expresión mediante las técnicas de ADN recombinante habituales. Si se desea, el ácido nucleico puede ser manipulado adicionalmente para crear otras formas del anticuerpo de la divulgación, como se describe a continuación. Para expresar un anticuerpo aislado mediante el cribado de una biblioteca combinatoria, el ADN que codifica para la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo, o para las regiones variable del mismo, es clonado en un vector de expresión recombinante e introducido en una célula hospedadora de mamífero, como se ha descrito anteriormente.

Cambio de clase

10 **[0092]** Los anticuerpos anti-receptor Nogo-1 de la divulgación para ser de cualquier isotipo. Puede producirse un anticuerpo de cualquier isotipo deseado mediante un cambio de clase. Para el cambio de clase, los ácidos nucleicos que codifican para la VL o la VH, que no incluyen ninguna secuencia de nucleótidos que codifica para la CL o la CH, se aíslan mediante el uso de métodos bien conocidos en la materia. Los ácidos nucleicos que codifican para la VL o la VH se unen después operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica para una CL o una CH de una clase deseada de una molécula de inmunoglobulina. Esto puede conseguirse mediante el uso de un vector o de un ácido nucleico que comprende una cadena CL o CH, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-receptor Nogo-1 de la divulgación que originalmente era una IgM puede cambiarse de clase a una IgG. Además, puede usarse el cambio de clase para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo, de IgG1 a IgG2.

20 Anticuerpos mutados

[0093] En otros casos, los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno de la divulgación pueden ser mutados en los dominios variables de la cadena pesada y/o cadena para alterar una propiedad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, puede efectuarse una mutación en una o más de las regiones de la CDR para aumentar o disminuir la K_d del anticuerpo por el receptor Nogo-1, para aumentar o disminuir la K_{off} o para alterar la especificidad de unión del anticuerpo. Las técnicas de mutagénesis dirigida son bien conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) y Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology (Nueva York: John Wiley & Sons) (1989). En un caso preferido, las mutaciones se realizan en un residuo de aminoácido que se sabe que está cambiado en comparación con la línea germinal en una región variable de un anticuerpo anti-receptor Nogo-1 de la divulgación. En algunos casos, las mutaciones pueden realizarse en uno o más residuos de aminoácidos que se sabe que están cambiados con respecto a la línea germinal en una región variable de un anticuerpo anti-receptor Nogo-1 de la divulgación. En otro caso, se muta un ácido nucleico que codifica para la región variable de la cadena pesada o de la cadena ligera del anticuerpo en una o más de las regiones en marco. Una mutación puede realizarse en una región en marco en un dominio constante para aumentar la semivida. Una mutación en una región en marco o en un dominio constante también puede realizarse para alterar la inmunogenicidad del anticuerpo, para proporcionar un sitio para la unión covalente o no covalente de otra molécula o para alterar propiedades tales como la fijación al complemento. Pueden realizarse mutaciones en cada una de las regiones en marco, el dominio constante y las regiones variables de un único anticuerpo mutado. Alternativamente, las mutaciones pueden realizarse únicamente en una de las regiones en marco, en las regiones variables o en el dominio constante de un único anticuerpo mutado.

Anticuerpos de fusión e inmunoadhesinas

45 **[0094]** En otro caso, puede elaborarse un anticuerpo de fusión o una inmunoadhesina que comprende todo o una porción del anticuerpo anti-receptor Nogo-1 de la divulgación unido a otro polipéptido. En algunos casos, únicamente la región variable del anticuerpo anti-receptor Nogo-1 está unida al polipéptido. En otros casos, el dominio VH de un anticuerpo anti-receptor Nogo-1 de esta divulgación está unido a un primer polipéptido, mientras el dominio VL del anticuerpo está unido a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de una manera que permite que los dominios VH y VL interactúen entre sí para formar un sitio de unión al anticuerpo. En otros casos, el dominio VH está separado del dominio VL por un conector que permite que los dominios VH y VL interactúen entre sí (véase a continuación, en Anticuerpos de cadena única). El anticuerpo VH - conector - VL se une entonces a un polipéptido de interés. El anticuerpo de fusión es útil para dirigir un polipéptido a una célula o a un tejido que expresa un ligando del receptor Nogo-1. El polipéptido de interés puede ser un agente terapéutico, tal como una toxina, o puede ser un agente diagnóstico, tal como una enzima que puede ser fácilmente visualizada, tal como la peroxidasa de rábano picante. Además, pueden crearse anticuerpos de fusión en los que dos (o más) anticuerpos de cadena única están conectados 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.

60

Anticuerpos de cadena única

[0095] La presente divulgación incluye un anticuerpo de cadena única (scFv) que se une a un polipéptido del receptor Nogo-1 de la divulgación. Para la producción del ScFv, las VH y VL que codifican para el ADN se unen operativamente al ADN que codifica para un conector flexible, por ejemplo, que codifica para la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser)3 (ID. SEC. N°: 10), de forma que las secuencias de VH y VL puedan ser expresadas como una proteína de cadena única contigua, estando las regiones VL y VH unidas por el conector flexible (véase, por ejemplo, Bird y col., Science 242: 423 - 426 (1988); Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85: 5879 - 5883 (1988); McCafferty y col., Nature 348: 552 - 554 (1990)). El anticuerpo de cadena única puede ser monovalente, si sólo se usan una única VH y VL, bivalente si se usan dos VH y VL, o polivalente si se usan más de dos VH y VL.

Anticuerpos quiméricos

[0096] La presente divulgación incluye adicionalmente un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión al antígeno del mismo en el que una especificidad es para un polipéptido del receptor Nogo-1 de la divulgación. En un caso, puede generarse un anticuerpo quimérico que se une específicamente a un polipéptido del receptor Nogo-1 de la invención a través de un dominio de unión, y a una segunda molécula a través de un segundo dominio de unión. El anticuerpo quimérico puede ser producido a través de técnicas de biología molecular recombinante, o puede conjugarse físicamente entre sí. Además, un anticuerpo de cadena única que contiene más de una VH y VL puede ser generado para que se una específicamente a un polipéptido de la divulgación y a otra molécula que esté relacionada con la atenuación mediada por la mielina del colapso del cono de crecimiento y de la inhibición del crecimiento y la germinación de la neurita. Dichos anticuerpos biespecíficos pueden ser generados mediante el uso de técnicas que son bien conocidas, por ejemplo, Fanger y col., Immunol Methods 4: 72 - 81 (1994) y Wright y Harris, *supra*, y en relación con (iii) véase, por ejemplo, Traunecker y col. Int. J. Cancer (Supl.) 7: 51 - 52 (1992).

[0097] En algunos casos, los anticuerpos quiméricos se preparan mediante el uso de una o más de las regiones variables de un anticuerpo de la divulgación. En otro caso, el anticuerpo quimérico se prepara mediante el uso de una o más regiones de CDR de dicho anticuerpo.

Anticuerpos derivatizados y marcados

[0098] Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la divulgación puede ser derivatizado o unido a otra molécula (por ejemplo, otro péptido o proteína). En general, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno es derivatizado de tal forma que la unión a un polipéptido de la divulgación no se ve afectada negativamente por la derivatización o el marcaje. Por ejemplo, un anticuerpo o una porción del anticuerpo de la divulgación puede unirse funcionalmente (mediante un acoplamiento químico, una fusión genética, una asociación no covalente o de otro modo) a una o más de otras entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), a un agente de detección, a un agente citotóxico, a un agente farmacéutico y/o a una proteína o un péptido que pueden mediar en la asociación del anticuerpo o del fragmento de unión al antígeno con otra molécula (tal como una región del núcleo de la estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

[0099] En algunos casos, un anticuerpo derivatizado se produce mediante la reticulación de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Algunos conectores de reticulación adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos distintamente reactivos separados por un separador apropiado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoyl-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Dichos conectores están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.

[0100] En algunos casos, el anticuerpo derivatizado es un anticuerpo marcado. Algunos ejemplos de agentes de detección con los que puede derivatizarse un anticuerpo o una porción del anticuerpo de la divulgación son compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalensulfonilo, ficoeritrina, fósforos lantánidos y similares. Un anticuerpo también puede ser marcado con enzimas que son útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, oxidasa de glucosa y similares. En los casos en los que estén marcados con una enzima detectable, el anticuerpo se detecta mediante la adición de reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, peroxidasa de rábano picante con peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina. Un anticuerpo también puede ser marcado con biotina y detectado a través de la medición indirecta de la unión de avidina o de estreptavidina. Un anticuerpo también puede ser marcado con epítomos de un polipéptido predeterminado reconocidos por un segundo indicador (por ejemplo, pares de secuencias de una cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metales, etiquetas de

epítomos).

[0101] Un anticuerpo anti-receptor Nogo-1 o un fragmento de antígeno del mismo también puede ser marcado con un aminoácido radiomarcado. El radiomarcado puede usarse con fines tanto diagnósticos como terapéuticos. El anticuerpo radiomarcado anti-receptor Nogo-1 puede usarse en diagnóstico, por ejemplo, para la determinación de los niveles del receptor Nogo-1 en un sujeto. Además, el anticuerpo radiomarcado anti-receptor Nogo-1 puede usarse terapéuticamente para el tratamiento de lesiones en la médula espinal. Algunos ejemplos de marcajes para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes radioisótopos o radionucleótidos - ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I .

[0102] Un anticuerpo anti-receptor Nogo-1 o un fragmento de antígeno del mismo también puede ser derivatizado 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 sérica o para aumentar la unión a los tejidos.

Caracterización de los anticuerpos anti-receptor Nogo-1

Clase y subclase de los anticuerpos anti-receptor Nogo-1

[0103] La clase y la subclase de los anticuerpos anti-receptor Nogo-1 puede ser determinada mediante cualquier método conocido en la materia. En general, la clase y la subclase de un anticuerpo puede ser determinada mediante el uso de anticuerpos que son específicos para una clase y subclase particular de anticuerpo. Dichos anticuerpos están disponibles comercialmente. La clase y la subclase puede ser determinada mediante un ELISA, mediante una inmunotransferencia Western así como mediante otras técnicas. Alternativamente, la clase y la subclase puede ser determinada mediante la secuenciación de todos, o de una porción de, los dominios constantes de las cadenas pesada y/o ligera de los anticuerpos, la comparación de sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de varias clases y subclases de inmunoglobulinas y la determinación de la clase y la subclase de los anticuerpos.

Afinidad de unión del anticuerpo anti-receptor Nogo-1 al receptor Nogo-1

[0104] La afinidad de unión y la velocidad de disociación de un anticuerpo anti-receptor Nogo-1 de la divulgación a un polipéptido del receptor Nogo-1 de la divulgación pueden ser determinadas mediante cualquier método conocido en la materia. Por ejemplo, la afinidad de unión puede medirse mediante ELISA, RIA, BIAcore competitivos con la tecnología de KinExA. La velocidad de disociación también puede medirse mediante la tecnología de BIAcore o de KinExA. La afinidad de unión y la velocidad de disociación se miden mediante resonancia de plasmón superficial mediante el uso de, por ejemplo, un BIAcore. Se determinó que la K_d de 7E11 y de 1H2 era de 1×10^{-7} M y de 2×10^{-8} M, respectivamente.

Inhibición de la actividad del receptor Nogo-1 por parte de un anticuerpo anti-receptor Nogo-1

[0105] En algunos casos, un anticuerpo anti-receptor Nogo-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la divulgación inhibe la unión de receptor Nogo-1 a un ligando. La CI_{50} de dicha inhibición puede medirse mediante cualquier método conocido en la materia, por ejemplo, mediante un ELISA, un RIA o un Antagonismo Funcional. En algunos casos, la CI_{50} es de entre 0,1 y 500 nM. En algunos casos, la CI_{50} es de entre 10 y 400 nM. En otros casos más, el anticuerpo o la porción del mismo tiene una CI_{50} de entre 60 nM y 400 nM. Se determinó que la CI_{50} de 7E11 y de 1H2 era de 400 nM y de 60 nM, respectivamente, en un ensayo de unión. Véase también la Tabla 3, más abajo.

[0106] En algunos casos, la presente divulgación también incluye anticuerpos específicos del NgR1 o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados que son antagonistas de la actividad del NgR1. Por ejemplo, la unión de ciertos anticuerpos del NgR1 al NgR1 bloquea la inhibición mediada por el NgR1 de la supervivencia neuronal, del crecimiento de la neurita o de la regeneración axonal de las neuronas del sistema nervioso central (CNS).

[0107] En otros casos, la presente divulgación incluye un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, una variante o un derivado de los mismos, que se une específicamente o preferentemente a al menos un epítipo del NgR1, en el que el epítipo comprende, consiste esencialmente o en, o consiste en, al menos aproximadamente entre cuatro y cinco aminoácidos del ID. SEC. N°: 49, al menos siete, al menos nueve, o entre al menos desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30 aminoácidos del ID. SEC. N°: 49. Los aminoácidos de un epítipo

dado del ID. SEC. N°: 49 según se describen pueden ser, pero no necesitan ser, contiguos o lineales. En ciertos casos, el al menos un epítipo del NgR1 comprende, consiste esencialmente o en, o consiste en, un epítipo no lineal formado por el dominio extracelular del NgR1 como se expresa en la superficie de una célula, o como un fragmento soluble, por ejemplo, condensado con una región Fc de una IgG. Por lo tanto, en ciertos casos, el al menos un epítipo del NgR1 comprende, consiste esencialmente o en, o consiste en, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30, o al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 aminoácidos contiguos o no contiguos del ID. SEC. N°: 49, en el que los aminoácidos no contiguos forman un epítipo a través del plegamiento de la proteína.

10

[0108] En otros casos, la presente divulgación incluye un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, una variante o un derivado de los mismos, que se une específicamente o preferentemente a al menos un epítipo del NgR1, en el que el epítipo comprende, consiste esencialmente o en, o consiste en, además de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más aminoácidos contiguos o no contiguos del ID. SEC. N°: 49 como se ha descrito anteriormente, y puede incluirse una fracción adicional que modifica la proteína, por ejemplo, una fracción de carbohidrato, de forma que el anticuerpo NgR1 se una con una afinidad mayor a una proteína objetivo modificada de lo que lo hace con una versión no modificada de la proteína anticuerpo. Alternativamente, el anticuerpo NgR1 no se une en modo alguno a la versión no modificada de la proteína objetivo.

15

[0109] En ciertos casos, un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, una variante o un derivado de los mismos de la divulgación, se une específicamente a al menos un epítipo del NgR1 o a un fragmento o a una variante descritos anteriormente, es decir, se une a dicho epítipo más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo no relacionado o aleatorio; se une preferentemente a al menos un epítipo del NgR1 o a un fragmento o a una variante descritos anteriormente, es decir, se une a dicho epítipo más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo relacionado, similar, homólogo o análogo; inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia, que por sí mismo se une específicamente o preferentemente a cierto epítipo del NgR1 o a un fragmento o a una variante descritos anteriormente; o se une a al menos un epítipo del NgR1 o a un fragmento o a una variante descritos anteriormente con una afinidad caracterizada por una constante de disociación KD de menos de aproximadamente 5×10^{-2} M, de aproximadamente 10^{-2} M, de aproximadamente 5×10^{-3} M, de aproximadamente 10^{-3} M, de aproximadamente 5×10^{-4} M, de aproximadamente 10^{-4} M, de aproximadamente 5×10^{-5} M, de aproximadamente 10^{-5} M, de aproximadamente 5×10^{-6} M, de aproximadamente 10^{-6} M, de aproximadamente 5×10^{-7} M, de aproximadamente 10^{-7} M, de aproximadamente 5×10^{-8} M, de aproximadamente 10^{-8} M, de aproximadamente 5×10^{-9} M, de aproximadamente 10^{-9} M, de aproximadamente 5×10^{-10} M, de aproximadamente 10^{-10} M, de aproximadamente 5×10^{-11} M, de aproximadamente 10^{-11} M, de aproximadamente 5×10^{-12} M, de aproximadamente 10^{-12} M, de aproximadamente 5×10^{-13} M, de aproximadamente 10^{-13} M, de aproximadamente 5×10^{-14} M, de aproximadamente 10^{-14} M, de aproximadamente 5×10^{-15} M o aproximadamente 10^{-15} M. En un aspecto particular, el anticuerpo o un fragmento del mismo se une preferentemente a un polipéptido NgR1 humano o a un fragmento del mismo, con respecto a un polipéptido NgR1 murino o a un fragmento del mismo.

30

35

[0110] Según se usa en el contexto de las constantes de disociación de la unión de anticuerpos, el término "aproximadamente" considera el grado de variación inherente a los métodos utilizados para la medición de la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, dependiendo del nivel de precisión del instrumento usado, el error estándar basado en el número de muestras medidas y el error por redondeo, el término "aproximadamente 10^{-2} M" podría incluir, por ejemplo, desde 0,05 M hasta 0,005 M.

40

[0111] En casos específicos, un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, una variante o un derivado de los mismos de la divulgación se une a los polipéptidos del NgR1 o a fragmentos o variantes de los mismos, con una velocidad de disociación (k(off)) menor o igual a $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, a 10^{-2} s^{-1} , a $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o a 10^{-3} s^{-1} . Alternativamente, un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, una variante o un derivado de los mismos de la divulgación se une a los polipéptidos del NgR1 o a fragmentos o variantes de los mismos con una velocidad de disociación (k(off)) menor o igual a $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, a 10^{-4} s^{-1} , a $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, o a 10^{-5} s^{-1} a $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, a 10^{-6} s^{-1} , a $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ o a 10^{-7} s^{-1} .

50

[0112] En otros casos, un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, una variante o un derivado de los mismos de la divulgación se une a los polipéptidos del NgR1 o a fragmentos o variantes de los mismos con una velocidad de asociación (k(on)) mayor o igual a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o a $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Alternativamente, un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, una variante o un derivado de los mismos de la divulgación se une a los polipéptidos del NgR1 o a fragmentos o variantes de los mismos con una velocidad de asociación (k(on)) mayor o igual a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o a $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o a $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

55

[0113] En un caso, un antagonista NgR1 para su uso en los métodos de la divulgación es una molécula de

60

anticuerpo, o un fragmento inmuno-específico de la misma. Salvo que se indique específicamente, según se usa en el presente documento, un "fragmento del mismo" en referencia a un anticuerpo se refiere a un fragmento inmuno-específico, es decir, a un fragmento específico del antígeno. En un caso, un anticuerpo de la divulgación es una molécula de unión biespecífica, un polipéptido de unión o un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico, un minicuerpo, un anticuerpo con el dominio deleciónado o una proteína de fusión que tiene una especificidad de unión por más de un epítipo, por ejemplo, por más de un antígeno o por más de un epítipo del mismo antígeno. En un caso, un anticuerpo biespecífico tiene al menos un dominio de unión específico por al menos un epítipo del NgR1. Un anticuerpo biespecífico puede ser un anticuerpo tetravalente que tiene dos dominios de unión al objetivo específicos para un epítipo del NgR1 y dos dominios de unión al objetivo específicos para un segundo objetivo. Por lo tanto, un anticuerpo tetravalente biespecífico puede ser bivalente para cada especificidad.

[0114] Ciertos casos de la presente divulgación comprenden la administración de un anticuerpo antagonista del NgR1, o de un fragmento inmuno-específico del mismo, en el que al menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante ha sido deleciónada o alterada de otro modo para proporcionar unas características bioquímicas deseadas tales como unas funciones efectoras reducidas, la capacidad de dimerizar no covalentemente, un aumento en la capacidad para localizar el sitio de un tumor, una semivida sérica reducida o una semivida sérica aumentada cuando se compara con un anticuerpo completo inalterado de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, ciertos anticuerpos para su uso en los métodos de tratamiento descritos el presente documento son anticuerpos con un dominio deleciónado que comprenden una cadena polipeptídica similar a la cadena pesada de una inmunoglobulina, pero que carecen al menos de una porción de uno o más dominios de la cadena pesada. Por ejemplo, en ciertos anticuerpos se deleciónará un dominio completo de la región constante del anticuerpo modificado, por ejemplo, se deleciónará todo o parte del dominio CH2.

[0115] En ciertos anticuerpos antagonistas del NgR1 o fragmentos inmuno-específicos de los mismos para su uso en los métodos terapéuticos descritos el presente documento, la porción Fc puede ser mutada para alterar, por ejemplo, aumentar, disminuir o modular la función efectora mediante el uso de técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, la deleción o la inactivación (a través de mutaciones puntuales o de otros medios) de un dominio de la región constante puede reducir o alterar la unión al receptor del Fc del anticuerpo modificado en circulación, aumentando así la localización del tumor. En otros casos puede ser que las modificaciones de una región constante coherentes con la actual invención moderen la unión al complemento, y por lo tanto reduzcan la semivida sérica y la asociación no específica de una citotoxicidad conjugada. Otras modificaciones más de la región constante pueden usarse para modificar los enlaces de disulfuro o las fracciones de oligosacárido que permiten mejorar la localización debido al aumento en la especificidad del antígeno o en la flexibilidad del anticuerpo. El perfil fisiológico, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos resultantes de las modificaciones, tales como la localización del tumor, la biodistribución y la semivida sérica, pueden medirse y cuantificarse fácilmente mediante el uso de técnicas inmunológicas bien conocidas sin una experimentación excesiva.

[0116] Las formas modificadas de los anticuerpos o de los fragmentos inmuno-específicos de los mismos para su uso en los métodos diagnósticos y terapéuticos divulgados en el presente documento pueden crearse a partir de un precursor completo o de anticuerpos parentales mediante el uso de técnicas conocidas en la materia. Algunos ejemplos de técnicas se analizan con más detalle en el presente documento.

[0117] En ciertos casos, las regiones variable y constante de los anticuerpos antagonistas del NgR1 o de fragmentos inmuno-específicos de los mismos para su uso en los métodos de tratamiento divulgados en el presente documento, son totalmente humanas. Los anticuerpos totalmente humanos pueden crearse mediante el uso de técnicas que son conocidas en la materia y según se describe en el presente documento. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos totalmente humanos contra un antígeno específico mediante la administración del antígeno a un animal transgénico que ha sido modificado para que produzca dichos anticuerpos en respuesta a la exposición al antígeno, pero cuyos *loci* endógenos han sido inactivados. Algunos ejemplos de técnicas que pueden usarse para crear dichos anticuerpos se describen en las patentes de EE.UU.: 6.150.584; 6.458.592; 6.420.140. Otras técnicas son conocidas en la materia. Asimismo, los anticuerpos totalmente humanos pueden ser producidos mediante diversas tecnologías de expresión, por ejemplo, expresión en fago o en otros sistemas de expresión víricos, según se describe con más detalle en otra parte del presente documento.

[0118] Los anticuerpos antagonistas del NgR1 o los fragmentos inmuno-específicos de los mismos para su uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento divulgados en el presente documento pueden crearse o elaborarse mediante el uso de técnicas que son conocidas en la materia. En ciertos casos, las moléculas de anticuerpo o un fragmento de las mismas son "producidas recombinantemente", es decir, son producidas mediante el uso de la tecnología de ADN recombinante. Algunos ejemplos de técnicas para la elaboración de moléculas de anticuerpo o de fragmentos de las mismas se analizan con más detalle en otra parte del presente documento.

[0119] Los anticuerpos antagonistas del NgR1 o los fragmentos inmuno-específicos de los mismos para su uso en los métodos de tratamiento divulgados en el presente documento incluyen derivados que están modificados, por ejemplo, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula con el anticuerpo, de forma que la unión covalente no impida que el anticuerpo se una específicamente a su epítipo análogo. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, PEGilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante cualquier grupo protector / bloqueante conocido, escisión proteolítica, unión a un ligando celular o a otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede ser llevada a cabo mediante técnicas conocidas que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

[0120] En los casos preferidos, un anticuerpo antagonista del NgR1 o un fragmento inmuno-específico del mismo para su uso en los métodos de tratamiento divulgados en el presente documento no desencadenará una respuesta inmunitaria perjudicial en el animal que se va a tratar, por ejemplo, en un ser humano. En un caso, los anticuerpos antagonistas del NgR1 o los fragmentos inmuno-específicos de los mismos para su uso en los métodos de tratamiento divulgados en el presente documento pueden estar modificados para reducir su inmunogenicidad mediante el uso de técnicas reconocidas en la materia. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser humanizados, primatizados, desinmunizados, o pueden crearse anticuerpos quiméricos. Estos tipos de anticuerpos son derivados de un anticuerpo no humano, normalmente un anticuerpo murino o de primate, que conserva o conserva sustancialmente las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo parental, pero que es menos inmunógeno en los seres humanos. Esto puede conseguirse mediante diversos métodos que incluyen (a) el injerto de dominios variables completos no humanos en regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos; (b) el injerto de al menos una parte de una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas en un marco humano, y las regiones constantes con o sin la retención de los residuos en marco críticos; o (c) el trasplante de los dominios variables no humanos completos, pero "disfrazándolos" con una sección similar a la humana mediante la sustitución de los residuos superficiales. Dichos métodos se divulgan en Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851 - 6855 (1984); Morrison y col., Adv. Immunol. 44: 65 - 92 (1988); Verhoeven y col., Science 239: 1534 - 1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28: 489 - 498 (1991); Padlan, Molec. Immun. 31: 169 - 217 (1994) y en las Patentes de EE.UU. N° 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 6.190.370.

[0121] También puede usarse una desinmunización para reducir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Según se usa en el presente documento, el término "desinmunización" incluye la alteración de un anticuerpo para modificar los epítopos de los linfocitos T (véanse, por ejemplo, el documento WO9852976A1, el documento WO0034317A2). Por ejemplo, se analizan las secuencias VH y VL del anticuerpo de partida y un "mapa" de los epítopos de los linfocitos T humanos de cada región V que muestra la localización de los epítopos con respecto a las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y otros residuos clave de la secuencia. Los epítopos individuales de los linfocitos T del mapa de epítopos de los linfocitos T se analizan con objeto de identificar sustituciones de aminoácidos alternativas con un bajo riesgo de alteración de la actividad del anticuerpo final. Se designa un intervalo de secuencias alternativas de VH y VL que comprende combinaciones de situaciones de aminoácidos, y posteriormente se incorporan estas secuencias en un intervalo de polipéptidos de unión, por ejemplo, en los anticuerpos antagonistas del NgR1 o en fragmentos inmuno-específicos de los mismos para su uso en los métodos diagnósticos y de tratamiento divulgados en el presente documento, que a continuación se ensayan para comprobar su función. Normalmente, se generan y se ensayan entre 12 y 24 anticuerpos variantes. Después se clonan los genes completos de la cadena pesada y ligera que comprenden las regiones V modificadas y C humanas en vectores de expresión, y los subsiguientes plásmidos se introducen en líneas celulares para la producción del anticuerpo completo. Después los anticuerpos se comparan en ensayos bioquímicos y biológicos apropiados y se identifica la variante óptima.

[0122] Los anticuerpos antagonistas del NgR1 o los fragmentos de los mismos para su uso en los métodos de la presente divulgación pueden ser generados mediante cualquier método adecuado conocido en la materia. Los anticuerpos policlonales pueden ser producidos mediante diversos procedimientos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, puede administrarse un fragmento inmuno-específico del NgR1 a varios animales hospedadores que incluyen, pero no se limitan a, conejos, ratones, ratas, etc. para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales específicos para el antígeno. Pueden usarse diversos coadyuvantes para aumentar la respuesta inmunitaria, dependiendo de la especie hospedadora, e incluyen, pero no se limitan a, Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y coadyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guérin) y *Corynebacterium parvum*. Dichos coadyuvantes también son bien conocidos en la materia.

[0123] Los anticuerpos monoclonales pueden ser preparados mediante el uso de una gran diversidad de técnicas conocidas en la materia que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinante y expresión en fago, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos mediante el uso de técnicas de hibridoma que incluyen las conocidas en la materia y las enseñadas, por ejemplo, en Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988); Hammerling y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N. Y., 563 - 681 (1981). El término "anticuerpo monoclonal" según se usa en el presente documento no está limitado a los anticuerpos producidos a través de la tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no al método por el cual es producido. Por lo tanto, el término "anticuerpo monoclonal" no está limitado a los anticuerpos producidos a través de la tecnología de hibridoma. Los anticuerpos monoclonales pueden ser preparados mediante el uso de una gran diversidad de técnicas conocidas en la materia que incluyen el uso de la tecnología de hibridoma y recombinante y de expresión en fago.

[0124] Mediante el uso de protocolos reconocidos en la técnica, en un ejemplo se crean anticuerpos en mamíferos mediante múltiples inyecciones cutáneas o intraperitoneales del antígeno pertinente (por ejemplo, antígenos NgR1 purificados o células o extractos celulares que comprenden dichos antígenos) y un coadyuvante. Esta inmunización desencadena normalmente una respuesta inmunitaria que comprende la producción de anticuerpos reactivos al antígeno a partir de esplenocitos o de linfocitos activados. Aunque los anticuerpos resultantes pueden recogerse a partir del suero del animal para proporcionar preparaciones policlonales, a menudo es deseable aislar los linfocitos individuales del bazo, de los nódulos linfáticos o de la sangre periférica para proporcionar unas preparaciones homogéneas de los anticuerpos monoclonales (MAbs). Preferiblemente, los linfocitos se obtienen a partir del bazo.

[0125] En este bien conocido proceso (Kohler y col., *Nature* 256: 495 (1975)) los linfocitos de vida relativamente corta, o mortales, procedentes de un mamífero al que se le ha inyectado un antígeno, son condensados con una línea celular tumoral inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma), produciendo así células híbridas o "hibridomas" que son tanto inmortales como capaces de producir el anticuerpo codificado genéticamente por el linfocito B. Los híbridos resultantes son agregados en cepas genéticas individuales mediante la selección, la dilución y el crecimiento de nuevo de cada cepa individual que comprende los genes específicos para la formación de un anticuerpo individual. Producen anticuerpos que son homogéneos frente a un antígeno deseado, y con respecto a su ascendencia genética pura, se denominan "monoclonales".

[0126] Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales sin condensar. Los expertos en la materia apreciarán que los reactivos, las líneas celulares y los medios para la formación, la selección y el cultivo de hibridomas están disponibles en el mercado en diversas fuentes y los protocolos estandarizados están bien establecidos. Generalmente, el medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se ensaya para comprobar la producción de los anticuerpos monoclonales contra el antígeno deseado. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante ensayos *in vitro* tales como una inmunoprecipitación, un radioinmunoensayo (RIA) o una inmunoabsorción enzimática (ELISA). Después de identificar las células de hibridoma que producen los anticuerpos con la especificidad, la afinidad y/o la actividad deseada, los clones pueden ser subclonados mediante procedimientos de dilución limitante, y cultivados mediante los métodos habituales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, págs. 59 - 103 (1986)). Se apreciará además que los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden separarse del medio de cultivo, del líquido de ascitis o del suero, mediante procedimientos de purificación convencionales tales como, por ejemplo, proteína-A, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

[0127] Los fragmentos de anticuerpos que reconocen epítomos específicos pueden ser generados mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ pueden ser producidos mediante la escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulinas, mediante el uso de 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 la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

[0128] Los expertos en la materia también apreciarán que el ADN que codifica para los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, sitios de unión al antígeno) también puede derivar de bibliotecas de fagos de anticuerpos. En un particular, dicho fago puede ser utilizado para expresar los dominios de unión al antígeno expresados a partir de un repertorio o de una biblioteca de anticuerpos combinatoria (por ejemplo, humana o

murina). El fago que expresa un dominio de unión al antígeno que se une al antígeno de interés puede ser seleccionado o identificado con un antígeno, por ejemplo, mediante el uso de un antígeno marcado o de un antígeno unido o capturado en una superficie sólida o una microesfera. El fago usado en estos métodos es normalmente un fago filamentoso que incluye los dominios de unión fd y M13 expresados a partir del fago con los dominios del anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizado con disulfuro fusionado recombinantemente con la proteína del gen III o del gen VIII del fago. Algunos ejemplos de métodos se establecen, por ejemplo, en el documento EP 368 684 B1; en la patente de EE.UU. 5.969.108, Hoogenboom, H. R. y en Chames, Immunol. Today 21: 371 (2000); en Nagy y col. Nat. Med. 8: 801 (2002); en Huie y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98: 2682 (2001); en Lui y col., J. Mol. Biol. 315: 1063 (2002). Numerosas publicaciones (por ejemplo, Marks y col., Bio/Technology 10: 779 - 783 (1992)) han descrito la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad mediante transposiciones de cadena, así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo*, como una estrategia para la construcción de grandes bibliotecas de fagos. En otro caso, puede usarse la expresión en ribosomas para sustituir al fago como plataforma de expresión (véanse, por ejemplo, Hanes y col., Nat. Biotechnol. 18: 1287 (2000); Wilson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98: 3750 (2001); o Irving y col., J. Immunol. Methods 248: 31 (2001)). En otro caso más, las bibliotecas de superficies celulares pueden ser cribadas para buscar anticuerpos (Boder y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97: 10701 (2000); Daugherty y col., J. Immunol. Methods 243: 211 (2000)). Dichos procedimientos proporcionan alternativas a las técnicas tradicionales de hibridoma para el aislamiento y la subsiguiente clonación de anticuerpos monoclonales.

[0129] En los métodos de expresión en fago, los dominios de anticuerpos funcionales son expresados en la superficie de las partículas del fago que portan las secuencias de polinucleótidos que codifican para los mismos. En particular, las secuencias ADN que codifican para las regiones VH y VL son amplificadas a partir de bibliotecas de ADNc animal (por ejemplo, bibliotecas de ADNc humanas o murinas de tejidos linfoides) o bibliotecas de ADNc sintético. En ciertos casos, los ADN que codifican para las regiones VH y VL son unidos entre sí por un conector scFv mediante una PCR y clonados en un vector fagémido (por ejemplo, p CANTAB 6 o pComb 3 HSS). El vector es electroporado en *E. coli* y la *E. coli* es infectada con un fago colaborador. El fago usado en estos métodos es normalmente un fago filamentoso que incluye fd y M13 y las regiones VH o VL normalmente se fusionan recombinantemente con el gen III o el gen VIII del fago. El fago que expresa un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno de interés (es decir, un polipéptido NgR1 o un fragmento del mismo) puede ser seleccionado o identificado con un antígeno, por ejemplo, mediante el uso de un antígeno marcado o de un antígeno unido o capturado en una superficie sólida o una microesfera.

[0130] Algunos ejemplos adicionales de los métodos de expresión en fago que pueden usarse para la creación de los anticuerpos incluyen los divulgados en Brinkman y col., J. Immunol. Methods 182: 41 - 50 (1995); en Ames y col., J. Immunol. Methods 184: 177 - 186 (1995); en Kettleborough y col., Eur. J. Immunol. 24: 952 - 958 (1994); en Persic y col., Gene 187: 9 - 18 (1997); en Burton y col., Advances in Immunology 57: 191 - 280 (1994); en la Solicitud PCT N° PCT/GB91/01134; en las publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y en las Patentes de EE.UU. 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.

[0131] Según se describe en las referencias anteriores, después de la selección del fago, las regiones codificantes del anticuerpo pueden aislarse a partir del fago y usarse para la generación de anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado y expresarse en cualquier hospedador deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias. Por ejemplo, también pueden emplearse técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ mediante el uso de métodos conocidos en la materia tales como los divulgados en la publicación PCT WO 92/22324; en Mullinax y col., BioTechniques 12 (6): 864 - 869 (1992); y en Sawai y col., AJRI 34: 26 - 34 (1995); y en Better y col., Science 240: 1041 - 1043 (1988).

[0132] Algunos ejemplos de técnicas que se pueden usar para la producción de Fv y anticuerpos de cadena única incluyen las descritas en las Patentes de EE.UU. N° 4.946.778 y 5.258.498; en Huston y col., Methods in Enzymology 203: 46 - 88 (1991); en Shu y col., PNAS 90: 7995 - 7999 (1993); y en Skerra y col., Science 240: 1038 - 1040 (1988). Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en seres y en ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible el uso de anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo derivan de especies animales diferentes, tales como los anticuerpos tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de una inmunoglobulina humana. Los métodos para la producción de anticuerpos quiméricos son conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Morrison, Science 229: 1202 (1985); Oi y col., BioTechniques 4: 214 (1986); Gillies y col., J. Immunol. Methods 125: 191 - 202 (1989); las Patentes de EE.UU. N° 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos procedentes de anticuerpos de especies no humanas que

se unen al antígeno deseado que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones en marco de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los residuos en marco de las regiones en marco humanas serán sustituidos por el correspondiente al residuo de la CDR del anticuerpo donante para alterar, preferiblemente para mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones del marco son identificadas mediante métodos bien conocidos en la materia, por ejemplo, mediante el modelado de las interacciones entre la CDR y los residuos en marco para identificar los residuos en marco importantes para la unión al antígeno, y la comparación de las secuencias para la identificación de los residuos en marco no habituales en unas posiciones en particular. (Véase, por ejemplo, Queen y col., Patente de EE.UU. Nº 5.585.089; Riechmann y col., Nature 332: 323 (1988)). Los anticuerpos pueden ser humanizados mediante el uso de una diversidad de técnicas conocidas en la materia que incluyen, por ejemplo, el injerto de una CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; Patentes de EE.UU. Nº 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), activación o reparación superficial (documento EP 592.106; documento EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28 (4/5): 489 - 498 (1991); Studnicka y col., Protein Engineering 7 (6): 805 - 814 (1994); Roguska. y col., PNAS 91: 969 - 973 (1994)) y transposición de cadena (Patente de EE.UU. Nº 5.565.332).

[0133] Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. los anticuerpos humanos pueden ser creados mediante una variedad de los métodos conocidos en la materia, que incluye los métodos de expresión in fago descritos anteriormente mediante el uso de librerías de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulinas humanas. Véanse también las Patentes de EE.UU. Nº 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741.

[0134] Los anticuerpos humanos también pueden ser producidos mediante el uso de ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulinas humanas. Por ejemplo, pueden introducirse complejos de genes de cadena pesada y de cadena ligera de inmunoglobulinas humanas aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, pueden introducirse la región variable, la región constante y la región de diversidad humana en células madre embrionarias de ratón además que los genes de la cadena pesada y ligera humana. Los genes de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina de ratón pueden hacerse no funcionales por separado o simultáneamente junto con la introducción de los *loci* de la inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, la delección homocigótica de la región JH impide la producción endógena de anticuerpos. Las células madre embrionarias modificadas son expandidas y microinyectadas en blastocitos para producir ratones quiméricos. Después se crean los ratones quiméricos para producir descendientes homocigóticos que expresan los anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos son inmunizados de la forma tradicional con un antígeno seleccionado, por ejemplo, con todo o con una porción de un polipéptido objetivo deseado. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse a partir de los ratones transgénicos inmunizados mediante el uso de la tecnología convencional de hibridoma. Los transgenes de inmunoglobulina humana portados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de los linfocitos B y posteriormente experimentan un cambio de clase y una mutación somática. Por lo tanto, mediante el uso de dicha técnica es posible la producción de anticuerpos de IgG, IgA, IgM y IgE terapéuticamente útiles. Para una revisión de esta tecnología de producción de anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, Int. Rev. Immunol. 13: 65 - 93 (1995). Para un análisis detallado de esta tecnología para la producción de anticuerpos humanos y de anticuerpos monoclonales humanos, y los protocolos para la producción de dichos anticuerpos, véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; las Patentes de EE.UU. Nº 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; y 5.939.598. Además, pueden involucrarse compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) y GenPharm (San Jose, Calif.) para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado mediante el uso de una tecnología similar a la descrita anteriormente.

[0135] Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado pueden ser generados mediante el uso de una técnica denominada "selección guiada". En esta metodología, se usa un anticuerpo monoclonal seleccionado no humano, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers y col., Bio/Technology 12: 899 - 903 (1988)). Véase también la Patente de EE.UU. Nº 5.565.332.

[0136] En otro caso, el ADN que codifica para los anticuerpos monoclonales deseados puede ser fácilmente aislado y secuenciado mediante el uso de procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican para las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma aisladas y subclonadas sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede ser ubicado en vectores de expresión, que después son transfectados en células hospedadoras procariontas o eucariotas tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de

ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producirían inmunoglobulinas. Más particularmente, el ADN aislado (que puede ser sintético, según se describe en el presente documento) puede usarse para clonar secuencias de las regiones constante y variable para la elaboración de anticuerpos según se describe en Newman y col., Patente de EE.UU. Nº 5.658.570, presentada el 25 de enero de 1995. Esencialmente, esto implica la extracción del ARN a partir de las células seleccionadas, su conversión en ADNc y su amplificación mediante una PCR mediante el uso de cebadores específicos para la Ig. Algunos cebadores adecuados para este fin también se describen en la Patente de EE.UU. Nº 5.658.570. Como se analizará con más detalle a continuación, las células transformadas que expresan el anticuerpo deseado pueden cultivarse en cantidades relativamente grandes para proporcionar suministros clínicos y comerciales de la inmunoglobulina.

[0137] En un caso específico, la secuencia de aminoácidos de los dominios variables de la cadena pesada y/o ligera puede ser inspeccionada para identificar las secuencias de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) mediante métodos que son bien conocidos en la materia, por ejemplo, mediante la comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de la cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de la secuencia. Mediante el uso de técnicas rutinarias de ADN recombinante pueden insertarse una o más de las CDR en regiones en marco, por ejemplo, en regiones en marco humanas, para humanizar un anticuerpo no humano. Las regiones en marco pueden ser regiones en marco naturales o consenso y preferiblemente regiones en marco humanas (véase, por ejemplo, Chotia y col., J. Mol. Biol. 278: 457 - 479 (1998) para una lista de regiones en marco humanas). Preferiblemente, el polinucleótido generado mediante la combinación de las regiones en marco y las CDR codifica para un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de un polipéptido deseado, por ejemplo, el NgR1. Preferiblemente, pueden realizarse una o más sustituciones de aminoácidos en las regiones en marco, y, preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión del anticuerpo a su antígeno. Adicionalmente, dichos métodos pueden usarse para realizar sustituciones o deleciones de aminoácidos de uno o más residuos de cisteína de la región variable que participan en el puente de disulfuro intracatenario para generar moléculas de anticuerpos que carecen de uno o más puentes de disulfuro intracatenarios. Otras alteraciones del polinucleótido están englobadas por la presente divulgación y en la pericia de la técnica.

[0138] Además, para la producción de los "anticuerpo quiméricos" pueden usarse las técnicas desarrolladas (Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851 - 855 (1984); Neuberger y col., Nature 312: 604 - 608 (1984); Takeda y col., Nature 314: 452 - 454 (1985)) mediante el ajuste de genes de una molécula de anticuerpo de ratón con una especificidad de antígeno apropiada junto con los genes de una molécula de un anticuerpo humano con la actividad biológica apropiada. Según se usa en el presente documento, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones derivan de especies animales diferentes, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de una inmunoglobulina humana, por ejemplo, anticuerpos humanizados.

[0139] Alternativamente, pueden adaptarse las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena única (la Patente de EE.UU. Nº 4.694.778; Bird, Science 242: 423 - 442 (1988); Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85: 5879 - 5883 (1988); y Ward y col., Nature 334: 544 - 554 (1989)) para producir anticuerpos de cadena única. Los anticuerpos de cadena única se forman mediante la unión de fragmentos de la cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácidos, dando como resultado un anticuerpo de cadena única. También pueden usarse técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra y col., Science 242: 1039 - 1041 (1988)).

[0140] Los anticuerpos antagonistas del NgR1 también pueden ser anticuerpos humanos o sustancialmente humanos generados en animales transgénicos (por ejemplo, en ratones) que son incapaces de una producción endógena de inmunoglobulina (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nº 6.075.181, 5.939.598, 5.591.669 y 5.589.369). Por ejemplo, se ha descrito que la deleción homocigótica de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado una inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de un conjunto de genes de inmunoglobulina humana a dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Otro medio preferido para la generación de anticuerpos humanos mediante el uso de ratones SCID se divulga en la Patente de EE.UU. Nº 5.811.524 que se incorpora al presente documento como referencia. Se apreciará que el material genético asociado con estos anticuerpos humanos también puede ser aislado y manipulado según se describe en el presente documento.

[0141] Otro medio muy eficiente para la generación de anticuerpos recombinantes se divulga en Newman, Biotechnology 10: 1455 - 1460 (1992). Específicamente, esta técnica da como resultado la generación de anticuerpos primatizados que contienen dominios variables de mono y secuencias constantes humanas. Además,

esta técnica también se describe en las Patentes de titularidad compartida de EE.UU. Nº 5.658.570, 5.693.780 y 5.756.096, cada una de las cuales se incorpora al presente documento como referencia.

[0142] En otro caso pueden seleccionarse linfocitos mediante micromanipulación y aislarse los genes variables. Por ejemplo, pueden aislarse linfocitos mononucleares de sangre periférica a partir de un mamífero inmunizado, y cultivarse durante aproximadamente 7 días *in vitro*. Los cultivos pueden ser cribados para IgG típicas que cumplan los criterios de cribado. Pueden aislarse las células de los pocillos positivos. Los linfocitos B individuales productores de Ig pueden aislarse mediante una FACS o mediante su identificación en un ensayo en placa hemolítica mediado por complemento. Los linfocitos B productores de Ig pueden ser micromanipulados en un tubo, y los genes VH y VL pueden ser amplificados mediante el uso de, por ejemplo, una RT-PCR. Los genes de VH y de VL pueden ser clonados en un vector de expresión de anticuerpo y transfectados en células (por ejemplo, en células eucariotas o procariotas) para su expresión.

[0143] Alternativamente, pueden seleccionarse y cultivarse las líneas celulares productoras del anticuerpo mediante el uso de técnicas bien conocidas por el artesano experto. Dichas técnicas se describen en diversos manuales de laboratorio y en publicaciones primarias. A este respecto, las técnicas adecuadas para su uso en la invención como se describe a continuación se describen en Current Protocols in Immunology, Coligan y col., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley y Sons, Nueva York (1991) que se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad, incluyendo los suplementos.

[0144] Los anticuerpos para su uso en los métodos terapéuticos divulgados en el presente documento pueden ser producidos mediante cualquier método conocido en la materia para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química, o preferiblemente, mediante técnicas de expresión recombinante según se describe en el presente documento.

[0145] Se apreciará además que el ámbito de esta divulgación engloba adicionalmente todos los alelos, variantes y mutaciones de las secuencias de ADN de unión al antígeno.

[0146] Como es bien conocido, el ARN puede aislarse a partir de células de hibridoma originales o a partir de otras células transformadas mediante técnicas convencionales, tales como la extracción y la precipitación con isotiocianato de guanidinio seguido de una centrifugación o una cromatografía. Cuando sea deseable, el ARNm puede aislarse a partir del ARN total mediante técnicas convencionales tales como cromatografía sobre oligo dT celulosa. Las técnicas adecuadas son familiares en la materia.

[0147] En un caso, los ADNc que codifican para la cadena ligera y pesada del anticuerpo pueden crearse, tanto simultáneamente como por separado, mediante el uso de la transcriptasa inversa y la polimerasa de ADN de acuerdo con métodos bien conocidos. Puede iniciarse una PCR con cebadores de la región constante consenso o con cebadores más específicos basados en las secuencias de aminoácidos y del ADN de las cadenas pesada y ligera publicadas. Como se ha analizado anteriormente, también puede usarse una PCR para aislar los clones de ADN que codifican para la cadena ligera y pesada del anticuerpo. En este caso, las bibliotecas pueden cribarse mediante cebadores consenso con sondas homólogas mayores, tales como sondas de región constante de ratón.

[0148] El ADN, normalmente ADN de plásmido, puede ser aislado a partir de las células mediante el uso de técnicas conocidas en la materia, cartografiarse por restricción y ser secuenciado de acuerdo con las técnicas habituales bien conocidas establecidas con detalle, por ejemplo, en las referencias anteriores relativas a las técnicas de ADN recombinante. Por supuesto, el ADN puede ser sintético en cualquier punto durante el proceso de aislamiento o el análisis posterior.

[0149] La expresión recombinante de un anticuerpo, o de un fragmento, derivado o análogo del mismo, por ejemplo, de una cadena pesada y ligera de un anticuerpo que es un antagonista NgR1, requiere la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica para el anticuerpo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica para una molécula de anticuerpo o una cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de los mismos (preferiblemente el dominio variable de la cadena pesada y ligera), de la divulgación, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede ser producido mediante la tecnología de ADN recombinante mediante el uso de técnicas bien conocidas en la materia. Por lo tanto, en el presente documento se describen métodos para la preparación de una proteína mediante la expresión de un polinucleótido que contiene un anticuerpo que codifica para una secuencia de nucleótidos. Pueden usarse métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia para la construcción de los vectores de expresión que contienen las secuencias que codifican para el anticuerpo y las apropiadas señales de control de la transcripción y de la traducción. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, una recombinación genética *in vivo*. La

divulgación proporciona por tanto vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica para una molécula de anticuerpo de la divulgación, o una cadena pesada y ligera de la misma, o un dominio variable de la cadena pesada y ligera, unido operativamente a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica para la región constante de la molécula de anticuerpo (véanse, por ejemplo, la Publicación 5 PCT WO 86/05807; la Publicación PCT WO 89/01036; y la Patente de EE.UU. Nº 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede ser clonado en dicho vector para la expresión de la totalidad de la cadena pesada y ligera.

[0150] El vector de expresión es transferido a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales, y las células transfectadas se cultivan después mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo para su 10 uso en los métodos descritos en el presente documento. Por lo tanto, la divulgación incluye células hospedadoras que contienen un polinucleótido que codifica para un anticuerpo de la divulgación, o una cadena pesada y ligera del mismo, unido operativamente a un promotor heterólogo. En un caso preferido, para la expresión de anticuerpos bícatenarios, pueden expresarse conjuntamente los vectores que codifican para ambas cadenas pesada y ligera en la célula hospedadora para la expresión de la totalidad de la molécula de inmunoglobulina, según se detalla a 15 continuación.

[0151] Puede utilizarse una variedad de sistemas de hospedador-vector de expresión para expresar las moléculas de anticuerpo para su uso en los métodos descritos en el presente documento. Dichos sistemas de 20 hospedador-vector de expresión representan los vehículos mediante los cuales pueden producirse y posteriormente purificarse las secuencias codificantes de interés, pero también representan las células que pueden expresar, cuando son transformadas o transfectadas con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, una molécula de anticuerpo de la divulgación *in situ*. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformados con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o ADN de cósmido que contienen las secuencias que codifican para el anticuerpo; levadura (por 25 ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen las secuencias que codifican para el anticuerpo; sistemas celulares de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias que codifican para el anticuerpo; sistemas celulares vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión transformados de 30 plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen las secuencias que codifican para el anticuerpo; o sistemas celulares de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BLK, 293, 3T3) portadores de constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de las células de mamífero (por ejemplo, el promotor de la metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor del virus de la varíola vacuna 7.5K). Preferiblemente, se usan células bacterianas tales como *Escherichia coli* y más preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de la totalidad de una molécula de 35 anticuerpo recombinante, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el principal elemento promotor del gen temprano intermedio del citomegalovirus humano, son un eficaz sistema de expresión de anticuerpos (Foelking y col., Gene 45: 101 (1986); Cockett y col., Biotechnology 8: 2 (1990)). 40

[0152] En los sistemas bacterianos pueden seleccionarse ventajosamente diversos vectores de expresión dependiendo del uso previsto de la molécula de anticuerpo que se va a expresar. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de altos niveles de los productos de la 45 proteína de fusión que sean fácilmente purificables. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther y col., EMBO J. 2: 1791 (1983)), en el que la secuencia codificante del anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en marco con la región codificante lacZ de forma que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13: 3101 - 3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24: 5503 - 5509 (1989)); y similares. También pueden usarse vectores pGEX para 50 expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con S-transferasa de glutatión (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de las células lisadas mediante la adsorción y la unión a una matriz de microesferas de glutatión-agarosa, seguido de una elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para que incluyan los sitios de escisión de la proteasa de trombina o del factor Xa, de forma que el producto del gen objetivo clonado pueda ser liberado a partir de la fracción de GST. 55

[0153] En un sistema de insecto normalmente se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para la expresión de genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo puede ser clonada individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el 60 promotor de la polihedrina).

[0154] En las células hospedadoras de mamífero pueden utilizarse diversos sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se use un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante del anticuerpo de interés puede ligarse a un complejo de control de la transcripción / traducción del adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede insertarse después en el genoma del adenovirus mediante una recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en un hospedador infectado (véase, por ejemplo, Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81: 355 - 359 (1984)). También pueden ser necesarias unas señales de inicio específicas para una traducción eficiente de las secuencias codificantes del anticuerpo. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y las secuencias adyacentes. Adicionalmente, el codón de inicio debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción de la totalidad del inserto. Estas señales de control exógenas de la traducción y los codones de inicio pueden tener orígenes diversos, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase Bittner y col., Methods in Enzymol. 153: 51 - 544 (1987)).

[0155] Además, puede elegirse una cepa de la célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas, o para que modifique y procese el producto génico de la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y el procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento post-traducciona l y la modificación de las proteínas y de los productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína foránea expresada. A este respecto, pueden usarse células hospedadoras eucariotas, que poseen la maquinaria celular para el apropiado procesamiento del transcrito primario, la glucosilación y la fosforilación del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamífero incluyen, pero no se limitan a, CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38 y en particular, líneas celulares de cáncer de mama tales como, por ejemplo, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D y líneas celulares de glándula mamaria normal tales como, por ejemplo, CRL7030 y Hs578Bst.

[0156] Para la producción a largo plazo y de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere una expresión estable. Por ejemplo, pueden modificarse líneas celulares que expresan de forma estable la molécula de anticuerpo. En lugar de mediante el uso de vectores de expresión que contienen orígenes víricos de replicación, las células hospedadoras pueden ser transformadas con un ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, secuencias potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN foráneo, las células modificadas pueden dejarse crecer durante 1 - 2 días en un medio enriquecido y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable del plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden ser clonados y expandidos en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para modificar líneas celulares que expresan de forma estable la molécula de anticuerpo.

[0157] Pueden usarse diversos sistemas de selección, que incluyen pero no se limitan a, los genes de la cinasa de timidina del virus herpes simplex (Wigler y col., Cell 11: 223 (1977)), de la fosforribosiltransferasa de hipoxantina-guanina (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 48: 202 (1992)) y de la fosforribosiltransferasa de adenina (Lowy y col., Cell 22: 817 1980) en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. También puede usarse una resistencia antimetabolito como la base de la selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77: 357 (1980); O'Hare y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 78: 1527 (1981)); *gpt*, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 78: 2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 Clinical Pharmacy 12: 488 - 505; Wu y Wu, Biotherapy 3: 87 - 95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573 - 596 (1993); Mulligan, Science 260: 926 - 932 (1993); y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62: 191 - 217 (1993); TIB TECH 11 (5): 155 - 215 (May, 1993); e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre y col., Gene 30: 147 (1984)). Los métodos habitualmente conocidos en la materia de la tecnología del ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel y col. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegl er, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli y col. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin y col., J. Mol. Biol. 150: 1 (1981).

[0158] Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse mediante la amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the

expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, Nueva York, Vol. 3. (1987)). Cuando un marcador del sistema de vector que expresa un anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula hospedadora aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse y col., Mol. Cell. Biol. 3: 257 (1983)).

[0159] La célula hospedadora puede ser transfectada conjuntamente con dos vectores de expresión de la divulgación, codificando el primer vector para un polipéptido derivado de una cadena pesada, y codificando el segundo vector para un polipéptido derivado de una cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permitan una expresión igualitaria de los polipéptidos de la cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifique para ambos polipéptidos de las cadenas pesada y ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera se coloca ventajosamente antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, Nature 322: 52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77: 2197 (1980)). Las secuencias codificantes de las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

[0160] Una vez que una molécula de anticuerpo de la divulgación ha sido expresada recombinantemente, puede ser purificada mediante cualquier método conocido en la materia para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante una cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, particularmente mediante la afinidad por el antígeno específico de la Proteína A, y una cromatografía en columna de exclusión por tamaños), una centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica habitual para la purificación de proteínas. Alternativamente, un método preferido para aumentar la afinidad de los anticuerpos de la divulgación se divulga en el documento US 2002 0123057 A1.

[0161] En un caso, una molécula de unión o una molécula de unión al antígeno para su uso en los métodos de la divulgación comprende una región constante sintética en la que uno o más dominios han sido parcial o totalmente deleccionados ("anticuerpos de dominios deleccionados"). En ciertos casos, los anticuerpos modificados compatibles comprenderán constructos con los dominios deleccionados o variantes en las que se ha eliminado la totalidad del dominio CH2 (constructos ΔCH_2). Para otros casos puede sustituirse un péptido de conexión corto por el dominio deleccionado para proporcionar flexibilidad y libertad de movimiento a la región variable. Los expertos en la materia apreciarán que dichos constructos son particularmente preferidos debido a las propiedades reguladoras del dominio CH2 sobre la tasa catabólica del anticuerpo.

[0162] En ciertos casos, los anticuerpos modificados para su uso en los métodos divulgados en el presente documento son minicuerpos. Los minicuerpos pueden ser elaborados mediante el uso de los métodos descritos en la materia (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.837.821 o el documento WO 94/09817A1).

[0163] En otro caso, los anticuerpos modificados para su uso en los métodos divulgados en el presente documento son anticuerpos con el dominio CH2 deleccionado que son conocidos en la materia. Los constructos y el dominio deleccionado pueden derivarse mediante el uso de un vector (por ejemplo, de Biogen IDEC Incorporated) que codifica para el dominio constante de una IgG1 humana (véase, por ejemplo, el documento WO 02/060955A2 y el documento WO 02/096948A2). Este vector ejemplar fue diseñado para deleccionar el dominio CH2 y proporcionar un vector sintético que expresa una región constante de la IgG1 con el dominio deleccionado.

[0164] En un caso, un anticuerpo antagonista del NgR1 o un fragmento del mismo para su uso en los métodos de tratamiento divulgados en el presente documento comprende una cadena pesada de una inmunoglobulina que tiene una delección o una sustitución de unos pocos o incluso de un único aminoácido, siempre que permita la asociación entre las subunidades monoméricas. Por ejemplo, la mutación de un único aminoácido en las áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión del Fc y aumentar así la localización del tumor. De forma análoga, puede ser deseable simplemente deleccionar aquella parte de uno o más dominios de la región constante que controla la función efectora (por ejemplo, la unión al complemento) que se va a modular. Dichas delecciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar unas características seleccionadas del anticuerpo (semivida sérica) conservando otras funciones deseables asociadas con el dominio intacto de la actual región constante. Además, como se ha indicado anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos divulgados pueden ser sintéticas a través de la mutación o la sustitución de uno o más aminoácidos que mejora el perfil del constructo resultante. A este respecto, puede ser posible desestabilizar la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, la unión al Fc) conservando sustancialmente la configuración y el perfil inmunógeno del anticuerpo modificado. Otras características más comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para mejorar las características deseables tales como la función efectora, o proporcionar más unión a citotoxinas o a carbohidratos. En dichos casos puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas

derivadas de los dominios de la región constante seleccionados.

[0165] La presente divulgación también proporciona el uso de anticuerpos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, variantes (incluyendo derivados) de moléculas de anticuerpos (por ejemplo, las regiones VH y/o las regiones VL) descritas en el presente documento, anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido NgR1. Pueden usarse las técnicas habituales conocidas por los expertos en la materia para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica para una molécula de unión, que incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR, que dan como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, las variantes (incluyendo derivados) codifican para menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 aminoácidos con respecto a la región VH de referencia, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, la región VL, VLCDR1, VLCDR2 o VLCDR3. Una "sustitución conservativa de un aminoácido" es aquella en la que el residuo de aminoácido es sustituido por un residuo de aminoácido con una cadena lateral con una carga similar. En la materia se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), con cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), con cadenas laterales polares sin carga cadenas (por ejemplo, glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), con cadenas laterales no Polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), con cadenas laterales ramificadas beta en (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y con cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Alternativamente, pueden introducirse aleatoriamente mutaciones a lo largo de toda o de parte de la secuencia codificante, tales como mediante mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes pueden ser cribados para comprobar la actividad biológica para identificar a los mutantes que conservan la actividad.

[0166] Por ejemplo, es posible introducir mutaciones únicamente en las regiones en marco o únicamente en las regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser silenciosas o mutaciones sin sentido neutrales, es decir, que tienen poco o ningún efecto sobre la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones, para mejorar la producción de anticuerpos del hibridoma. Alternativamente, las mutaciones sin sentido no neutrales pueden alterar la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno. La localización de la mayoría de las mutaciones silenciosas y sin sentido neutrales es probable que sea en las regiones en marco, mientras que la localización de la mayoría de las mutaciones sin sentido no neutrales es probable que sea en la CDR, aunque esto no es un requisito imprescindible. El experto en la materia será capaz de diseñar y ensayar moléculas mutantes con las propiedades deseadas, tales como ninguna alteración en la actividad de unión al antígeno o alguna alteración en la actividad de unión (por ejemplo, mejoras en la actividad de unión al antígeno o cambios en la especificidad del anticuerpo). Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede ser expresada de forma rutinaria, y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada puede ser determinada mediante el uso de las técnicas descritas en el presente documento o mediante la modificación rutinaria de las técnicas conocidas en la materia.

[0167] En resumen, el experto en la materia, dadas las enseñanzas de esta divulgación, tiene a su disposición diversos métodos que puede usar para alterar las propiedades biológicas de los anticuerpos de esta divulgación, incluyendo métodos que aumentarían o disminuirían la estabilidad o la semivida, la inmunogenicidad, la toxicidad, la afinidad o el rendimiento de una molécula de anticuerpo dada, o alterarla de cualquier otra forma para hacerla más adecuada para una aplicación en particular.

[0168] A continuación se describen composiciones que comprenden, y los usos de, los anticuerpos de la presente divulgación.

Polipéptidos solubles del receptor Nogo-1

Proteína

[0169] El receptor Nogo-1 completo consiste en una secuencia de señalización, una región N-terminal (NT), ocho repeticiones ricas en leucina (LRR), una región LRRCT (un dominio repetitivo rico en leucina C-terminal de las ocho repeticiones ricas en leucina), una región C-terminal (CT) y un anclaje de GPI (véase la Fig. 1).

[0170] Las denominaciones del dominio NgR usadas en el presente documento se definen como sigue:

Tabla 1. Ejemplos de dominios NgR

Dominio	hNgR (ID. SEC. Nº: 49)	rNgR (ID. SEC. Nº: 50)	mNgR (ID. SEC. Nº: 51)
Secuencia de señalización	1 - 26	1 - 26	1 - 26
LRRNT	27 - 56	27 - 56	27 - 56
LRR1	57 - 81	57 - 81	57 - 81
LRR2	82 - 105	82 - 105	82 - 105
LRR3	106 - 130	106 - 130	106 - 130
LRR4	131 - 154	131 - 154	131 - 154
LRR5	155 - 178	155 - 178	155 - 178
LRR6	179 - 202	179 - 202	179 - 202
LRR7	203 - 226	203 - 226	203 - 226
LRR8	227 - 250	227 - 250	227 - 250
LRRCT	260 - 309	260 - 309	260 - 309
CTS (señalización CT)	310 - 445	310 - 445	310 - 445
GPI	446 - 473	446 - 473	446 - 473

- 5 **[0171]** Algunas formas de realización de la invención proporcionan un polipéptido soluble del receptor Nogo-1. Los polipéptidos solubles del receptor Nogo-1 de la invención comprenden un dominio NT; 8 LRR y un dominio LRRCT, y carecen de una secuencia de señalización y de un anclaje funcional de GPI (es decir, ningún anclaje de GPI ni de GPI que carezca de la capacidad de asociarse eficazmente a una membrana celular).
- 10 **[0172]** En algunos casos, un polipéptido soluble del receptor Nogo-1 comprende una LRR heteróloga. En algunos casos un polipéptido soluble del receptor Nogo-1 comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 LRR heterólogas. Una LRR heteróloga significa una LRR obtenida a partir de una proteína distinta al receptor Nogo-1. Algunos ejemplos de proteínas a partir de las cuales puede obtenerse una LRR heteróloga son el receptor de tipo toll (TLR1.2); la proteína rica en repeticiones de leucina de activación de los linfocitos T; la deceptorina; la OM-gp; la subunidad slit y robo lábil
- 15 ácida de la proteína de unión al factor de crecimiento insulinoide; y el receptor de tipo toll 4.
- [0173]** En algunos casos, la divulgación proporciona un polipéptido soluble del receptor Nogo-1 de 319 aminoácidos (receptor soluble Nogo-1 344, sNogoR1-344 o sNogoR344) (los residuos 26 - 344 de los ID. SEC. Nº: 6 y 8 o los residuos 27 - 344 del ID. SEC. Nº: 8). En algunos casos, la divulgación proporciona un polipéptido soluble
- 20 del receptor Nogo-1 de 285 aminoácidos (receptor soluble Nogo-1 310, sNogoR1-310 o sNogoR310) (los residuos 26 - 310 de los ID. SEC. Nº: 7 y 9 o los residuos 27 - 310 del ID. SEC. Nº: 9). Véase la Fig. 1.

Tabla 1. Secuencias de los polipéptidos del receptor Nogo-1 humano y de rata

ID. SEC. Nº: 6 (1 - 344 humanos)	MKRASAGGSRLLA WVLWLQAWQVAAPCPGACVCYNEPKVTTS CPQQGLQAVPVGIPAASQRIFLHGNRISHVPAASFRACRNLTILWL HSNVLARIDAAAF TGLALLEQLDLSDNAQLRSVDPATFHGLGRLH TLHLDRCLQELGPGLFRGLAALQYLYLQDNALQALPDDTFRDL GNLTHLFLHGNRISSVPERAFRGLHSLDRLLHQN RV AHVHPHAF RDLGRLMTLYLFANNLSALPTEALAPLRALQYLRLNDNPWV CDC RARPLWAWLQKFRGSSSEVPCSLPQRLAGRDLKRLAANDLQ GCA VATGPYHPIWTGRATDEEPLGLPKCCOPDAADKA
ID. SEC. Nº: 7 (1 - 310 humanos)	MKRASAGGSRLLA WVLWLQAWQVAAPCPGACVCYNEPKVTTS CPQQGLQAVPVGIPAASQRIFLHGNRISHVPAASFRACRNLTILWL HSNVLARIDAAAF TGLALLEQLDLSDNAQLRSVDPATFHGLGRLH TLHLDRCLQELGPGLFRGLAALQYLYLQDNALQALPDDTFRDL GNLTHLFLHGNRISSVPERAFRGLHSLDRLLHQN RV AHVHPHAF RDLGRLMTLYLFANNLSALPTEALAPLRALQYLRLNDNPWV CDC RARPLWAWLQKFRGSSSEVPCSLPORLAGRDLKRLAANDLOGCA
ID. SEC. Nº: 8 (1 - 344 de rata)	MKRASSGGSRLPTWVLWLQAWRVATPCPGACVCYNEPKVTTSR PQQGLQAVPAGIPASSQRIFLHGNRISYVPAASFQSCRNLTLWLH SNALAGIDAAAF TGLTLLEQLDLSDNAQLRVVDPTTFRGLGHLHT LHLDRCLQELGPGLFRGLAALQYLYLQDNNLQALPDNTFRDLG NLTHLFLHGNRIPSVPEHA FRGLHSLDRLLHQN HV ARVHPHAFR DLGRLMTLYLFANNLSMLPAEVLVPLRSLQYLRLNDNPWV CDCR ARPLWAWLQKFRGSSSGVPSNLPQRLAGRDLKRLATSDLEGCAV ASGPF RPFOTNOLTDEELLGLPKCCOPDAADKA
ID. SEC. Nº: 9 (1 - 310 de rata)	MKRASSGGSRLPTWVLWLQAWRVATPCPGACVCYNEPKVTTSR PQQGLQAVPAGIPASSQRIFLHGNRISYVPAASFQSCRNLTLWLH SNALAGIDAAAF TGLTLLEQLDLSDNAQLRVVDPTTFRGLGHLHT LHLDRCLQELGPGLFRGLAALQYLYLQDNNLQALPDNTFRDLG NLTHLFLHGNRIPSVPEHA FRGLHSLDRLLHQN HV ARVHPHAFR DLGRLMTLYLFANNLSMLPAEVLVPLRSLQYLRLNDNPWV CDCR ARPLWAWLQKFRGSSSGVPSNLPQRLAGRDLKRLATSDLEGCA
ID. SEC. Nº: 58 (1 - 310 humanos con sustituciones de ala en las posiciones de los aminoácidos 266 y 309)	MKRASAGGSRLLA WVLWLQAWQVAAPCPGACVCYNEPKVTTS CPQQGLQAVPVGIPAASQRIFLHGNRISHVPAASFRACRNLTILWL HSNVLARIDAAAF TGLALLEQLDLSDNAQLRSVDPATFHGLGRLH TLHLDRCLQELGPGLFRGLAALQYLYLQDNALQALPDDTFRDL GNLTHLFLHGNRISSVPERAFRGLHSLDRLLHQN RV AHVHPHAF RDLGRLMTLYLFANNLSALPTEALAPLRALQYLRLNDNPWV CD A RARPLWAWLQKFRGSSSEVPCSLPQRLAGRDLKRLAANDLQ G A A

ID. SEC. Nº: 59 (1 - 310 de rata con sustituciones de ala en las posiciones de los aminoácidos 266 y 309)	MKRASSGGSRLPTWVLWLQAWRVATPCPGACVCYNEPKVTTSR PQQGLQAVPAGIPASSQRIFLHG NRISYVPAASFQSCRNL TILWLH SNALAGIDAAAF TGLT LLEQLDLSDNAQLRVVDPTTFRGLGHLHT LHLDR CGLQELGPGLFRGLAALQYL YLQDN NLQALPDNTFRDLG NLTHLFLHG NRIPSVPEHA FRGLHSLDRLL LHQN HVARVHPHAFR DLGRLMTLYLFANNLSMLPAEVLVPLRSLQYLRLNDNPWVCDAR ARPLWAWLQKFRGSSSGVPSNLPQRLAGRDLKRLATSDLEGAA
ID. SEC. Nº: 64 (1-3 44 humanos con sustituciones de ala en las posiciones de los aminoácidos 266 y 309)	MKRASAGGSRLLA WVLWLQAWQVAAPCPGACVCYNEPKVTTTS CPQQGLQAVPVGIPAA SQRIFLHG NRISHVPAASFACRNLTILWL HSNVLARIDAAAF TGLAL LLEQLDLSDNAQLRSVDPATFHLGRLH TLHLDR CGLQELGPGLFRGLAALQYL YLQDN ALQALPDDTFRDL GNLTHLFLHG NRISSVPERAFRGLHSLDRLL LHQN RVAHVHPHAF RDLGRLMTLYLFANNLSALPTEALAPLRA LQYLRLNDNPWVCDAR RARPLWAWLQKFRGSSSEVP CSLPQRLAGRDLKRLAANDLQGA VATGPYHPIWTGRATDEEPLGLPKCCQPDAA DKA

[0174] En algunas formas de realización de la invención, los polipéptidos solubles del receptor Nogo-1 de la invención se usan para inhibir la unión de un ligando al receptor Nogo-1 y actúan como un antagonista de los ligandos del receptor Nogo-1. En algunas formas de realización de la invención, los polipéptidos solubles del receptor Nogo-1 de la invención se usan para disminuir la inhibición del crecimiento de la neurita y de la germinación en una neurona, tal como el crecimiento axonal y la inhibición mediada por la mielina del colapso del cono de crecimiento en una neurona. En algunas formas de realización, la neurona es una neurona del CNS.

[0175] Los sNogoR310 y sNogoR344, sorprendentemente, bloquean la unión de NogoA, de NogoB, de NogoC, de MAG y de OM-gp al receptor Nogo-1.

[0176] En otros casos, la presente divulgación proporciona un fragmento aislado de un polipéptido de 60 residuos o menos, que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, excepto por hasta una, dos, tres, cuatro, diez o veinte sustituciones de aminoácidos individuales, en el que dicha secuencia de aminoácidos de referencia se elige de entre el grupo que consiste en (a) los aminoácidos x hasta 344 del ID. SEC. Nº: 49, (b) los aminoácidos 309 hasta y del ID. SEC. Nº: 49 y (c) los aminoácidos x hasta y del ID. SEC. Nº: 49, en las que x es cualquier número entero desde 305 hasta 326, e y es cualquier número entero desde 328 hasta 350; y en el que dicho fragmento de polipéptido inhibe la inhibición mediada por el receptor Nogo del crecimiento de la neurita. En algunos casos, la divulgación proporciona un fragmento aislado de un polipéptido de 60 residuos o menos, que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, excepto por hasta una, dos, tres, cuatro, diez o veinte sustituciones de aminoácidos individuales, en el que dicha secuencia de aminoácidos de referencia se elige de entre el grupo que consiste en: (a) los aminoácidos x' hasta 344 del ID. SEC. Nº: 49, (b) los aminoácidos 309 hasta y' del ID. SEC. Nº: 49 y (c) los aminoácidos x' hasta y' del ID. SEC. Nº: 49, en las que x' es cualquier número entero desde 300 hasta 326, e y' es cualquier número entero desde 328 hasta 360 y en el que dicho fragmento de polipéptido inhibe la inhibición mediada por el receptor Nogo del crecimiento de la neurita.

[0177] Por "una secuencia de aminoácidos de referencia del NgR1" o "secuencia de aminoácidos de referencia" se entiende la secuencia especificada sin la introducción de ninguna sustitución de aminoácido. Como comprenderá el experto habitual en la materia, si no hay ninguna sustitución, el "polipéptido aislado" de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de referencia.

[0178] En algunos casos, la divulgación proporciona un fragmento aislado de un polipéptido de 60 residuos o menos, que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, excepto por hasta una, dos o tres sustituciones de aminoácidos individuales, en el que dicha secuencia de aminoácidos de referencia se elige de entre el grupo que consiste en: los aminoácidos 309 hasta 335 del ID. SEC. Nº: 49; los aminoácidos 309 hasta 344 del ID. SEC. Nº: 49; los aminoácidos 310 hasta 335 del ID. SEC. Nº: 49; los aminoácidos 310 hasta 344 del ID. SEC. Nº: 49; los aminoácidos 309 hasta 350 del ID. SEC. Nº: 49; los aminoácidos 300 hasta 344 del ID. SEC. Nº: 49; y los aminoácidos 315 hasta 344 del ID. SEC. Nº: 49.

[0179] En un caso, la divulgación proporciona un fragmento aislado de un polipéptido de 60 residuos o menos,

que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, excepto por hasta tres sustituciones de aminoácidos individuales, en el que dicha secuencia de aminoácidos de referencia es los aminoácidos 309 hasta 344 del ID. SEC. N°: 49.

- 5 **[0180]** En un caso, la divulgación proporciona un fragmento aislado de un polipéptido de 60 residuos o menos, que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, excepto por hasta tres sustituciones de aminoácidos individuales, en el que dicha secuencia de aminoácidos de referencia es los aminoácidos 309 hasta 335 del ID. SEC. N°: 49.
- 10 **[0181]** En una forma de realización, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende: (a) una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia excepto porque al menos un residuo de cisteína de dicha secuencia de aminoácidos de referencia se ha sustituido por un aminoácido diferente, en el que dicha secuencia de aminoácidos de referencia se elige de entre el grupo que consiste en: (i) los aminoácidos a hasta 445 del ID. SEC. N°: 49, (ii) los aminoácidos 27 hasta b del ID. SEC. N°: 49 y (iii) los aminoácidos a hasta b del ID. SEC. N°: 49, en los que a es cualquier número entero desde 25 hasta 35 y b es cualquier número entero desde 300 hasta 450; y (b) un polipéptido heterólogo; que dicho polipéptido inhibe la inhibición mediada por el receptor nogo del crecimiento de la neurita.
- 15 **[0182]** Algunos ejemplos de sustituciones de aminoácidos para los fragmentos de polipéptido de acuerdo con esta forma de realización incluyen sustituciones de residuos individuales de cisteína en los polipéptidos de la invención por aminoácidos diferentes. Cualquier aminoácido diferente puede ser sustituido por una cisteína en los polipéptidos de la invención. El aminoácido diferente que se use dependerá de diversos criterios, por ejemplo, el efecto de la sustitución sobre la conformación del fragmento de polipéptido, la carga del fragmento de polipéptido o la hidrofobicidad del fragmento de polipéptido. Las sustituciones de aminoácidos para los aminoácidos de los polipéptidos de la invención y las secuencias de aminoácidos de referencia pueden incluir aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), con cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), con cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), con cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), con cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y con cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Los aminoácidos típicos para la sustitución por cisteínas en el aminoácido de referencia incluyen alanina, serina, treonina, en particular, alanina. La realización de dichas sustituciones a través de la modificación que un polinucleótido que codifica para el fragmento de polipéptido están en la pericia rutinaria del experto habitual en la materia.
- 20 **[0183]** En otro caso, la presente divulgación proporciona un polipéptido aislado de la divulgación en el que al menos un residuo de cisteína está sustituido por un aminoácido diferente. Los residuos de cisteína que pueden ser sustituidos en el NgR1 humano incluyen la C27, la C31, la C33, la C43, la C80, la C140, la C264, la C266, la C287, la C309, la C335, la C336, la C419, la C429, la C455 y la C473. Los residuos de cisteína que pueden ser sustituidos en el NgR1 de rata incluyen la C27, la C31, la C33, la C80, la C140, la C264, la C266, la C287, la C309, la C335, la C336, la C419, la C429, la C455 y la C473. Los residuos de cisteína que pueden ser sustituidos en el NgR1 de ratón incluyen la C27, la C31, la C33, la C43, la C80, la C140, la C264, la C266, la C287, la C309, la C335, la C336, la C419, la C429, la C455 y la C473.
- 25 **[0184]** La presente divulgación también proporciona un fragmento aislado de un polipéptido de 40 residuos o menos, en el que el fragmento de polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a los aminoácidos 309 hasta 344 del ID. SEC. N°: 49, excepto porque: la C309 está sustituida, la C335 está sustituida, la C336 está sustituida, las C309 y C335 están sustituidas, las C309 y C336 están sustituidas, las C335 y C336 están sustituidas, o las C309, C335, y C336 están sustituidas.
- 30 **[0185]** Los residuos de cisteína de los polipéptidos de la invención pueden ser sustituidos por cualquier aminoácido heterólogo. En ciertas formas de realización, la cisteína es sustituida por un aminoácido pequeño sin carga que al menos es probable que altere la conformación tridimensional del polipéptido, por ejemplo, alanina, serina, treonina, preferiblemente alanina.
- 35 **[0186]** El polipéptido soluble del receptor Nogo-1 de la invención es un componente de una proteína de fusión que adicionalmente comprende un polipéptido heterólogo. En algunas formas de realización, el polipéptido heterólogo es un dominio constante de una inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el dominio constante de la inmunoglobulina es un dominio constante de una cadena pesada. En algunas formas de realización, el polipéptido heterólogo es un fragmento Fc. En algunas formas de realización el Fc está unido al extremo C-terminal
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

del polipéptido soluble del receptor Nogo-1 de la invención. En algunas formas de realización la proteína de fusión del receptor Nogo-1 es un dímero. La invención engloba adicionalmente variantes, análogos o derivados de los fragmentos de polipéptidos como se ha descrito anteriormente.

5 **[0187]** En algunos casos, la divulgación proporciona un polipéptido aislado que comprende: (a) una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, excepto por hasta veinte sustituciones de aminoácidos individuales, en el que dicha secuencia de aminoácidos de referencia se elige de entre el grupo que consiste en: (i) los aminoácidos a hasta 445 del ID. SEC. N°: 49, (ii) los aminoácidos 27 hasta b del ID. SEC. N°: 49 y
 10 cualquier número entero desde 300 hasta 450; y (b) un polipéptido heterólogo; en el que dicho polipéptido inhibe la inhibición del crecimiento de la neurita mediada por el receptor nogo. En algunos casos, el polipéptido aislado es los aminoácidos 1 a 310 del ID. SEC. N°: 49, en el que R269 y A310 están sustituidos por un aminoácido diferente. Algunos ejemplos de aminoácidos que pueden ser sustituidos en el polipéptido incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), con cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico,
 15 ácido glutámico), con cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), con cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), con cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y con cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). En un caso, el aminoácido ácido diferente es triptófano.

20 **[0188]** Un ejemplo de proteína de fusión soluble del NgR-Fc es la NgR1(319)-Fc humana que comprende una Fc unida al extremo C-terminal de los aminoácidos 1 hasta 319 del ID. SEC. N°: 49.

[0189] Un ejemplo de proteínas de fusión solubles del NgR-Fc con sustituciones que cisteína son Ala-Ala-
 25 human(h)NgR1(310)-Fc que comprende una Fc unida al extremo C-terminal de un polipéptido soluble con la secuencia de aminoácidos del ID. SEC. N°: 58, Ala-Ala-rat(r)NgR1(310)-Fc que comprende una Fc unida al extremo C-terminal de un polipéptido soluble con la secuencia de aminoácidos del ID. SEC. N°: 59 y Ala-Ala-human(h)NgR1(344)-Fo que comprende una Fc unida al extremo C-terminal de un polipéptido soluble con la secuencia de aminoácidos del ID. SEC. N°: 64.

30 **[0190]** En la presente invención, un polipéptido puede estar formado por aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isoésteres peptídicos, y puede contener aminoácidos distintos a los 20 aminoácidos codificados genéticamente (por ejemplo, aminoácidos no naturales). Los polipéptidos de la presente invención pueden ser modificados mediante procesos naturales, tales como un
 35 procesamiento post-traducciona, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en la materia. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa bibliografía de investigación. Las modificaciones pueden producirse en cualquier parte del polipéptido, incluyendo el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. Se apreciará que puede haber presente el mismo tipo de modificación en el mismo grado o en grados variables en
 40 diversos sitios de un polipéptido dado. También, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden ser ramificados, por ejemplo, como resultado de una ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden ser el resultado de procesos naturales o pueden ser elaborados mediante métodos sintéticos. Algunas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión
 45 covalente de una fracción hemo, unión covalente de un nucleótido o de un derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o de un derivado de un lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de puentes de disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de un anclaje de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, PEGilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia, tal como
 50 arginilación y ubiquitinación. (Véase, por ejemplo, *Proteins - Structure And Molecular Properties*, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1 - 12 (1983); Seifter y col., *MethEnzymot* 182: 626 - 646 (1990); Rattan y col., *Ann NYAcad Sci* 663: 48 - 62 (1992).).

55 **[0191]** Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden ser cíclicos. La ciclación de los polipéptidos reduce la libertad conformacional de los péptidos lineales y da como resultado una molécula más constreñida estructuralmente. En la materia se conocen muchos métodos de ciclación de péptidos. Por ejemplo, la ciclación "de esqueleto a esqueleto" mediante la formación de un enlace amida entre los residuos de aminoácidos
 60 del N-terminal y del C-terminal del péptido. El método de ciclación "de esqueleto a esqueleto" incluye la formación de

puentes de disulfuro entre dos residuos de α -tio aminoácidos en (por ejemplo, cisteína, homocisteína). Ciertos péptidos de la presente invención incluyen modificaciones en los N y C terminales del péptido para formar un polipéptido cíclico. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, residuos de cisteína, residuos de cisteína acetilados, residuos de cisteína con una fracción de NH₂ y biotina. Otros métodos de ciclación de péptidos se describen en Li & Roller, Curr. Top. Med. Chem. 3: 325 - 341 (2002) y en la Publicación de Patente de EE.UU. N° U.S. 2005-0260626 A1.

[0192] En los métodos de la presente divulgación, puede administrarse directamente un polipéptido NgR1 o un fragmento del polipéptido de la divulgación en forma de un polipéptido preformado, o indirectamente a través de un ácido nucleico vector. En algunos casos de la divulgación, se administra un polipéptido NgR1 o un fragmento de un polipéptido de la divulgación en un método de tratamiento que incluye: (1) la transformación o la transfección de una célula hospedadora implantable con un ácido nucleico, por ejemplo, un vector, que expresa un polipéptido NgR1 o un fragmento de un polipéptido de la invención; y (2) la implantación de la célula hospedadora transformada en un mamífero, en el sitio de una enfermedad, un trastorno o una lesión. Por ejemplo, la célula hospedadora transformada puede ser implantada en el sitio de una lesión crónica de MS. En algunos casos de la divulgación, la célula hospedadora implantable se extrae de un mamífero, se cultiva temporalmente, se transforma o se transfecta con un ácido nucleico aislado que codifica para un polipéptido NgR1 o un fragmento de un polipéptido de la invención y se implanta de nuevo en el mismo mamífero a partir del cual se extrajo. La célula puede ser, aunque no es necesario, extraída del mismo sitio en el que se implanta. Dichos casos, conocidos algunas veces como terapia génica *ex vivo*, pueden proporcionar un suministro continuo del polipéptido NgR1 o de un fragmento del polipéptido de la invención, localizado en el sitio de acción, durante un periodo limitado de tiempo.

[0193] Algunos ejemplos adicionales de los polipéptidos NgR de la invención y de los métodos y materiales para la obtención de estas moléculas para la práctica de la presente invención se describen a continuación.

Proteínas de fusión y polipéptidos conjugados

[0194] La invención implica el uso de un polipéptido NgR1 que no es la proteína completa del NgR1, por ejemplo, fragmentos de polipéptidos del NgR1, condensados con una fracción de un polipéptido heterólogo para formar una proteína de fusión. Dichas proteínas de fusión pueden usarse para conseguir varios objetivos, por ejemplo, un aumento en la semivida sérica, una mejora en la biodisponibilidad, un direccionamiento *in vivo* hacia un órgano o tejido específico, una mejora en la expresión recombinante, una mejora en la secreción de la célula hospedadora, facilidad de purificación y mayor avidez. Dependiendo del (los) objetivo(s) que se quiera(n) conseguir, la fracción heteróloga puede ser inerte o biológicamente activa. También, puede elegirse para que sea condensada de forma estable con la fracción del polipéptido NgR1 de la invención o para que sea escindible, *in vitro* o *in vivo*. Las fracciones heterólogas para conseguir estos otros objetivos son conocidas en la materia.

[0195] Un fragmento de polipéptido NgR1 puede ser condensado con otro fragmento de polipéptido NgR, por ejemplo, un fragmento de polipéptido NgR2 o NgR3 junto con Fc.

[0196] El polipéptido NgR2 humano se muestra a continuación como el ID. SEC. N°: 60.

[0197] El NgR2 humano completo (ID. SEC. N°: 60):

MLPGLRRLQ APASACLLLM LLALPLAAPS CPMLCTCYSS PPTVSCQANN
 FSSVPLSLPP STQRLFLQNN LIRTLRPGTF GSNLLTLWLF SNNLSTIYPG TFRHLQALEE
 LDLGDNRLRLR SLEPDTFQGL ERLQSLHLR CQLSSLPGNI FRGLVSLQYL
 YLQENSLHL QDDLFADLAN LSHFLHGHR LRLLTEHVFR GLGSLDRLLL
 HGNRLQGVHR AAFRGLSRLT ILYLFNNSLA SLPGEALADL PSLEFLRLNA
 NPWACDCRAR PLWAWFQRR VSSSDVTCAT PPERQGRDLR ALREADFQAC
 PPAAPTRPGS RARGNSSSNH LYGVAEAGAP PADPSTLYRD LPAEDSRGRQ
 GGDAPTEDDY WGGYGGEDQR GEQMCPGAAC QAPPDSRGPA LSAGLPSPLL
 CLLLLVPHHL

[0198] El polipéptido NgR2 de ratón se muestra a continuación como el ID. SEC. Nº: 61. `

[0199] El NgR2 de ratón completo (ID. SEC. Nº: 61):

MLPGLRRLQ GPASACLLLT LLALPSVTPS CPMLCTCYSS PPTVSCQANN
FSSVPLSLPP STQRLFLQNN LIRSLRPGTF GPNLLTLWLF SNNLSTIHPG TFRHLQALEE
LDLGDNRHLR SLEPDTFQGL ERLQSLHLYR CQLSSLPGNI FRGLVSLQYL
YLQENSLHL QDDL FADLAN LSHLFLHG NR LRLLTEHVFR GLGSLDRLLL
HGNRLQGVHR AAFHGLSRLT ILYLFNNSLA SLPGEALADL PALEFLRLNA
NPWACDCRAR PLWAWFQRRAR VSSSDVTCAT PPERQGRDLR ALRDSDFQAC
PPPTPTRPGS RARGNSSSNH LYGVAEAGAP PADPSTLYRD LPAEDSRGRQ
GGDAPTEDDY WGGYGGEDQR GEQTCPGAAC QAPADSRGPA LSAGLRTPLL
CLLPLALHHL

[0200] El NgR3 polipéptido humano se muestra a continuación como el ID. SEC. Nº: 62.

[0201] El NgR3 humano completo (ID. SEC. Nº: 62):

MLRKGCCVEL LLLLVAEELP LGGGCPRDCV CYPAPMTVSC QAHNFAAIP
GIPVDSERVF LQNNRIGLLQ PGHFSPAMVT LWIYSNNITY IHPSTFEGFV
HLEELDLGDN RQLRTLAPET FQGLVKLHAL YLYKCGLSAL PAGVFGGLHS
LQYLYLQDNH IEYLQDDIFV DLVNLSHLFL HGKWLWSLGP GTFRGLVNLD
RLLLHENQLQ WVHHKAFHDL RRLTTLFLFN NSLSELQGECLAPLGALEFL
RLNGNPWDCG CRARSLWEWL QRFRGSSSAV PCVSPGLRHG QDLKLLRAED
FRNCTGPASP HQIKSHTLTT TDRAARKEHH SPHGPTRSKG HPHGPRPGHR
KPGKNCNTPR NRNQISKAGA GKQAPELPDY APDYQHKFSF DIMPTARPKR
KGKCARRTPI RAPSGVQQAS SASSLGASLL AWTGLAVTL R

[0202] El polipéptido NgR3 de ratón se muestra a continuación como el ID. SEC. Nº: 63.

[0203] El NgR3 de ratón completo (ID. SEC. Nº: 63):

MLRKGCCVEL LLLLLAGELP LGGGCPRDCV CYPAPMTVSC QAHNFAAIP
GIPEDSERIF LQNNRITFLQ QGHFSPAMVT LWIYSNNITF IAPNTFEGFV HLEELDLGDN
RQLRTLAPET FQGLVKLHAL YLYKCGLSAL PAGIFGGLHS LQYLYLQDNH
IEYLQDDIFV DLVNLSHLFL HGKWLWSLGQ GIFRGLVNLD RLLHENQLQ
WVHHKAFHDL HRLTTLFLFN NSLTELQGDC LAPLVALEFL RLNGNAWDCG
CRARSLWEWL RFRGSSSAV PCATPELRQG QDLKLLRVED FRNCTGPVSP
HQIKSHTLTT SDRAARKEHH PSHGASRDKG HPHGHPPGSR SGYKKAGKNC
TSHRNRNQIS KVSSGKELTE LQDYAPDYQH KFSFDIMPTA RPKRKGKCAR RTPIRAPSGV QQASSGTALG APL-
LAWILGL AVTLR

[0204] En algunos casos, la divulgación proporciona un polipéptido aislado que comprende un primer fragmento de polipéptido y un segundo fragmento de polipéptido, en el que dicho primer fragmento de polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una primera secuencia de aminoácidos de referencia, excepto por hasta una, dos, tres, cuatro, diez o veinte sustituciones de aminoácidos individuales, en el que dicha primera secuencia de aminoácidos de referencia se elige de entre el grupo que consiste en: (a) los aminoácidos a hasta 305 del ID. SEC. N°: 49, (b) los aminoácidos 1 hasta b del ID. SEC. N°: 49 y (c) los aminoácidos a hasta b del ID. SEC. N°: 49, en el que a es cualquier número entero de 1 a 27 y b es cualquier número entero desde 264 hasta 309; y en el que dicho segundo fragmento de polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una segunda secuencia de aminoácidos de referencia, excepto por hasta una, dos, tres, cuatro, diez o veinte sustituciones de aminoácidos individuales, en el que dicha segunda secuencia de aminoácidos de referencia se elige de entre el grupo que consiste en (a) los aminoácidos c hasta 332 del ID. SEC. N°: 60, (b) los aminoácidos 275 hasta d del ID. SEC. N°: 60 y (c) los aminoácidos c hasta d del ID. SEC. N°: 60, en el que c es cualquier número entero desde 265 hasta 306 y d es cualquier número entero desde 308 hasta 340; y en el que dicho polipéptido inhibe la inhibición del crecimiento de la neurita mediada por el receptor nogo.

[0205] En un caso, la divulgación proporciona un polipéptido aislado que comprende un primer fragmento de polipéptido y un segundo fragmento de polipéptido, en el que dicho primer fragmento de polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una primera secuencia de aminoácidos de referencia, excepto por hasta una, dos, tres, cuatro, diez o veinte sustituciones de aminoácidos individuales, en el que dicha primera secuencia de aminoácidos de referencia es los aminoácidos 1 - 274 del ID. SEC. N°: 49 y en el que dicho segundo fragmento de polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una segunda secuencia de aminoácidos de referencia, excepto por hasta una, dos, tres, cuatro, diez o veinte sustituciones de aminoácidos individuales, en el que dicha segunda secuencia de aminoácidos de referencia es los aminoácidos 275 - 311 del ID. SEC. N°: 60 y; en el que dicho polipéptido inhibe la inhibición del crecimiento de la neurita mediada por el receptor nogo.

[0206] En un caso, la divulgación proporciona un polipéptido aislado que comprende un primer fragmento de polipéptido y un segundo fragmento de polipéptido, en el que dicho primer fragmento de polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una primera secuencia de aminoácidos de referencia, excepto por hasta una, dos, tres, cuatro, diez o veinte sustituciones de aminoácidos individuales, en el que dicha primera secuencia de aminoácidos de referencia es los aminoácidos 1 - 274 del ID. SEC. N°: 49 y en el que dicho segundo fragmento de polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una segunda secuencia de aminoácidos de referencia, excepto por hasta una, dos, tres, cuatro, diez o veinte sustituciones de aminoácidos individuales, en el que dicha segunda secuencia de aminoácidos de referencia es los aminoácidos 275 - 332 del ID. SEC. N°: 60 y; en el que dicho polipéptido inhibe la inhibición del crecimiento de la neurita mediada por el receptor nogo.

[0207] En un caso, la divulgación proporciona un polipéptido aislado que comprende un primer fragmento de polipéptido y un segundo fragmento de polipéptido, en el que dicho primer fragmento de polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una primera secuencia de aminoácidos de referencia, excepto por hasta una, dos, tres, cuatro, diez o veinte sustituciones de aminoácidos individuales, en el que dicha primera secuencia de aminoácidos de referencia es los aminoácidos 1 - 305 del ID. SEC. N°: 49 y en el que dicho segundo fragmento de polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una segunda secuencia de aminoácidos de referencia, excepto por hasta una, dos, tres, cuatro, diez o veinte sustituciones de aminoácidos individuales, en el que dicha segunda secuencia de aminoácidos de referencia es los aminoácidos 306 - 311 del ID. SEC. N°: 60 y; en el que dicho polipéptido inhibe la inhibición del crecimiento de la neurita mediada por el receptor nogo.

[0208] En un caso, la divulgación proporciona un polipéptido aislado que comprende un primer fragmento de polipéptido y un segundo fragmento de polipéptido, en el que dicho primer fragmento de polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una primera secuencia de aminoácidos de referencia, excepto por hasta una, dos, tres, cuatro, diez o veinte sustituciones de aminoácidos individuales, en el que dicha primera secuencia de aminoácidos de referencia es los aminoácidos 1 - 305 del ID. SEC. N°: 49 y en el que dicho segundo fragmento de polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una segunda secuencia de aminoácidos de referencia, excepto por hasta una, dos, tres, cuatro, diez o veinte sustituciones de aminoácidos individuales, en el que dicha segunda secuencia de aminoácidos de referencia es los aminoácidos 306 - 309 del ID. SEC. N°: 60 y; en el que dicho polipéptido inhibe la inhibición del crecimiento de la neurita mediada por el receptor nogo. En otro caso, se añade al menos un aminoácido adicional al C-terminal del segundo fragmento de polipéptido. Algunos ejemplos de aminoácidos que pueden ser añadidos al polipéptido incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), con cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), con cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), con cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), con cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y con cadenas

laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). En un caso, el aminoácido añadido es triptófano. En un caso adicional, la arginina en la posición 269 del ID. SEC. N°: 49 está sustituida por triptófano.

[0209] En un caso, la divulgación proporciona un polipéptido aislado que comprende un primer fragmento de polipéptido y un segundo fragmento de polipéptido, en el que dicho primer fragmento de polipéptido consiste en los aminoácidos 1 - 310 del ID. SEC. N°: 49, excepto por hasta una, dos, tres, cuatro, diez o veinte sustituciones de aminoácidos individuales; y en el que dicho segundo fragmento de polipéptido consiste en los aminoácidos 311 - 318 del ID. SEC. N°: 60 excepto por hasta una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos individuales; y en el que dicho polipéptido inhibe la inhibición del crecimiento de la neurita mediada por el receptor nogo.

[0210] Los polipéptidos de la invención comprenden adicionalmente un polipéptido heterólogo. En algunas formas de realización, el polipéptido heterólogo es un dominio constante de una inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el dominio constante de la inmunoglobulina es un dominio constante de una cadena pesada. En algunas formas de realización, el polipéptido heterólogo es un fragmento Fc. En algunas formas de realización el Fc está unido al extremo C-terminal de los polipéptidos de la invención. En algunas formas de realización la fusión es un dímero. La divulgación engloba adicionalmente variantes, análogos o derivados de los fragmentos de polipéptidos como se ha descrito anteriormente.

[0211] Como una alternativa a la expresión de una proteína de fusión, puede preformarse una fracción heteróloga elegida y conjugarse químicamente con la fracción del polipéptido NgR de la invención. En la mayoría de los casos, una fracción heteróloga elegida funcionará de una forma similar, tanto si está fusionada como conjugada con la fracción del polipéptido NgR. Por lo tanto, en el siguiente análisis de las secuencias heterólogas de aminoácidos, salvo que se indique de otro modo, debe entenderse que la secuencia heteróloga puede estar unida a la fracción del polipéptido NgR en forma de una proteína de fusión o en forma de un conjugado químico.

[0212] Los aptámeros del NgR1 y los anticuerpos y los fragmentos de los mismos para su uso en los métodos de tratamiento divulgados en el presente documento también pueden condensarse recombinantemente con un polipéptido heterólogo en el N o C-terminal o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos o con otras composiciones. Por ejemplo, los aptámeros antagonistas NgR1 y los anticuerpos y los fragmentos de los mismos pueden condensarse recombinantemente o conjugarse con moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección, y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la Patente de EE.UU. N° 5.314.995; y el documento EP 396.387.

[0213] Los polipéptidos antagonistas del NgR1, los aptámeros y los anticuerpos y los fragmentos de los mismos para su uso en los métodos de tratamiento divulgados en el presente documento incluyen derivados que están modificados, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula, de forma que la unión covalente no impida que el polipéptido antagonista del NgR1, el aptámero o el anticuerpo inhiba la función biológica del NgR1. Por ejemplo, pero no como limitación, los polipéptidos antagonistas del NgR1, los aptámeros y los anticuerpos y los fragmentos de los mismos de la presente divulgación pueden ser modificados por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, PEGilación, fosfilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores / bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular o a otra proteína, etc. Puede realizarse cualquiera de las numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas que incluyen, pero no se limitan a, una escisión química específica, una acetilación, una formilación, una síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

[0214] Los polipéptidos antagonistas del NgR1, los aptámeros y los anticuerpos y los fragmentos de los mismos para su uso en los métodos de tratamiento divulgados en el presente documento pueden estar formados por aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isoésteres peptídicos, y puede contener aminoácidos distintos a los 20 aminoácidos codificados genéticamente. Los polipéptidos antagonistas del NgR1, los aptámeros y los anticuerpos y los fragmentos de los mismos pueden ser modificados mediante procesos naturales, tales como un procesado post-traduccion, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en la materia. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa bibliografía de investigación. Las modificaciones pueden producirse en cualquier parte del polipéptido antagonista del NgR1, del aptámero o del anticuerpo o de fragmentos de los mismos, incluyendo el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo, o en fracciones tales como carbohidratos. Se apreciará que puede haber presente el mismo tipo de modificación en el mismo grado o en grados variables en diversos sitios de un polipéptido antagonista del NgR1, un aptámero o un anticuerpo o fragmentos de los mismos dados. También, un polipéptido antagonista del NgR1, un aptámero un anticuerpo o fragmentos de los mismos dados puede contener muchos tipos

de modificaciones. Los polipéptidos antagonistas del NgR1, los aptámeros o los anticuerpos o los fragmentos de los mismos pueden ser ramificados, por ejemplo, como resultado de una ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos antagonistas del NgR1, los aptámeros y los anticuerpos o los fragmentos de los mismos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden ser el resultado de procesos naturales post-traduccionales o pueden ser elaborados mediante métodos sintéticos. Algunas modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de una fracción hemo, unión covalente de un nucleótido o de un derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o de un derivado de un lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de puentes de disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de un anclaje de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristilación, oxidación, PEGilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas tales como arginilación y ubiquitinación. (Véase, por ejemplo, *Proteins - Structure And Molecular Properties*, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York 2ª Ed., (1993); *Post-translational Covalent Modification Of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1 - 12 (1983); Seifter y col., *Meth Enzymol* 182: 626 - 646 (1990); Rattan y col., *Ann NY Acad Sci* 663: 48 - 62 (1992)).

[0215] El polipéptido heterólogo con el que está condensado el polipéptido antagonista del NgR1, el aptámero o el anticuerpo o los fragmentos de los mismos es terapéuticamente útil o es útil para dirigir el polipéptido antagonista del NgR1, el aptámero o el anticuerpo o los fragmentos de los mismos. Las proteínas de fusión antagonistas del NgR1, los aptámeros y los anticuerpos o los fragmentos de los mismos pueden usarse para conseguir varios objetivos, por ejemplo, un aumento en la semivida sérica, una mejora la biodisponibilidad, un direccionamiento *in vivo* hacia un órgano o tejido específico, una mejora en la expresión recombinante, una mejora en la secreción de la célula hospedadora, facilidad de purificación y mayor avidéz. Dependiendo del (los) objetivo(s) que se quiera(n) conseguir, la fracción heteróloga puede ser inerte o biológicamente activa. También, puede elegirse para que sea fusionada de forma estable con el polipéptido antagonista del NgR1, el aptámero o el anticuerpo o los fragmentos de los mismos o para que sea escindible, *in vitro* o *in vivo*. Las fracciones heterólogas para conseguir estos otros objetivos son conocidas en la materia.

[0216] Como una alternativa a la expresión de un polipéptido de fusión antagonista del NgR1, un aptámero o un anticuerpo o fragmentos de los mismos, puede preformarse una fracción heteróloga elegida y conjugarse químicamente con el polipéptido antagonista, el aptámero o el anticuerpo. En la mayoría de los casos, una fracción heteróloga elegida funcionará de una forma similar, tanto si está condensada como conjugada con el polipéptido antagonista del NgR1, el aptámero o el anticuerpo o fragmentos de los mismos. Por lo tanto, en el siguiente análisis de las secuencias heterólogas de aminoácidos, salvo que se indique de otro modo, debe entenderse que la secuencia heteróloga puede estar unida al polipéptido antagonista del NgR1, al aptámero o al anticuerpo o a fragmentos de los mismos en forma de una proteína de fusión o en forma de un conjugado químico.

[0217] Los polipéptidos farmacológicamente activos tales como los polipéptidos antagonistas del NgR1, los aptámeros o los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden mostrar un rápido aclaramiento *in vivo*, necesitando una grandes dosis para conseguir unas concentraciones terapéuticamente eficaces en el cuerpo. Además, los polipéptidos menores de aproximadamente 60 kDa experimentan potencialmente una filtración glomerular, lo que en algunos casos produce nefrotoxicidad. Puede emplearse la fusión o la conjugación de polipéptidos relativamente pequeños tales como fragmentos de polipéptidos del dominio de señalización del NgR para reducir o evitar el riesgo de dicha nefrotoxicidad. Se conocen varias secuencias heterólogas de aminoácidos, es decir, fracciones de polipéptidos o "portadores", para aumentar la estabilidad *in vivo*, es decir, la semivida sérica de los polipéptidos terapéuticos. Algunos ejemplos incluyen albúminas séricas tales como, por ejemplo, albúmina sérica bovina (BSA) o albúmina sérica humana (HSA).

[0218] Debido a su larga semivida, a su amplia distribución *in vivo* y a la ausencia de una función enzimática o inmunológica, habitualmente se usa esencialmente albúmina sérica humana completa (HSA) o un fragmento de la HSA, como fracción heteróloga. A lo largo de la aplicación de los métodos y materiales tales como los que se enseñan en Yeh y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 89: 1904 - 08 (1992) y en Syed y col., *Blood* 89: 3243 - 52 (1997), puede usarse la HSA para formar una proteína de fusión o un conjugado de polipéptido que muestre actividad farmacológica en virtud de la fracción del polipéptido NgR mostrando a la vez una estabilidad *in vivo* significativamente aumentada, por ejemplo, desde 10 veces hasta 100 veces mayor. El C-terminal de la HSA puede ser fusionado con el N-terminal de la fracción del polipéptido NgR. Dado que la HSA es una proteína secretada de forma natural, puede explotarse la secuencia de señalización de la HSA para obtener la secreción de la proteína de fusión en el medio de cultivo celular en el que se produce la proteína de fusión en un sistema de expresión eucariota, por ejemplo, de mamífero.

[0219] En ciertos casos, los polipéptidos antagonistas del NgR1, los aptámeros, los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos de los mismos para su uso en los métodos de la presente divulgación comprenden adicionalmente una fracción de direccionamiento. Las fracciones de direccionamiento incluyen una proteína o un péptido que dirigen la localización hacia una cierta parte del cuerpo, por ejemplo, al cerebro o a compartimentos del mismo. En ciertos casos, los polipéptidos antagonistas del NgR1, los aptámeros, los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos de los mismos para su uso en los métodos de la presente divulgación están unidos o fusionados con una fracción de direccionamiento cerebral. Las fracciones de direccionamiento cerebral están unidas covalentemente (por ejemplo, fusión traduccional directa o mediante un enlace químico bien directamente o bien a través de una molécula separadora, que puede ser opcionalmente escindible) o unidas no covalentemente (por ejemplo, a través de interacciones reversibles tales como avidina:biotina, proteína A:IgG, etc.). En otros casos, los polipéptidos antagonistas del NgR1, los aptámeros, los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos de los mismos para su uso en los métodos de la presente divulgación de los mismos están unidos a más de una fracción de direccionamiento. En casos adicionales, la fracción de direccionamiento cerebral la está unida a una pluralidad de polipéptidos antagonistas del NgR1, aptámeros, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de los mismos para su uso en los métodos de la presente divulgación.

[0220] Una fracción de direccionamiento cerebral asociada con un polipéptido antagonista del NgR1, un aptámero, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de los mismos mejora el suministro en el cerebro de dicho polipéptido antagonista del NgR1, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de los mismos. Se han descrito varios polipéptidos que, cuando son condensados con una proteína o un agente terapéutico, suministran al cerebro la proteína o el agente terapéutico a través de la barrera hematoencefálica (BBB). Algunos ejemplos no limitantes incluyen el anticuerpo de dominio único FC5 (Abulrob y col. (2005) J. Neurochem. 95, 1201 - 1214); el mAB 83 - 14, un anticuerpo monoclonal contra el receptor humano de insulina (Pardridge y col. (1995) Pharmacol. Res. 12, 807 - 816); los péptidos B2, B6 y B8 que se unen al receptor de la transferrina humano (hTfR) (Xia y col. (2000) J. Virol. 74, 11359 - 11366); el anticuerpo monoclonal OX26 contra el receptor de la transferrina (Pardridge y col. (1991) J. Pharmacol. Exp. Ther. 259, 66 - 70); conjugados de toxina diftérica (véase, por ejemplo, Gaillard y col., International Congress Series 1277: 185 - 198 (2005); y los ID. SEC. Nº: 1 - 18 de la Patente de EE.UU. Nº 6.306.365.

[0221] La mejora en la administración en el cerebro de una composición de NgR1 está determinada por varios medios bien establecidos en la materia. Por ejemplo, la administración a un animal de un polipéptido antagonista del NgR1, un aptámero, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de los mismos marcado radioactivamente unido a una fracción de direccionamiento cerebral; y mediante la comparación de la localización con un polipéptido antagonista del NgR1, un aptámero, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de los mismos marcado radioactivamente que no está asociado a una fracción de direccionamiento cerebral. Otros medios para la determinación de la mejora en el direccionamiento se describen en las referencias anteriores.

[0222] Algunas formas de realización de la invención emplean una fracción de un polipéptido NgR fusionada con una región de bisagra y Fc, es decir, la porción C-terminal de la región constante de la cadena pesada de una Ig. En algunas formas de realización, los aminoácidos de la región de bisagra pueden ser sustituidos por aminoácidos diferentes. Algunos ejemplos de sustituciones de aminoácidos para la región de bisagra de acuerdo con estas formas de realización incluyen regiones de residuos individuales de cisteína en la región de bisagra por aminoácidos diferentes. Cualquier aminoácido diferente puede ser sustituido por una cisteína en la región de bisagra. Las sustituciones de aminoácidos por los aminoácidos de los polipéptidos de la invención y las secuencias de aminoácidos de referencia pueden incluir aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), con cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), con cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), con cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), con cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y con cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Algunos aminoácidos típicos para la sustitución de cisteínas en el aminoácido de referencia incluyen alanina, serina, treonina, en particular, serina y alanina. La realización de dichas sustituciones mediante la modificación de un polinucleótido que codifica para el fragmento de polipéptido está en la pericia rutinaria del experto habitual en la materia.

[0223] Las potenciales ventajas de una fusión NgR-polipéptido-Fc incluyen solubilidad, estabilidad *in vivo* y multivalencia, por ejemplo, dimerización. La región Fc puede ser la región Fc de una IgA, de una IgD o de una IgG (bisagra-CH2-CH3). Alternativamente, la región Fc de una IgE o la Fc de una IgM (bisagra-CH2-CH3-CH4). Generalmente se usa la región Fc de una IgG, por ejemplo, la región Fc de una IgG1 Fc o la región Fc de una IgG4. Los materiales y los métodos para la construcción y la expresión del ADN que codifica para las fusiones de Fc son conocidos en la materia y pueden aplicarse para obtener fusiones sin una excesiva experimentación. Algunas

formas de realización de la invención emplean una proteína de fusión tal como las descritas en Capon y col., Patentes de EE.UU. Nº 5.428.130 y 5.565.335.

[0224] La secuencia de señalización es un polinucleótido que codifica para una secuencia de aminoácidos que inicia el transporte de una proteína a través de la membrana del retículo endoplásmico. Las secuencias de señalización útiles para la construcción de una inmunofusina incluyen las secuencias de señalización de la cadena ligera de un anticuerpo, por ejemplo, del anticuerpo 14.18 (Gillies y col., J. Immunol. Meth., 125: 191 - 202 (1989)), las secuencias de señalización de la cadena pesada de un anticuerpo, por ejemplo, la secuencia de señalización de la cadena pesada del anticuerpo MOPC141 (Sakano y col., Nature 286: 5774 (1980)). Alternativamente, pueden usarse otras secuencias de señalización. Véase, por ejemplo, Watson, Nucl. Acids Res. 12: 5145 (1984). El péptido de señalización habitualmente es escindido en la luz del retículo endoplásmico por peptidasas de señalización. Esto da como resultado la secreción de una proteína inmunofusina que contiene la región Fc y la fracción del polipéptido NgR.

[0225] En algunas formas de realización, la secuencia de ADN puede codificar para un sitio de escisión proteolítica entre el casete de secreción y la fracción del polipéptido NgR. Dicho sitio de escisión puede proporcionar, por ejemplo, el sitio de escisión proteolítica de la proteína de fusión codificada, separando así el dominio Fc de la proteína objetivo. Algunos sitios de escisión proteolítica útiles incluyen las secuencias de aminoácidos reconocidas por enzimas proteolíticas tales como tripsina, plasmina, trombina, factor Xa o enterocinasa K.

[0226] El casete de secreción puede ser incorporado en un vector de expresión replicable. Algunos vectores útiles incluyen ácidos nucleicos lineales, plásmidos, fagémidos, cósmidos y similares. Un ejemplo de vector de expresión es pdC, en el que la transcripción del ADN de la inmunofusina se pone bajo el control de un potenciador y de un promotor del citomegalovirus humano. Véase, por ejemplo, Lo y col., Biochim. Biophys. Acta 1088: 712 (1991); y Lo y col., Protein Engineering 11: 495 - 500 (1998). Puede ser transformada o transfectada una célula hospedadora apropiada con un ADN que codifica para un polipéptido NgR1 o un fragmento de polipéptido de la divulgación, y usada para la expresión y la secreción del polipéptido. Las células hospedadoras que se usan normalmente incluyen células inmortales de hibridoma, células de mieloma, células 293, células de ovario de hámster chino (CHO), células Hela y células COS.

[0227] Las regiones naturales totalmente intactas de tipo Fc muestran funciones efectoras que normalmente son innecesarias e indeseadas en una proteína de fusión Fc usada en los métodos de la presente divulgación. Por lo tanto, normalmente se delecionan ciertos sitios de unión de la región Fc durante la construcción del casete de secreción. Por ejemplo, dado que es innecesaria la expresión conjunta con la cadena ligera, el sitio de unión para la proteína de unión de la cadena pesada, el Bip (Hendershot y col., Immunol. Today 8: 111 - 14 (1987)), es delecionado del dominio CH2 de la región Fc de la IgE, de forma que este sitio no interfiere con la secreción eficiente de la inmunofusina. Generalmente también se delecionan las secuencias del dominio transmembranal, tales como las presentes en la IgM.

[0228] La región Fc de la IgG1 es la que se usa más a menudo. Alternativamente, puede usarse la región Fc de las otras subclases de inmunoglobulina gamma (gamma-2, gamma-3 y gamma-4) en el casete de secreción. Generalmente se usa la región Fc de la IgG1 de la inmunoglobulina gamma-1 en el casete de secreción e incluye al menos parte de la región de bisagra, la región CH2 y la región CH3. En algunas formas de realización, la región Fc de la inmunoglobulina gamma-1 es una Fc con la CH2 delecionada, que incluye parte de la región de bisagra y la región CH3, pero no la región CH2. Una Fc con la CH2 delecionada ha sido descrita por Gillies y col., Hum. Antibod. Hybridomas 1: 47 (1990). En algunas formas de realización, se usa la región Fc de una de la IgA, de la IgD, de la IgE o de la IgM.

[0229] Las proteínas de fusión de la fracción Fc del polipéptido NgR pueden construirse con numerosas configuraciones diferentes. En una configuración, el C-terminal de la fracción del polipéptido NgR se condensa directamente con el N-terminal de la fracción de bisagra de la Fc. En una configuración ligeramente diferente se incorpora un polipéptido corto, de, por ejemplo, 2 - 10 aminoácidos, en la fusión entre el N-terminal de la fracción del polipéptido NgR y el C-terminal de la fracción Fc. En la configuración alternativa, el polipéptido corto se incorpora en la fusión entre el C-terminal de la fracción del polipéptido NgR y el N-terminal de la fracción Fc. Un caso ejemplar de esta configuración es el NgR1(310)-2XG4S-Fc, que es los aminoácidos 26 - 310 del ID. SEC. Nº: 49 unido a (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂ (ID. SEC. Nº: 66) que está unido a la Fc. Dicho conector proporciona una flexibilidad conformacional que puede mejorar la actividad biológica en algunas circunstancias. Si se conserva una porción suficiente de la región de bisagra en la fracción Fc, la fusión polipéptido NgR-fracción Fc dimerizará, formando así una molécula divalente. Una población homogénea de fusiones Fo monoméricas producirá dímeros

monoespecíficos bivalentes. Una mezcla de dos fusiones Fc monoméricas teniendo cada una, una especificidad diferente, producirá dímeros biespecíficos bivalentes.

[0230] Puede usarse cualquiera de los numerosos conectores cruzados que contienen un correspondiente grupo amino reactivo y un grupo tiol reactivo para conectar un polipéptido NgR1 de la invención con albúmina sérica. Algunos ejemplos de conectores adecuados incluyen conectores cruzados con una amina reactiva que insertan una maleimida reactiva a tiol, por ejemplo, SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS y GMBS. Otros vectores adecuados insertan un grupo haloacetato reactivo a tiol, por ejemplo, SBAP, SIA, SIAB. Algunos conectores que proporcionan un tiol protegido o no protegido para la reacción con grupos sulfhidrilo para producir un enlace reducible incluyen SPDP, SMPT, SATA y SATP. Dichos reactivos están disponibles en el mercado (por ejemplo, Pierce Chemical Company, Rockford, IL).

[0231] La conjugación no tiene que implicar el N-terminal de un polipéptido NgR1 de la invención ni la fracción de tiol de la albúmina sérica. Por ejemplo, las fusiones NgR-polipéptido-albúmina pueden obtenerse mediante el uso de técnicas de ingeniería genética en las que la fracción del polipéptido NgR es fusionada con el gen de la albúmina sérica en su N-terminal, en su C-terminal, o en ambos.

[0232] Los polipéptidos NgR de la invención pueden ser fusionados con una etiqueta polipeptídica. El término "etiqueta polipeptídica", según se usa en el presente documento, pretende indicar cualquier secuencia de aminoácidos que puede ser fijada, conectada o unida a un polipéptido NgR y que puede ser usada para identificar, purificar, concentrar o aislar el polipéptido NgR. La unión de la etiqueta polipeptídica al polipéptido NgR puede producirse, por ejemplo, mediante la construcción de una molécula de ácido nucleico que comprende: (a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la etiqueta polipeptídica y (b) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un polipéptido NgR. Algunos ejemplos de etiquetas polipeptídicas incluyen, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos que son susceptibles de ser modificadas post-traduccionalmente, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos que están biotiniladas. Otros ejemplos de etiquetas polipeptídicas incluyen, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos que son susceptibles de ser reconocidas y/o unidas por un anticuerpo (o por un fragmento del mismo) o por otro reactivo de unión específico. Algunas etiquetas polipeptídicas que son susceptibles de ser reconocidas por un anticuerpo (o por un fragmento del mismo) o por otros reactivos de unión específicos incluyen, por ejemplo, aquellas que se conocen en la materia como "etiquetas de epítipo". Una etiqueta de epítipo puede ser una etiqueta de epítipo natural o una artificial. Las etiquetas de epítipo naturales y artificiales son conocidas en la materia, incluyendo, por ejemplo, epítopos artificiales tales como los péptidos FLAG, Strep o polihistidina. Los péptidos FLAG incluyen la secuencia Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (ID. SEC. N°: 74) o Asp-Tyr-Lys-Asp-Glu-Asp-Asp-Lys (ID. SEC. N°: 75) (Einhauer, A. y Jungbauer, A., J. Biochem. Biophys. Methods 49: 1 - 3: 455 - 465 (2001)). El epítipo Strep tiene la secuencia Ala-Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (ID. SEC. N°: 76). También puede usarse el epítipo VSV-G y tiene la secuencia Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys (ID. SEC. N°: 77). Otro epítipo artificial es una secuencia de poli-His que tiene seis residuos de histidina (His-His-His-His-His-His (ID. SEC. N°: 78). Algunos epítopos naturales incluyen la secuencia de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala-Ile-Glu-Gly-Arg (ID. SEC. N°: 79) reconocida por el anticuerpo monoclonal 12CA5 (Murray y col., Anal. Biochem. 229: 170 - 179 (1995)) y la secuencia de once aminoácidos de la c-myc humana (Myc) reconocida por el anticuerpo monoclonal 9E10 (Glu-Gln-Lys-Leu-Leu-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu-Asn (ID. SEC. N°: 80) (Manstein y col., Gene 162: 129 - 134 (1995)). Otro epítipo útil es el tripéptido Glu-Glu-Phe que es reconocido por el anticuerpo monoclonal YL 1/2. (Stammers y col. FEBS Lett. 283: 298 - 302(1991)).

[0233] En ciertas formas de realización, el polipéptido NgR y la etiqueta polipeptídica pueden conectarse a través de una secuencia de aminoácidos de conexión. Según se usa en el presente documento, una "secuencia de aminoácidos de conexión" puede ser una secuencia de aminoácidos que es susceptible de ser reconocida y/o escindida por una o más proteasas. Las secuencias de aminoácidos que pueden ser reconocidas y/o escindidas por una o más proteasas son conocidas en la materia. Algunos ejemplos de secuencias de aminoácidos son aquellas que son reconocidas por las siguientes proteasas: el factor VIIa, el factor IXa, el factor Xa, APC, t-PA, u-PA, tripsina, quimotripsina, enterocinasa, pepsina, catepsina B, H, L, S, D, catepsina G, renina, enzima convertidora de la angiotensina, metaloproteasas de la matriz (colagenasas, estromelinas, gelatinasas), elastasa de macrófagos, Cir, y Cis. Las secuencias de aminoácidos que son reconocidas por las proteasas mencionadas anteriormente son conocidas en la materia. Algunos ejemplos de secuencias reconocidas por ciertas proteasas pueden encontrarse, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N° 5.811.252.

[0234] Las etiquetas de los polipéptidos pueden facilitar la purificación mediante el uso de medios cromatográficos disponibles comercialmente.

[0235] En algunas formas de realización de la invención, se usa un constructo de fusión de un polipéptido

NgR para mejorar la producción de una fracción del polipéptido NgR en bacterias. En dichos constructos se emplea una proteína bacteriana expresada y/o secretada normalmente a un elevado nivel como el compañero de fusión N-terminal de un polipéptido NgR1 de la invención. Véase, por ejemplo, Smith y col., Gene 67: 31 (1988); Hopp y col., Biotechnology 6: 1204 (1988); La Vallie y col., Biotechnology 11: 187 (1993).

5

[0236] Mediante la fusión de una fracción del polipéptido NgR en los extremos amino y carboxi de un compañero de fusión adecuado, pueden obtenerse formas bivalentes o tetravalentes de un polipéptido NgR1 de la invención. Por ejemplo, puede fusionarse una fracción del polipéptido NgR con los extremos amino y carboxi de una fracción de una Ig para producir un polipéptido monomérico bivalente que contiene las fracciones del polipéptido

10

NgR. Después de la dimerización de estos dos monómeros, en virtud de la fracción de Ig se obtiene una forma tetravalente de un polipéptido NgR. Dichas formas multivalentes pueden usarse para conseguir un aumento en la afinidad de unión con el objetivo. Las formas multivalentes de un polipéptido NgR1 de la invención también pueden obtenerse colocando fracciones del polipéptido NgR en tándem para formar concatámeros, que pueden emplearse solos o condensados con un compañero de fusión tal como Ig o HSA.

15

Polímeros conjugados (distintos a polipéptidos)

[0237] Algunas formas de realización de la invención implican un polipéptido NgR1 de la invención en el que uno o más polímeros están conjugados (unidos covalentemente) con el polipéptido NgR. Algunos ejemplos de polímeros adecuados para dicha conjugación incluyen polipéptidos (analizados anteriormente), polímeros de azúcar y cadenas de polialquilenglicol. Normalmente, pero no necesariamente, un polímero se conjuga con el polipéptido NgR1 de la invención con el fin de mejorar una o más de las siguientes: solubilidad, estabilidad o biodisponibilidad.

20

[0238] La clase de polímero usada generalmente para la conjugación con un polipéptido NgR1 de la invención es un polialquilenglicol. El polietilenglicol (PEG) es el más frecuentemente usado. Las fracciones de PEG, por ejemplo, polímeros de 1, 2, 3, 4 o 5 PEG, pueden ser conjugadas con cada polipéptido NgR para aumentar la semivida sérica con respecto al polipéptido NgR solo. Las fracciones de PEG no son antigénicas y son esencialmente biológicamente inertes. Las fracciones de PEG usadas en la práctica de la invención pueden estar ramificadas o no ramificadas.

30

[0239] El número de fracciones de PEG unidas al polipéptido NgR y el peso molecular de las cadenas individuales de PEG puede variar. En general, cuanto mayor sea el peso molecular del polímero, menos cadenas de polímero se unirán al polipéptido. Habitualmente, la masa total del polímero unido al polipéptido NgR o a un fragmento del polipéptido, es desde 20 kDa hasta 40 kDa. Por lo tanto, si hay unida una cadena de polímero, el peso molecular de la cadena es generalmente de 20 - 40 kDa. Si hay dos cadenas unidas, el peso molecular de cada cadena es generalmente de 10 - 20 kDa. Si hay tres cadenas unidas, el peso molecular es generalmente de 7 - 14 kDa.

35

[0240] El polímero, por ejemplo, PEG, puede unirse al polipéptido NgR a través de cualquier grupo reactivo adecuado expuesto del polipéptido. El (los) grupo(s) reactivo(s) expuesto(s) puede(n) ser, por ejemplo, un grupo amino N-terminal o el grupo amino épsilon de un residuo de lisina interno, o ambos. Un polímero activado puede reaccionar con, y unirse covalentemente a, cualquier grupo amino libre del polipéptido NgR. También pueden usarse los grupos carboxílicos libres, los grupos adecuadamente activados carbonilo, hidroxilo, guanidilo, imidazol, las fracciones de carbohidrato oxidadas y los grupos mercapto del polipéptido NgR (si estuviera disponible) como

45

[0241] En una reacción de conjugación se emplean normalmente desde aproximadamente 1,0 hasta aproximadamente 10 moles de polímero activado por mol de polipéptido, dependiendo de la concentración del polipéptido. Habitualmente, la proporción elegida representa un equilibrio entre maximizar la reacción y minimizar las reacciones secundarias (a menudo no específicas) que pueden deteriorar la actividad farmacológica deseada de la fracción del polipéptido NgR. Preferiblemente, se conserva al menos el 50 % de la actividad biológica (según se muestra, por ejemplo, en cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento o conocidos en la materia) del polipéptido NgR, y lo más preferiblemente se conserva aproximadamente el 100 %.

50

[0242] El polímero puede ser conjugado con el polipéptido NgR mediante el uso de una química convencional. Por ejemplo, puede acoplarse una fracción de polialquilenglicol al grupo amino épsilon de una lisina del polipéptido NgR. La unión con la cadena lateral de lisina puede llevarse a cabo con un éster de N-hidroxilsuccinimida (NHS) activo tal como succinato de succinimidilo PEG (SS-PEG) y propionato de succinimidilo (SPA-PEG). Algunas fracciones de polialquilenglicol adecuadas incluyen, por ejemplo, carboximetil-NHS y norleucina-NHS, SC. Estos reactivos están disponibles en el mercado. Algunos conectores adicionales de amina-PEG reactivo pueden ser

55

60

sustituidos por la fracción de succinimidilo. Estos incluyen, por ejemplo, isotiocianatos, nitrofenilcarbonatos (PNP), epóxidos, carbonatos de benzotriazol, SC-PEG, tresilato, aldehído, epóxido, carbonilimidazol y carbonato de PNP. Las condiciones son habitualmente optimizadas para maximizar la selectividad y la magnitud de la reacción. Dicha optimización de las condiciones de reacción está en la pericia habitual de la materia.

5

[0243] La PEGilación puede llevarse a cabo mediante cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, Focus on Growth Factors, 3: 4 - 10, 1992 y las solicitudes de patente europea EP 0 154 316 y EP 0 401 384. La PEGilación puede llevarse a cabo mediante el uso de una reacción de acilación o de una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva (o un polímero análogo reactivo soluble en agua).

10

[0244] La PEGilación mediante acilación implica generalmente la reacción de un derivado de un éster activo de polietilenglicol. Puede emplearse cualquier molécula reactiva de PEG en la PEGilación. El PEG esterificado con N-hidroxisuccinimida (NHS) es un éster de PEG activado usado con frecuencia. Según se usa en el presente documento, "acilación" incluye sin limitación los siguientes tipos de uniones entre la proteína terapéutica y un polímero soluble en agua tal como PEG: amida, carbamato, uretano y similares. Véase, por ejemplo, Bioconjugate Chem. 5: 133 - 140, 1994. Los parámetros de la reacción se eligen generalmente para evitar unas condiciones de temperatura, disolvente y pH que podrían dañar o inactivar el polipéptido NgR.

15

[0245] Generalmente, la unión de conexión es una amida y normalmente al menos el 95 % del producto resultante está mono, di o tri-PEGilado. Sin embargo, pueden formarse algunas especies con mayores grados de PEGilación en unas cantidades que dependen de las condiciones de reacción específicas usadas. Opcionalmente, las especies PEGiladas purificadas se separan de la mezcla, particularmente las especies sin reaccionar, mediante los métodos de purificación convencionales, que incluyen, por ejemplo, diálisis, precipitación salina, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio hidrófobo y electroforesis.

20

[0246] La PEGilación mediante alquilación implica generalmente hacer reaccionar un derivado aldehído terminal de PEG con un polipéptido NgR1 de la invención en presencia de un agente reductor. Además, se pueden manipular las condiciones de reacción para favorecer la PEGilación sustancialmente únicamente en el grupo amino N-terminal del polipéptido NgR, es decir, una proteína mono-PEGilada. En cualquier caso de mono-PEGilación o de poli-PEGilación, los grupos PEG normalmente se unen a la proteína a través de un grupo -CH₂-NH-. Con referencia en particular al grupo -CH₂-, este tipo de unión se conoce como unión "alquilo".

30

[0247] La derivatización a través de una alquilación reductora para producir un producto mono-PEGilado dirigido N-terminalmente aprovecha la reactividad diferencial de los diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina con respecto al N-terminal) disponibles para la derivatización. La reacción se lleva a cabo a un pH que permite aprovechar las diferencias en el pKa entre los grupos amino épsilon de los residuos de lisina y el del grupo amino N-terminal de la proteína. Mediante dicha derivatización selectiva se controla la unión de un polímero soluble en agua que contiene un grupo reactivo, tal como un aldehído, a una proteína: la conjugación con el molinero tiene lugar predominantemente en el N-terminal de la proteína y no se produce ninguna modificación significativa de otros reactivos, tales como los grupos amino de la cadena lateral de lisina.

40

[0248] Las moléculas de polímero usadas en las metodologías de acilación y de alquilación se eligen de entre polímeros solubles en agua. El polímero seleccionado normalmente se modifica para que tenga un único grupo reactivo, tal como un éster activo para la acilación o un aldehído para la alquilación, de forma que grado de polimerización pueda ser controlado según se establece en los presentes métodos. Un ejemplo de aldehído de PEG reactivo es propionaldehído de polietilenglicol, que es estable en agua, o derivados monoalcoxi o ariloxi C1 - C10 del mismo (véase, por ejemplo, Harris y col., Patente de EE.UU. Nº 5.252.714). El polímero puede estar ramificado o no ramificado. Para las reacciones de acilación, el (los) polímero(s) seleccionado(s) tendrá(n) normalmente un único grupo éster reactivo. Para la alquilación reductora, el (los) polímero(s) seleccionado(s) tendrá(n) normalmente un único grupo aldehído reactivo. Generalmente, el polímero soluble en agua no se seleccionará de entre los residuos de glucosilo naturales, ya que estos son elaborados más convenientemente por sistemas de expresión recombinantes de mamífero.

50

[0249] Los métodos para la preparación de los polipéptidos NgR PEGilados de la invención incluyen generalmente las etapas de (a) hacer reaccionar un polipéptido NgR1 de la invención con polietilenglicol (tal como un éster reactivo o un derivado de aldehído de PEG) en unas condiciones en las cuales la molécula quede unida al uno o más grupos de PEG y (b) obtener el (los) producto(s) de la reacción. En general, las condiciones óptimas de reacción para las reacciones de acilación serán determinadas en cada caso basándose en los propios parámetros y

60

en el resultado deseado. Por ejemplo, una mayor proporción entre el PEG y una proteína da lugar generalmente a un mayor porcentaje de producto poli-PEGilado.

[0250] La alquilación reductora para producir una población sustancialmente homogénea de mono-polímero / polipéptido NgR incluye generalmente las etapas de: (a) hacer reaccionar un polipéptido NgR1 de la invención con una molécula de PEG reactiva en unas condiciones de alquilación reductora, a un pH adecuado para permitir la modificación selectiva de los grupos amino N-terminales del NgR; y (b) obtener el (los) producto(s) de la reacción.

[0251] Para una población sustancialmente homogénea de mono-polímero / polipéptido NgR, las condiciones de la reacción de alquilación reductora son aquellas que permitan la unión selectiva de la fracción del polímero soluble en agua al N-terminal de un polipéptido NgR1 de la invención. Dichas condiciones de reacción proporcionan generalmente diferencias en el pKa entre los grupos amino de la cadena lateral de lisina y el grupo amino N-terminal. Para los fines de la presente invención, el pH está generalmente en el intervalo de 3 - 9, normalmente de 3 - 6.

[0252] Los polipéptidos NgR de la invención pueden incluir una etiqueta, por ejemplo, una fracción que puede ser liberada posteriormente mediante proteólisis. Por lo tanto, la fracción de lisina puede ser modificada selectivamente mediante una primera reacción de una etiqueta de His modificada con un conector de bajo peso molecular tal como el reactivo de Traut (Pierce Chemical Company, Rockford, IL) que reaccionará tanto con la lisina como con el N-terminal y liberará después la etiqueta de His. Entonces el polipéptido contendrá un SH libre que puede ser modificado selectivamente con un PEG que contiene un grupo de cabeza de activo de tiol tal como un grupo maleimida, un grupo vinilsulfona, un grupo haloacetato o un SH libre o protegido.

[0253] El reactivo de Traut puede ser sustituido por cualquier conector que establezca un sitio específico para la unión del PEG. Por ejemplo, el reactivo de Traut puede ser sustituido por SPDP, SMPT, SATA o SATP (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). De forma análoga se podría hacer reaccionar la proteína con un conector reactivo en amina que inserte una maleimida (por ejemplo, SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS o GMBS), un grupo haloacetato (SBAP, SIA, SLAB) o un grupo vinilsulfona, y hacer reaccionar el producto resultante con un PEG que contiene un SH libre.

[0254] En algunas formas de realización, la fracción de polialquilenglicol se acopla a un grupo cisteína del polipéptido NgR. El acoplamiento puede llevarse a cabo mediante el uso de, por ejemplo, un grupo maleimida, un grupo vinilsulfona, un grupo haloacetato o un grupo tiol.

[0255] Opcionalmente, el polipéptido NgR está conjugado con la fracción de polietilenglicol a través de un enlace lábil. El enlace lábil puede ser escindido, por ejemplo, en una hidrólisis bioquímica, una proteólisis o una escisión de sulfhidrilo. Por ejemplo, el enlace puede ser escindido en unas condiciones *in vivo* (fisiológicas).

[0256] Las reacciones pueden tener lugar mediante cualquier método adecuado usado para hacer reaccionar materiales biológicamente activos con polímeros inertes, generalmente a un pH de aproximadamente 5 - 8, por ejemplo, a un pH de 5, 6, 7 u 8, si los grupos reactivos están en el grupo amino alfa del N-terminal. Generalmente el proceso implica la preparación de un polímero activado, y hacer reaccionar a continuación la proteína con el polímero activado para producir la proteína soluble adecuada para su formulación.

[0257] Los polipéptidos NgR de la invención, en ciertas formas de realización, son polipéptidos solubles. Los métodos para la elaboración de un polipéptido soluble o para mejorar la solubilidad de un polipéptido son bien conocido en la materia.

Moléculas de ácidos nucleicos

[0258] La presente divulgación proporciona un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de la divulgación, incluyendo los polipéptidos de uno cualquiera de los ID. SEC. N°: 1 - 9, 26 - 27, 29 - 37 y 41 - 45. En algunos casos, el ácido nucleico codifica para un polipéptido elegido de entre el grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 26 - 344 del receptor Nogo-1 según se muestra en los ID. SEC. N°: 6 y 8, o los residuos de aminoácidos 27 - 344 del receptor Nogo-1 según se muestra en el ID. SEC. N°: 8. En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica para un polipéptido elegido de entre el grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 26 - 310 del receptor Nogo-1 según se muestra en los ID. SEC. N°: 7 y 9, o los residuos de aminoácidos 27 - 310 del receptor Nogo-1 según se muestra en el ID. SEC. N°: 9. Según se usa en el presente documento, "ácido nucleico" significa moléculas de ADN genómico, de ADNc, de ARNm y antisentido, así como ácidos nucleicos basados en esqueletos alternativos o que incluyen bases alternativas, tanto derivados de fuentes naturales como sintetizados.

En algunos casos, el ácido nucleico comprende adicionalmente un promotor de la transcripción y opcionalmente una secuencia de señalización, cada uno de los cuales está unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica para los polipéptidos de la divulgación.

5 **[0259]** En algunos casos, la divulgación proporciona un ácido nucleico que codifica para una proteína de fusión del receptor Nogo-1 de la divulgación, incluyendo una proteína de fusión que comprende un polipéptido elegido de entre el grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 26 - 344 del receptor Nogo-1 según se muestra en los ID. SEC. Nº: 6 y 8, o los residuos de aminoácidos 27 - 344 del ID. SEC. Nº: 8 y los residuos de aminoácidos 26 - 310 del receptor Nogo-1 según se muestra en los ID. SEC. Nº: 7 y 9, o los residuos de aminoácidos 27 - 310 del ID. SEC. Nº: 9. En algunos casos, el ácido nucleico codifica para una proteína de fusión del receptor Nogo-1 que comprende un polipéptido elegido de entre el grupo que consiste en los ID. SEC. Nº: 26 - 27, 29 - 37 y 41 - 45. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica para una proteína de fusión del receptor Nogo-1 comprende adicionalmente un promotor de la transcripción y opcionalmente una secuencia de señalización. En algunos casos, la secuencia de nucleótidos codifica adicionalmente para una región constante de una inmunoglobulina. En algunos casos, la región constante de una inmunoglobulina es una región constante de la cadena pesada. En algunos casos, la secuencia de nucleótidos adicionalmente codifica para una región constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina unida a región de bisagra. En algunos casos el ácido nucleico codifica adicionalmente para Fc. En algunos casos las proteínas de fusión del receptor Nogo-1 comprenden un fragmento Fc.

20 **[0260]** Los ácidos nucleicos codificantes de la presente divulgación pueden ser modificados adicionalmente de forma que contengan un marcador detectable con fines diagnósticos y de sonda. En la materia se conoce una variedad de dichos marcadores y pueden ser fácilmente empleados con las moléculas codificantes descritas en el presente documento. Algunos marcadores incluyen, pero no se limitan a, biotina, nucleótidos radiomarcados y similares. Un artesano experto puede emplear cualquiera de los marcadores conocidos en la técnica para obtener una molécula de ácido nucleico codificante marcada.

30 **[0261]** La presente divulgación también incluye polinucleótidos que hibridan en unas condiciones moderadamente rigurosas o muy rigurosas con una hebra no codificante, o complemento, de un polinucleótido que codifica para uno cualquiera de los polipéptidos de la invención. Las condiciones rigurosas son conocidas por los expertos en la materia y pueden encontrarse en CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1 - 6.3.6.

35 **[0262]** El polinucleótido del receptor Nogo-1 humano se muestra a continuación como el ID. SEC. Nº: 81.

[0263] El receptor Nogo-1 completo humano está codificado por el nucleótido 166 hasta el nucleótido 1587 del ID. SEC. Nº: 81:

```

agcccagcca gagccggggcg gaggggagcg cgccgagcct cgtcccgcgg
ccggggcggg gccggggcgt agcggcgggcg cctggatgcy gacccgggccg
cggggagacg ggcgcccgcg ccgaaacgac tttcagtccc cgacgcgccc
cgcccaaccc ctacgatgaa gagggcgctcc gctggaggga gccggctgct
ggcatgggtg ctgtggctgc aggcctggca ggtggcagcc ccatgcccag
gtgcctgogt atgctacaat gagcccaagg tgacgacaag ctgccccag
cagggcctgc aggcctgtgc cgtgggcac cctgctgcca gccagcgcat
cttcctgcac ggcaaccgca tctcgcatgt gccagctgcc agcttccgtg
cctgcccga cctcaccatc ctgtggctgc actcgaatgt gctggcccga
attgatgcgg ctgccttcac tggcctggcc ctctggagc agctggacct
cagcgataat gcacagctcc ggtctgtgga ccctgccaca ttccacggcc
tgggccgcct acacacgctg cacctggacc gctgcggcct gcaggagctg
ggcccggggc tgttccgcgg cctggctgcc ctgcagtacc tctacctgca
ggacaacgcg ctgcaggcac tgcctgatga caccttccgc gacctgggca
acctcacaca cctcttctg cacggcaacc gcatctccag cgtgcccag
cgcccttcc gtgggctgca cagcctcgac cgtctcctac tgcaccagaa
ccgcgtggcc catgtgcacc cgcctgcctt ccgtgacctt ggccgcctca
tgacactcta tctgtttgcc aacaatctat cagcgctgcc cactgaggcc
ctggccccc ctcgtgacct gcagtacctg aggcctcaacg acaaccctg
ggtgtgtgac tgccgggcac gccactctg ggccctggctg cagaagtcc
gcggctcttc ctccgaggtg ccctgcagcc tcccgcacg cctggctggc
cgtgacctca aacgcctagc tgccaatgac ctgcagggt gcgctgtggc
caccggccct taccatccca tctggaccgg cagggccacc gatgaggagc
cgctggggct tcccaagtgc tgccagccag atgcgctga caaggcctca
gtactggagc ctggaagacc agcttcggca ggcaatgcgc tgaagggacg
cgtgcccgc cgtgacagcc cgccgggcaa cggctctggc ccacggcaca
tcaatgactc accctttggg actctgcctg gctctgctga gccccgctc
actgcagtgc ggcccgaggg ctccgagcca ccagggttcc ccacctcggg
ccctcgccgg aggccaggct gtteacgcaa gaaccgcacc cgcagccact
gccgtctggg ccaggcaggc agcgggggtg gcgggactgg tgactcagaa
ggctcaggtg ccctacccag cctcacctgc agcctcacc ccctgggcct
ggcgctgggt ctgtggacag tgcttggggc ctgctgacct ccagcggaca
caagagcgtg ctacgcagcc aggtgtgtgt acatacgggg tctctctcca
cgccgccaag ccagccgggc ggccgaccg tggggcaggc caggccaggc
cctccctgat ggacgcctg

```

[0264] El polinucleótido del receptor Nogo-1 de rata se muestra a continuación como el ID. SEC. Nº: 82 y es el número de registro NM_053613 en el Genbank.

atgaagaggg cgtcctccgg aggaagccgg ctgccgacat ggggtgttatg
gctacaggcc tggagggtag caacgcctg ccctgggtgcc tgtgtgtgct

acaatgagcc caaggtcaca acaagccgcc cccagcaggg cctgcaggct
gtaccgcgtg gcatcccagc ctccagccag agaattcttc tgcacggcaa
ccgaatctct tacgtgccag ccgccagctt ccagtcatgc cggaaatctca
ccatcctgtg gctgcactca aatgcgctgg ccgggattga tgcgcggcc
ttcactggtc tgaccctcct ggagcaacta gatcttagtg acaatgcaca
gctccgtgtc gtggacccca ccacgttccg tggcctgggc cacctgcaca
cgctgcacct agaccgatgc ggcctgcagg agctggggcc tggcctattc
cgtgggctgg cagctctgca gtacctctac ctacaagaca acaacctgca
ggcacttccc gacaacacct tccgagacct gggcaacctc acgcatctct
ttctgcatgg caaccgtatc cccagtgttc ctgagcacgc ttccgtggc
ttgcacagtc ttgaccgtct cctcttgca cagaacctat tggctcgtgt
gcaccacat gccttccggg accttggccg actcatgacc ctctacctgt
ttgccaacaa cctctccatg ctccccgcag aggtcctagt gccctgagg
tctctgcagt acctgcgact caatgacaac ccctgggtgt gtgactgcag
ggcacgtccg ctctgggcct ggctgcagaa gtcccgaggt tctcatccg
gggtgcccag caacctacct caacgcctgg caggccgtga tctgaagcgc
ctggctacca gtgacttaga gggttgtgct gtggcttcgg ggccttccg
tcccttccag accaatcagc tctctgatga ggagctgctg ggcctccca
agtgtgtcca gccggatgct gcagacaagg cctcagtact ggaacccggg
aggccggcgt ctgttggaat tgcactcaag ggacgtgtgc ctcccggtga
cactccacca ggcaatggct caggccacg gcacatcaat gactctccat
ttgggacttt gcccggtctt gcagagcccc cactgactgc cctgcggcct
gggggttccg agccccggg actgccacc acgggcccc gcaggaggcc
aggttggtcc agaaagaacc gcaccgtag ccactgccgt ctgggcccagg
caggaagtgg gagcagtgga actggggatg cagaagggtc gggggccctg
cctgccctgg cctgcagcct tgctcctctg ggccttgca tgggtactttg
gacagtgtt gggccctgct ga

[0265] El polinucleótido del receptor Nogo-1 de ratón se muestra a continuación como el ID. SEC. N°: 83 y es el número de registro NM_022982 en el Genbank.

```

agccgcagcc cgcgagccca gcccggcccg gtagagcgga gcgcgggagc
ctcgtcccg cggccgggccc ggaccggggc ggagcagcgg cgcctggatg
cggaccgggc cgcgcgcaga cgggcgccc cccgaagcc gcttccagtg
cccgcgcgc cccgctcgac cccgaagatg aagagggcgt cctccggagg
aagcaggctg ctggcatggg tgttatggct acaggcctgg agggtagcaa
caccatggcc tgggtgcttg gtgtgctaca atgagccaa ggtaacaaca
agctgcccc agcagggctc gcaggctgtg cccactggca tcccagctc
tagccagcga atcttcctgc atggcaaccg aatctctcac gtgccagctg
cgagcttcca gtcatgccga aatctcacta tcctgtggct gcactctaata
gcgctggctc ggatcgatgc tgctgccttc actggctctga cctcctgga
gcaactagat cttagtata atgcacagct tcatgtcgtg gaccctacca
cgttccacgg cctggggccac ctgcacacac tgcacctaga ccgatgtggc
ctgcgggagc tgggtcccg cctattcgt ggactagcag cctgcagta
cctctacct caagacaaca atctgcaggc actccctgac aacaccttc
gagacctggg caacctcacg catctcttcc tgcattggca ccgtatcccc
agtgtgcctg agcacgctt cctgtggcctg cacagtcttg accgcctcct
cttgaccag aacctagtgg ctctgttgca cccacatgcc ttccgggacc
ttggcgcct catgacctc tacctgtttg ccaacaacct ctccatgctg
cctgcagagg tctaatagcc cctgaggtct ctgcagtacc tggcactcaa
tgacaacccc tgggtgtgtg actgccgggc acgtccactc tgggcctggc
tcgagaagtt ccgaggttc tcatcagagg tgccctgcaa cctgccccaa
cgctggcag accgtgatct taagcgctc gctgccagtg acctagaggg
ctgtgctgtg gcttcaggac ccttcgctcc catccagacc agtcagctca
ctgatgagga gctgctgagc ctccccaagt gctgccagcc agatgctgca
gacaaagcct cagtactgga accggggagg ccagcttctg ccggaaacgc
cctcaaggga cgtgtgcctc ccggtgacac tccaccaggc aatggctcag
gccctcgga catcaatgac tctccatttg gaactttgcc cagctctgca
gagccccac tgactgcct gcggcctggg ggttccgagc caccaggact
tcccaccact ggtccccgca ggaggccagg ttgttcccg aagaatcgca
ccgcagcca ctgccgtctg ggccaggcgg gaagtggggc cagtgaaca

ggggacgcag aggggttcagg ggctctgcct gctctggcct gcagccttgc
tcctctgggc cttgcactgg tactttggac agtgcttggg ccctgctgac
cagccaccag ccaccagggtg tgtgtacata tggggctctc ctccacgccg
ccagccagag ccagggacag gctctgaggg gcaggccagg cctccctga
cagatgcctc cccaccagcc ccccccatc tccaccccat catgtttaca
gggttccggg ggtggcgctt gttccagaac gccacctccc acccgatcg
cggatatatag agatatgaat ttatttttac ttgtgtaaaa tatcgatga
cgtggaataa agagctctt tcttaaaaaa aaaaaaaaaa aa

```

[0266] El polinucleótido del receptor Nogo-2 humano se muestra a continuación como el ID. SEC. N°: 84 y es el número de registro BK001302 en el Genbank.

```

atgctgcccg ggctcaggcg cctgctgcaa gctcccgcct cggcctgcct
cctgctgatg ctcttgcccc tgccccctggc ggccccccagc tgccccatgc
tctgcacctg ctactcatcc ccgcccaccg tgagctgcca ggccaacaac
ttctcctctg tgccgctgtc cctgccaccc agcactcagc gactcttctt
gcagaacaac ctcatccgca cgtcgcggcc aggcaccttt ggggtccaacc
tgctcaccct gtggctcttc tccaacaacc tctccaccat ctaccgggc
actttccgcc acttgcaagc cctggaggag ctggacctcg gtgacaaccg
gcacctgcgc tcgctggagc ccgacacctt ccagggcctg gagcggtgc
agtgcctgca tttgtaccgc tgccagctca gcagcctgcc cggcaacatc
ttccgaggcc tggtcagcct gcagtacctc tacctccagg agaacagcct
gctccacctc caggatgact tgttcgcgga cctggccaac ctgagccacc
tcttctcca cgggaaccgc ctgcggtgc tcacagagca cgtgtttcgc
ggcctggggc gcctggaccg gctgctgctg caogggaaac ggtgcaggg
cgtgcaccgc gcggccttcc gcggcctcag ccgctcacc atcctctacc
tgttcaacaa cagcctggcc tcgctgcccc gcgaggcgct cgccgacctg
ccctcgctcg agttcctgcg gctcaacgct aacctctggg cgtgcgactg
ccgcgcgcgg ccgctctggg cctgggtcca gcgcgcgcgc gtgtccagct
ccgacgtgac ctgcgccacc ccccgaggc gccagggccg agacctgcgc
gcgctccgcg aggcgcgactt ccaggcggtg ccgcccgcgg caccacgcg
gccgggcagc cgcgcccgcg gcaacagctc ctccaaccac ctgtacgggg
tggcagaggc cggggcgccc ccagccgac cctccaccct ctaccgagat
tgctcctgcg aagactcgcg ggggcgcccag ggcggggacg cgctactga
ggacgactac tgggggggct acgggggtga ggaccagcga ggggagcaga
tgtgcccccg cgtgcctgc caggcgcccc cggactcccg aggcctgcg
ctctcgccg ggctcccag ccctctgctt tgctctctgc tctggtgce
ccaccacctc tga

```

[0267] El polinucleótido del receptor Nogo-2 de ratón se muestra a continuación como el ID. SEC. Nº: 85 y es el número de registro NM_199223 en el Genbank.

5

```

atgctgcccg ggctcggcg cctgctgcaa ggtcctgcct cagcctgcct
actgctgaca ctcttgcccc ttcttctcgt gacccccagc tgtcctatgc
tctgcacctg ctactcctcc ccgcccaccg tgagctgcca ggccaacaac
ttctcctcag tgccgctgtc cttgccaccc agtacacaga gactcttctt
gcagaacaac ctcatccgct cactcgggcc aggcaccttt gggcccaacc
tgctcaccct gtggctcttc tccaacaacc tctccaccat ccacttggc
accttccgcc acctgcaggc cctagaagaa ctggacctcg gtgacaaccg
gcacctgcgc tccctggagc ccgacacctt ccagggtctg gagaggctgc
agtactaca cctgtatcgt tgccagctca gcagcctgcc tggcaacatt
ttccgaggct tggtcagcct acagtacctc tacctccagg agaacagcct
gctccatcta caggatgact tgttcgcgga cctggccaac ctgagccacc
tcttctcca cgggaaccgc ctgcggtgc tcacggagca cgtgttccgc
ggcttgggca gcctggaccg gctgttgcgt cacgggaacc ggtgcaggg
cgtgcaccgc gcggcttcc acggcctcag ccgctcacc atcctctacc
tgttcaacaa cagcctggcc tcgctgcccg gagaggcgct ggccgacctg
ccggcgctcg agttcctgcg gctcaacgcc aacctctggg cgtgcgactg
ccgcgctcgg ccgctctggg cttgggtcca gcgcgcgcgg gtgtccagct
ccgacgtgac ctgcgccacc ccgcccagc gccagggccg ggacctgcgc

```

```

gcgctgcgcg actccgattt ccaagcgtgc ccgcccacca cggccacgcg
gccgggcagc cgcgcccgcg gcaacagctc ttccaaccac ctgtacggcg
tgcccgaggc tggcgctccc ccgcagacc cgtccacgct ctaccgagat
ctgcgcccg aggactcgcg ggggcgcccag ggcggggacg cgccaccga
ggacgactac tgggggggct acggcgccga ggatcagcgg ggcgagcaga
cgtgtccccg ggccgcgtgc caggcgcccc cagactcgcg tggccccgcg
ctctcgccg ggctgcgcac ccctctgctc tgctctctgc cctggcgct
ccatcacctctga

```

[0268] El polinucleótido del receptor Nogo-3 humano se muestra a continuación como el ID. SEC. Nº: 86 y es el número de registro BK001305 en el Genbank.

```

atgcttcgca aagggtgctg tgtggagtgt ctgctgctgt tggtagctgc
ggagctgccc ctgggtggtg gctgcccacg ggactgtgtg tgctaccggg
cgcccatgac ggtcagctgc caggcgacac actttgcagc catcccgagg
ggcatccccg tggacagcga gcgctcttc ctgcagaaca accgcatcgg
cctcctccag cccggccact tcagcccgcc catggtcacc ctgtggatct
actcgaacaa catcacctac atccacccca gcaccttcga gggcttcgtg
cacctggagg agctggacct cggcgacaac cggcagctgc ggacgctggc
acccgagacc ttccagggcc tgggtgaagct tcacgccttc tacctctaca
agtgtgggct cagcgcttgc cgggcccggc tctttggcgg cctgcacagc
ctgcagtacc tctacctgca ggacaaccac atcgagtacc tccaggacga
catcttcgtg gacctggtca acctcagcca cctgtttctc cacggcaaca
agctgtggag tctggggccc ggcaccttcc ggggctggt gaacctggac
cgtctttttg tgacagagaa ccagctgcag tgggtccacc acaaggcatt
ccacgacctc cgcaggctga ccacctctt cctcttcaac aacagcctct
cggagctgca ggggtgagtgc ctggcccgcg tggggggcct ggagttcctc
cgctcaatg gcaacccctg ggactgtggt tgtcgcgcg cctcctgtg
ggaatggctg cagaggttcc ggggctccag ctccgctgtc ccctgtgtgt
cccctgggct gcggcacggc caggacctga agctgctgag ggccgaggac
ttccggaact gcacgggacc agcgtccccg caccagatca agtcacacac
gctcaccacc accgacaggg ccgcccgcga ggaacaccac tcacccacg
gccccaccag gagcaagggc caccgcacg gcccccgcc cggccacagg
aagccgggga agaactgcac caaccccagg aaccgcaatc agatctctaa
ggcggggcgcc gggaaacagg cccccgagct gccagactat gccccagact
accagcaciaa gttcagtttt gacatcatgc ctacggcccg gcccagagg
aagggaagt gtgcccgcag gacccccatc cgtgccccca gcggggtgca
gcaggcctcc tcggccagtt cctgggggc cccctcctg gcctggacac
tggggctggc ggtcactctc cgctga

```

5

[0269] El polinucleótido del receptor Nogo-3 de ratón se muestra a continuación como el ID. SEC. Nº: 87 y es número de registro BK001304 en el Genbank.

```

atgcttcgca aagggtgctg tgtggaattg ctgctgttgc tgctcgctgg
agagctacct ctgggtgggtg gttgtcctcg agactgtgtg tgctaccctg
cgcccatgac tgtcagctgc caggcacaca actttgctgc catcccggag
ggcatcccag aggacagtga gcgcattctc ctgcagaaca atcgcatcac
cttctccag cagggccact tcagcccgcc catggtcacc ctctggatct
actccaacaa catcactttc attgctccca acaccttcga gggctttgtg
catctggagg agctagacct tggagacaac cgacagctgc gaacgctggc
accgagagacc ttccaaggcc tgggtgaagct tcacgccctc tacctctata
agtgtggact gagcgccctg cccgcaggca tctttggtgg cctgcacagc
ctgcagtatc tctacttgca ggacaaccat atcgagtacc tccaagatga
catctttgtg gacctgggtc atctcagtca cttgtttctc catggttaaca
agctatggag cctggggccaa ggcattctcc ggggcctggt gaacctggac
cgggttgctg tgcattgagaa ccagctacag tgggttcacc acaaggcttt
ccatgacctc cacaggctaa ccacctctt tctcttcaac aacagcctca
ctgagctgca ggggtgactgt ctggccccc tggtggcctt ggagttcctt
cgctcaatg ggaatgcttg ggactgtggc tgccggggcac gttccctgtg
ggaatggctg cgaagggtcc gtggtctctag ctctgctgtc cctgcgcgga
cccccgagct gcggcaaggc caggatctga agctgctgag ggtggaggac

```

```

ttccggaact gcacaggacc agtgtctcct caccagatca agtctcacac
gcttaccacc tctgacaggg ctgcccgcga ggagcaccat ccttcccatg
gggctccag ggacaaaggc caccacatg gccatccgcc tggctccagg
tcagggttaca agaaggcagg caagaactgc accagccaca ggaaccggaa
ccagatctct aagggtgagct ctgggaaaga gcttaccgaa ctgcaggact
atgccccga ctatcagcac aagttcagct ttgacatcat gccaccgca
cgacccaaga ggaaggggcaa gtgtgctcgc aggaccccca tccgtgcccc
cagtgggggtg cagcaggcat cctcaggcac ggccttggg gccccactcc
tgccctggat actggggctg gcagtcactc tccgtga

```

Antagonistas del polinucleótido NgR1

- 5 **[0270]** Algunos casos específicos comprenden antagonistas del polinucleótido NgR1 que impiden la expresión del NgR1 (inactivado). Los antagonistas del polinucleótido NgR1 incluyen, pero no se limitan a, moléculas antisentido, ribozimas, ARNip, ARNph y ARNi. Normalmente, dichas moléculas de unión se administran por separado al animal (véase, por ejemplo, O'Connor, J. Neurochem. 56: 560 (1991), pero dichas moléculas de unión también pueden ser expresadas *in vivo* a partir de los polinucleótidos captados por una célula hospedadora y
- 10 expresadas *in vivo*. Véase también Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988).

- [0271]** La expresión del gen del NgR puede ser inhibida, en algunos casos, mediante el uso de un ARN de interferencia ("ARNi"). ARNi se refiere a la expresión de un ARN que interfiere con la expresión del ARNm objetivo.
- 15 El ARNi es un fenómeno en el que la introducción de ARN bicatenario (ARNbc) en una célula provoca la degradación del ARNm homólogo. Desde que se descubrió por primera vez en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, se ha averiguado que el ARNi opera en una amplia variedad de organismos. Un "ácido nucleico de ARNi" según se usa en el presente documento es una secuencia de ácidos nucleicos generalmente menor de 50 nucleótidos de longitud, que provoca el silenciamiento génico a nivel del ARNm.

- 20 **[0272]** Por ejemplo, en células de mamífero, la introducción de grandes ARNbc (> 30 nucleótidos) puede iniciar una potente respuesta antivírica, ejemplificada por la inhibición no específica de la síntesis de proteínas y la degradación del ARN. El ARN de interferencia proporciona un mecanismo de silenciamiento génico a nivel del ARNm. En los últimos años, el ARNi se ha transformado en una potente técnica endógena de silenciamiento génico
- 25 específico que usa ARN bicatenarios (ARNbc) para marcar un transcrito en particular para su degradación *in vivo*. También ofrece una metodología eficiente y ampliamente aplicable para la inactivación génica. Además, la tecnología del ARNi puede usarse con fines terapéuticos. Por ejemplo, se ha demostrado que el direccionamiento del ARNi a la apoptosis mediada por Fas protege a ratones de una hepatitis fulminante. La tecnología del ARNi se ha divulgado en numerosas publicaciones, tales como en las Patentes de EE.UU. N° 5.919.619, 6.506.559 y en las
- 30 Publicaciones PCT N° WO99/14346, WO01/70949, WO01/36646, WO00/63364, WO00/44895, WO01/75164, WO01/92513, WO01/68836 y WO01/29058.

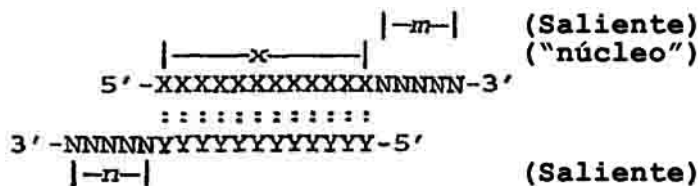
[0273] Específicamente, el ARNi silencia un gen objetivo a través de la interacción con un ARNm específico (por ejemplo, NgR1) a través de un ARNip (ARN de interferencia pequeño). Entonces el complejo de ARNbc es dirigido para su degradación por la célula. Algunas moléculas adicionales de ARNi incluyen ARN (ARNph); también de interferencia pequeño en horquilla. La molécula de ARNph contiene las secuencias sentido y antisentido de un gen objetivo conectadas mediante un bucle. El ARNph es transportado desde el núcleo hacia el citoplasma, es degradado junto con el ARNm. Pueden usarse los promotores Pol III o U6 para expresar ARN para el ARNi. Una secuencia capaz de inhibir la expresión génica mediante un ARN de interferencia puede tener cualquier longitud. Por ejemplo, la secuencia puede tener al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35; 40, 45, 50, 100 o más nucleótidos consecutivos. La secuencia puede ser un ARNbc o cualquier otro tipo de polinucleótido, con la condición de que la secuencia pueda formar un complejo de silenciamiento funcional para la degradación del transcrito objetivo de ARNm.

[0274] El ARNi está mediado por moléculas de ARN bicatenario (ARNbc) que tienen una homología específica de secuencia con sus ARNm "objetivo" (Caplen y col., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 98: 9742 - 9747, 2001). Los estudios bioquímicos en lisados de *Drosophila* exentos de células indican que los mediadores del silenciamiento génico dependiente de ARN son dúplex de 18 - 25 nucleótidos de ARN "de interferencia pequeño" (ARNip). Consecuentemente, las moléculas de ARNip se usan ventajosamente en los métodos de la presente divulgación. Los ARNip pueden ser producidos endógenamente mediante la degradación de moléculas mayores de ARNbc por una nucleasa relacionada con la RNasa III denominada Dicer. (Bernstein y col., Nature 409: 363 - 366, 2001). Los ARNip también pueden ser introducidos en una célula exógenamente, o mediante la transcripción de un constructo de expresión. Una vez formados, los ARNip se ensamblan con los componentes proteicos de complejos que contienen endorribonucleasa conocidos como complejos de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Un desenrollamiento del ARNip generado por ATP activa los RISC, que a su vez se dirigen al transcrito del ARNm complementario mediante un apareamiento de bases de Watson-Crick. Sin desear ceñirnos a ninguna teoría en particular, se cree que un RISC es guiado hacia un ARNm objetivo en el que el dúplex de ARNip interactúa específicamente con la secuencia para mediar en la escisión de una forma catalítica (Bernstein y col., Nature 409: 363 - 366, 2001; Boutla y col., Curr Biol 11: 1776 - 1780, 2001). La escisión del ARNm tiene lugar cerca el centro de la región unida por la hebra de ARNip. Esta degradación específica de la secuencia del ARNm da como resultado un silenciamiento génico.

[0275] El ARNi se ha usado para analizar la función génica y para identificar genes esenciales en células de mamífero (Elbashir y col., Methods 26: 199 - 213, 2002; Harborth y col., J Cell Sci 114: 4557 - 4565, 2001), incluyendo, a modo de ejemplo no limitante, neuronas (Krichevsky y col., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 99: 11926 - 11929, 2002). El ARNi también está siendo evaluado en modalidades terapéuticas, tales como la inhibición o el bloqueo de la infección, la replicación y/o el crecimiento de virus, incluyendo, sin limitación, poliovirus (Gitlin y col., Nature 418: 379 - 380, 2002) y VIH (Capodici y col., J Immunol 169: 5196 - 5201, 2002) y la reducción de la expresión de oncogenes (por ejemplo, el gen bcr-abl; Scherr y col., Blood, 26 septiembre de 2002, publicado electrónicamente previamente a su publicación en papel). El ARNi se ha usado para modular la expresión génica en embriones de mamífero (ratón) y de anfibio (*Xenopus*) (respectivamente, Calegari y col., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 99: 14236 - 14240, 2002; y Zhou, y col., Nucleic Acids Res 30: 1664 - 1669, 2002) y en ratones postnatales (Lewis y col., Nat Genet 32: 107 - 108, 2002) y para reducir la expresión transgénica en ratones transgénicos adultos (McCaffrey y col., Nature 418: 38 - 39, 2002). Se han descrito métodos para la determinación de la eficacia de la especificidad de los ARNip en cultivos celulares e *in vivo* (véase, por ejemplo, Bertrand y col., Biochem Biophys Res Commun 296: 1000 - 1004, 2002; Lassus y col., Sci STKE 2002 (147): PL13, 2002; y Leirdal y col., Biochem Biophys Res Commun 295: 744 - 748, 2002).

[0276] Las moléculas que median en el ARNi, incluyendo, sin limitación, el ARNip, pueden ser producidas *in vitro* mediante una síntesis química (Hohjoh, FEBS Lett 521: 195 - 199, 2002), una hidrólisis del ARNbc (Yang y col., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 99: 9942 - 9947, 2002), mediante una transcripción *in vitro* con polimerasa T7 de ARN (Donzeet y col., Nucleic Acids Res 30: e46, 2002; Yu y col., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 99: 6047 - 6052, 2002) y mediante una hidrólisis del ARN bicatenario mediante el uso de una nucleasa tal como la RNasa III de *E. coli* (Yang y col., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 99: 9942 - 9947, 2002).

[0277] Las moléculas de ARNip también pueden formarse mediante el apareamiento de dos oligonucleótidos entre sí, que normalmente tienen la siguiente estructura general, que incluye porciones tanto bicatenarias como monocatenarias:



[0278] En las que N, X e Y son nucleótidos; el hidrógeno X se une a Y; ":" significa un puente de hidrógeno entre dos bases; x es un número entero natural que tiene un valor de entre 1 y aproximadamente 100; y m y n son números enteros completos que tienen, independientemente, unos valores de entre 0 y aproximadamente 100. En algunos casos, N, X e Y son independientemente A, G, C y T o U. Puede haber presentes bases y nucleótidos no naturales, particularmente en el caso de un ARNip sintético (es decir, el producto del apareamiento de dos oligonucleótidos). La sección central bicatenaria se denomina "núcleo" y tiene pares de bases (pb) como unidades de medida; las porciones monocatenarias son salientes que tienen nucleótidos (nt) como unidades de medida. Los salientes mostrados son salientes en 3', pero las moléculas con salientes en 5' también están en el ámbito de la divulgación. También están en el ámbito de la divulgación las moléculas de ARNip que no tienen ningún saliente (es decir, m = 0 y n = 0) y aquellas que tienen un saliente en un lado del núcleo pero ninguno en el otro (por ejemplo, m = 0 y n > 1, o viceversa).

15 **[0279]** Inicialmente, la tecnología del ARNi no parecía ser fácilmente aplicable a sistemas de mamíferos. Esto es debido, en los mamíferos, a que el ARNbc activa la cinasa de proteínas activada por el ARNbc (PKR) que da como resultado una cascada apoptótica y la muerte celular (Der y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 94: 3279-3283, 1997). Además, durante mucho tiempo se ha sabido que el ARNbc activa la cascada del interferón en las células de mamífero, que también puede dar lugar a una fisiología celular alterada (Colby y col., Annu. Rev. Microbiol. 25: 333, 1971; Kleinschmidt y col., Annu. Rev. Biochem. 41: 517, 1972; Lampson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 58: L782, 1967; Lomniczy y col., J. Gen. Virol. 8: 55, 1970; e Younger y col., J. Bacteriol. 92: 862, 1966). Sin embargo, la activación mediada por el ARNbc de las cascadas de la PKR y del interferón requiere un ARNbc mayor de aproximadamente 30 pares de bases. Por el contrario, se ha demostrado que un ARNbc menor de 30 pares de bases de longitud causa el ARNi en células de mamífero (Caplen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98: 9742 - 9747, 2001). Por lo tanto, se espera que puedan evitarse los efectos no específicos indeseables asociados con las moléculas más grandes de ARNbc mediante la preparación de un ARN pequeño que esté sustancialmente exento de ARNbc más grandes.

[0280] Referencias relativas al ARNip: Bernstein y col., Nature 409: 363 - 366, 2001; Boutla y col., Curr Biol 30 11: 1776 - 1780, 2001; Cullen, Nat Immunol. 3: 597 - 599, 2002; Caplen y col., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 98: 9742 - 9747, 2001; Hamilton y col., Science 286: 950 - 952, 1999; Nagase y col., ADN Res. 6: 63 - 70, 1999; Napoli y col., Plant Cell 2: 279 - 289, 1990; Nicholson y col., Mamm. Genome 13: 67 - 73, 2002; Parrish y col., Mol Cell 6: 1077 - 1087, 2000; Romano y col., Mol Microbiol 6: 3343 - 3353, 1992; Tabara y col., Cell 99: 123 - 132, 1999; y Tuschl, Chembiochem. 2: 239 - 245, 2001.

[0281] Paddison y col. (Genes & Dev. 16: 948 - 958, 2002) han usado moléculas de ARN pequeño plegadas en horquilla como un medio para efectuar el ARNi. Consecuentemente, dicho ARN pequeño en horquilla (las moléculas de ARNph también se usan ventajosamente en los métodos de la divulgación. La longitud del tallo y del bucle del ARNph funcional varía; los tallos pueden tener una longitud cualquiera desde aproximadamente 25 hasta 40 aproximadamente 30 nt, y el tamaño del bucle puede variar desde 4 hasta aproximadamente 25 nt sin que afecte a la actividad silenciadora. Sin desear ceñirnos a ninguna teoría en particular, se cree que estos ARNph se asemejan a los productos de ARNbc de la RNasa DICER y en cualquier caso, tienen la misma capacidad para inhibir la expresión de un gen específico.

45 **[0282]** En algunos casos, la divulgación proporciona que ese ARNip o ARNph inhibe la expresión del NgR1.
En algunos casos, la divulgación también proporciona que ese ARNip o ARNph es idéntico en al menos el 80 %, el
90 % o el 95 % a la secuencia de nucleótidos que comprende: CUACUUCUCCGCGAGGCG (ID. SEC. Nº: 52) o
CCCGGACCGACGUCUCAA (ID. SEC. Nº: 54) o CUGACCACUGAGUCUCCG (ID. SEC. Nº: 56). En otros casos,
la secuencia de nucleótidos del ARNip o del ARNph es CUACUUCUCCGCGAGGCG (ID. SEC. Nº: 52) o
50 CCCGGACCGACGUCUCAA (ID. SEC. Nº: 54) o CUGACCACUGAGUCUCCG (ID. SEC. Nº: 56).

[0283] En algunos casos, la divulgación también proporciona que la secuencia de nucleótidos del ARNip o del ARNph es complementaria del ARNm producido por la secuencia del polinucleótido GATGAAGAGGGCGTCC GCT (ID. SEC. Nº: 53) o GGGCCTGGCTGCAGAAGTT (ID. SEC. Nº: 55) o GACTGGTGA CT CAGAG AAGGC (ID. SEC.

Nº: 57).

[0284] En algunos casos de la divulgación, el ARNph es expresado a partir de un vector lentivírico según se describe en el Ejemplo 26.

5

[0285] La síntesis química de moléculas de ácidos nucleicos con modificaciones (base, azúcar y/o fosfato) puede impedir su degradación por las ribonucleasas séricas, lo que puede incrementar su potencia (véase, por ejemplo, Eckstein y col., Publicación Internacional Nº WO 92/07065; Perrault y col., Nature 344: 565 (1990); Pieken y col., Science 253: 314 (1991); Usman y Cedergren, Trends en Biochem. Sci. 17: 334 (1992); Usman y col., Publicación Internacional Nº WO 93/15187; y Rossi y col., Publicación Internacional Nº WO 91/03162; Sproat, Patente de EE.UU. Nº 5.334.711; Gold y col., Patente de EE.UU. Nº 6.300.074; y Burgin y col.), *supra*. Todas las referencias anteriores describen diversas modificaciones químicas que pueden ser realizadas a las fracciones de la base, del fosfato y/o del azúcar de las moléculas de ácidos nucleicos descritas en las mismas. Se desean modificaciones que mejoren su eficacia en las células y la eliminación de las bases de una molécula de ácido nucleico para acortar los tiempos de síntesis del oligonucleótido y reducir los requisitos químicos.

[0286] Existen numerosos ejemplos en la materia que describen las modificaciones del azúcar, de la base y del fosfato que pueden ser introducidas en moléculas de ácido nucleicos con una mejora significativa en su estabilidad frente a nucleasa y en su eficacia. Por ejemplo, los oligonucleótidos se modifican para mejorar la estabilidad y/o para mejorar su actividad biológica mediante la modificación con grupos resistentes a la nucleasa, por ejemplo, 2'-amino, 2'-C-alilo, 2'-flouro, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-H, modificaciones de bases de nucleótidos (para una revisión, véase Usman y Cedergren, TIBS. 17: 34 (1992); Usman y col., Nucleic Acids Symp. Ser. 31: 163 (1994); Burgin y col., Biochemistry 35: 14090 (1996)). Las modificaciones del azúcar de moléculas de ácido nucleicos han sido ampliamente descritas en la materia (véase Eckstein y col., Publicación Internacional PCT Nº WO 92/07065; Perrault y col., Nature 344: 565 - 568 (1990); Pieken y col., Science 253: 314 - 317 (1991); Usman y Cedergren, Trends en Biochem. Sci. 17: 334 - 339 (1992); Usman y col., Publicación Internacional PCT Nº WO 93/15187; Sproat, Patente de EE.UU. Nº 5.334.711 y Beigelman y col., J. Biol. Chem. 270: 25702 (1995); Beigelman y col., Publicación Internacional PCT Nº WO 97/26270; Beigelman y col., Patente de EE.UU. Nº 5.716.824; Usman y col., Patente de EE.UU. Nº 5.627.053; Woolf y col., Publicación Internacional PCT Nº WO 98/13526; Karpeisky y col., 1998, Tetrahedron Lett. 39: 1131 (1998); Earnshaw y Gait, Biopolimers (Nucleic Acid Sciences) 48: 39 - 55 (1998); Verma y Eckstein, Annu. Rev Biochem. 67: 99 - 134 (1998); y Burlina y col., Bioorg. Med. Chem. 5: 1999 - 2010 (1997)). Dichas publicaciones describen métodos y estrategias generales para la determinación de la ubicación de la incorporación de las modificaciones del azúcar, de la base y/o del fosfato y similares en moléculas de ácidos nucleicos sin una catálisis moduladora. A la vista de dichas enseñanzas pueden usarse modificaciones similares según se describe en el presente documento para modificar las moléculas de ácidos nucleicos de ARNip de la actual divulgación, siempre que la capacidad del ARNip para promover el ARNi en las células no se vea significativamente inhibida.

[0287] La divulgación presenta moléculas modificadas de ARNip, con modificaciones en el esqueleto de fosfato que comprenden una o más sustituciones con fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosfotriéster, morfolino, amidato carbamato, carboximetilo, acetamidato, poliamida, sulfonato, sulfonamida, sulfamato, formacetal, tioformacetal y/o alquilsililo,. Para una revisión de las modificaciones en el esqueleto del oligonucleótido, véase Hunziker y Leumann, Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties, en Modern Synthetic Methods, VCH, 331 - 417 (1995) y Mesmaeker y col., Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, en Carbohydrate Modifications in Antisense Research, ACS, 24 - 39 (1994).

[0288] Aunque la modificación química de los enlaces internucleotídicos de los oligonucleótidos con enlaces de fosforotioato, de fosforotioato y/o de 5'-metilfosfonato mejora la estabilidad, unas modificaciones excesivas pueden provocar una cierta toxicidad o disminuir la actividad. Por lo tanto, cuando se diseñan moléculas de ácidos nucleicos, la cantidad que estos enlaces internucleotídicos debe ser minimizada. La reducción en la concentración de estos enlaces debería reducir la toxicidad, dando como resultado un aumento en la eficacia y una mayor especificidad de estas moléculas.

[0289] Se proporcionan moléculas de ARNip que tienen unas modificaciones químicas que mantienen o mejoran la actividad. Dicho ácido nucleico también es generalmente más resistente a las nucleasas que un ácido nucleico sin modificar. Consecuentemente, la actividad *in vitro* y/o *in vivo* no debería reducirse significativamente. En los casos en los que el objetivo es una modulación, las moléculas de ácidos nucleicos terapéuticas administradas de forma exógena deberían ser óptimamente estables dentro de las células hasta que la traducción del ARN objetivo haya sido modulada lo suficiente como para reducir los niveles de la proteína indeseable. El período de tiempo varía entre horas y días dependiendo del estado de la enfermedad. Las mejoras en la síntesis química del ARN y del ADN

(Wincott y col., Nucleic Acids Res. 23: 2677 (1995); Caruthers y col., Methods in Enzymology 211: 3 - 19 (1992)) han expandido la capacidad de modificar moléculas de ácidos nucleicos mediante la introducción de modificaciones de nucleótidos que mejoran su estabilidad frente a la nucleasa, como se ha descrito anteriormente.

5 **[0290]** Los polinucleótidos de la presente divulgación pueden incluir uno o más (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) nucleótidos de pinza de G. Un nucleótido de pinza de G es un análogo de citosina modificada, en el que las modificaciones confieren la capacidad de crear puentes de hidrógeno tanto en la cara de Watson-Crick como de Hoogsteen de una guanina complementaria de un dúplex, véase, por ejemplo, Lin y Matteucci, J. Am. Chem. Soc. 120: 8531 - 8532 (1998). Una única sustitución de un análogo de pinza
10 de G en un oligonucleótido puede dar como resultado una estabilidad térmica de la hélice sustancialmente mejorada y la discriminación del desapareamiento cuando se hibrida con oligonucleótidos complementarios. La inclusión de dichos nucleótidos en los polinucleótidos de la divulgación da como resultado una mejora tanto en la afinidad como en la especificidad hacia los ácidos nucleicos objetivo, las hebras complementarias o las hebras de molde. Los polinucleótidos de la presente divulgación también pueden incluir uno o más (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3,
15 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más) nucleótidos LNA de "ácido nucleico bloqueado", tal como un 2', 4'-C mitilen biciclo nucleótido (véase, por ejemplo, Wengel y col., Publicación Internacional PCT N° WO 00/66604 y WO 99/14226).

[0291] La presente divulgación también presenta conjugados y/o complejos de las moléculas del ARNip de la divulgación. Dichos conjugados y/o complejos pueden usarse para facilitar la administración de las moléculas del
20 ARNip a un sistema biológico, tal como una célula. Los conjugados y los complejos proporcionados por la actual divulgación pueden impartir una actividad terapéutica mediante la transferencia de compuestos terapéuticos a través de las membranas celulares, alterando la farmacocinética y/o modulando la localización de las moléculas de ácidos nucleicos de la divulgación. La presente divulgación engloba el diseño y la síntesis de nuevos conjugados y complejos para la administración de moléculas, que incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, lípidos,
25 fosfolípidos, nucleósidos, nucleótidos, ácidos nucleicos, anticuerpos, toxinas, polímeros cargados negativamente y otros polímeros, por ejemplo, proteínas, péptidos, hormonas, carbohidratos, polietilenglicoles o poliaminas, a través de las membranas celulares. En general, los transportadores descritos están diseñados para ser usados bien individualmente o bien como parte de un sistema multicomponente, con o sin conectores degradables. Se espera que estos compuestos mejoren la administración y/o la localización de las moléculas de ácidos nucleicos de la
30 divulgación en diversos tipos celulares procedentes de diferentes tejidos, en presencia o en ausencia de suero (véase Sullenger y Cech, Patente de EE.UU. N° 5.854.038). Los conjugados de las moléculas descritas en el presente documento pueden ser unidos a moléculas biológicamente activas a través de conectores que son biodegradables, tales como moléculas conectadas de ácidos nucleicos biodegradables.

35 **[0292]** Los polinucleótidos terapéuticos (por ejemplo, las moléculas de ARNip) administrados de forma exógena son óptimamente estables en las células hasta que se ha modulado la transcripción inversa del ARN lo suficiente como para reducir los niveles del transcrito del ARN. Las moléculas de ácidos nucleicos son resistentes a las nucleasas con objeto de funcionar como unos agentes terapéuticos intracelulares eficaces. Las mejoras en la síntesis química de las moléculas de ácidos nucleicos descritas en la actual divulgación y en la materia han
40 expandido la capacidad de modificar las moléculas de ácidos nucleicos mediante la introducción de modificaciones en los nucleótidos para mejorar su estabilidad frente a la nucleasa como se ha descrito anteriormente.

[0293] La presente divulgación también proporciona moléculas de ARNip que tienen modificaciones químicas que mantienen o mejoran la actividad enzimática de las proteínas implicadas en el ARNi. Dichos ácidos nucleicos
45 también son generalmente más resistentes a las nucleasas que los ácidos nucleicos no modificados. Por lo tanto, la actividad *in vitro* y/o *in vivo* no debería reducirse significativamente.

[0294] El uso de las moléculas basadas en polinucleótidos de la divulgación emitirá un mejor tratamiento de la progresión de la enfermedad proporcionando la posibilidad de terapias de combinación (por ejemplo, múltiples
50 moléculas de ARNip dirigidas a diferentes genes; moléculas de ácidos nucleicos acopladas con pequeñas moléculas moduladoras conocidas; o el tratamiento intermitente con combinaciones de moléculas, incluyendo diferentes motivos y/u otras moléculas químicas o biológicas). El tratamiento de sujetos con las moléculas de ARNip también puede incluir combinaciones de diferentes tipos de moléculas de ácidos nucleicos, tales como moléculas de ácidos nucleicos enzimáticas (ribozimas), alozimas, antisentido, 2,5-A oligoadenilato, señuelos, aptámeros etc.

55 **[0295]** En otro aspecto, una molécula de ARNip de la divulgación puede comprender una o más estructuras protegidas en 5' y/o en 3', por ejemplo, únicamente en la hebra del ARNip sentido, en la hebra del ARNip antisentido o en ambas hebras del ARNip.

60 Por "estructura protegida" se entienden modificaciones químicas que han sido incorporadas en cualquier extremo del

oligonucleótido (véase, por ejemplo, Adamic y col., Patente de EE.UU. Nº 5.998.203). Estas modificaciones terminales protegen la molécula de ácido nucleico de la degradación por exonucleasa y pueden ayudar en la administración y/o en la localización dentro de una célula. La protección puede estar presente en el 5'-terminal (protección en 5') o en el 3'-terminal (protección en 3') o puede estar presente en ambos extremos. En algunos ejemplos no limitantes: la protección en 5' se elige de entre el grupo que comprende un residuo (fracción) abásico invertido; 4',5-etilen nucleótido; 1-(beta D-eritrofuranosil) nucleótido, 4'-tio nucleótido; nucleótido carbocíclico; 1,5-anhidrohexitol nucleótido; L-nucleótidos; alfa-nucleótidos; nucleótido de base modificada; enlace de fosforoditioato; treopentofuranosil nucleótido; 3',4'-seco nucleótido acíclico; 3,4-dihidroxibutil nucleótido acíclico; 3,5-dihidroxipentil nucleótido acíclico, fracción de nucleótido invertida 3'-3'; fracción abásica invertida 3'-3'; fracción de nucleótido invertida 3'-2'; fracción abásica invertida 3'-2'; 1,4-butanodiol fosfato; 3'-fosforamidato; hexilfosfato; aminohekil fosfato; 3'-fosfato; 3'-fosforotioato; fosforoditioato; o fracción de metilfosfonato de puente o no de puente.

[0296] La protección en 3' puede elegirse de entre un grupo que comprende, 4',5'-metilen nucleótido; 1-(beta-D-eritrofuranosil) nucleótido; 4'-tio nucleótido, nucleótido carbocíclico; 5'-amino-alkil fosfato; 1,3-diamino-2-propil fosfato; 3-aminopropil fosfato; 6-aminohekil fosfato; 1,2-aminododecil fosfato; hidroxipropil fosfato; 1,5-anhidrohexitol nucleótido; L-nucleótido; alfa-nucleótido; nucleótido de base modificada; fosforoditioato; treopentofuranosil nucleótido; 3',4'-seco nucleótido acíclico; 3,4-dihidroxibutil nucleótido; 3,5-dihidroxipentil nucleótido, fracción de nucleótido invertida 5'-5'; fracción abásica invertida 5'-5'; 5'-fosforamidato; 5'-fosforotioato; 1,4-butanodiol fosfato; 5'-amino; 5'-fosforamidato de puente y/o no de puente, fosforotioato y/o fosforoditioato, metilfosfonato de puente o no de puente y fracciones de 5'-mercapto (para más detalles, véase Beaucage y Iyer, Tetrahedron 49: 1925 (1993)).

[0297] Pueden realizarse varias modificaciones a la estructura de ácidos nucleicos del ARNip para mejorar la utilidad de estas moléculas. Dichas modificaciones mejorarán la vida de almacenamiento, la semivida *in vitro*, la estabilidad y la facilidad de introducción de dichos oligonucleótidos en el sitio objetivo, por ejemplo, para mejorar la penetración de las membranas celulares y conferir la capacidad de reconocer y unirse a las células objetivo.

[0298] La tecnología antisentido puede usarse para controlar la expresión génica a través de un ADN o de un ARN antisentido, o a través de formación de una hélice triple. Las técnicas antisentido se analizan, por ejemplo, en Okano, J. Neurochem. 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988). La formación de la triple hélice se analiza, por ejemplo, en Lee y col., Nucleic Acids Research 6: 3073 (1979); en Cooney y col., Science 241: 456 (1988); y en Dervan y col., Science 251: 1300 (1991). Los métodos se basan en la unión de un polinucleótido a un ADN o a un ARN complementario.

[0299] Por ejemplo, puede usarse la porción codificante en 5' de un polinucleótido que codifica para el NgR1 para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de entre aproximadamente 10 y 40 pares de bases de longitud. Un oligonucleótido de ADN se diseña para que sea complementario de una región del gen implicada en la transcripción, impidiendo así la transcripción y la producción de la proteína objetivo. El oligonucleótido de ARN antisentido hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido objetivo.

[0300] En un caso, los ácidos nucleicos antisentido específicos para el gen del NgR1 son producidos intracelularmente mediante la transcripción de una secuencia exógena. Por ejemplo, se transcribe un vector o una porción del mismo, produciendo un ácido nucleico antisentido (ARN). Dicho vector puede permanecer como episomal o ser integrado cromosómicamente, siempre que pueda ser transcrito para producir el ARN antisentido deseado. Dichos vectores pueden construirse mediante los métodos de la tecnología de ADN recombinante habituales en la materia. Los vectores pueden ser de plásmido, víricos, u otros conocidos en la materia, usados para la replicación y la expresión en células de vertebrados. La expresión de la molécula antisentido puede ser mediante cualquier promotor conocido en la materia que actúe en células de vertebrados, preferiblemente humanas, tales como las descritas en cualquier parte del presente documento.

[0301] La absoluta complementariedad de una molécula antisentido, aunque es preferida, no es necesaria. Una complementariedad de secuencia con al menos una porción de un ARN que codifica para el NgR1, significa una secuencia que tiene la complementariedad suficiente como para ser capaz de hibridar con el ARN, formando un dúplex estable; o puede ensayarse la formación de un triplex. La capacidad para hibridar dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto mayor sea el ácido nucleico que hibrida, mayor es el desapareamiento de bases que puede contener, y formar todavía un dúplex estable (o triplex si fuera el caso). El experto en la materia puede determinar el grado tolerable de desapareamiento mediante el uso de los procedimientos habituales para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

[0302] Los oligonucleótidos que son complementarios del extremo 5' de un ARN mensajero, por ejemplo, la secuencia no traducida en 5' hasta, e incluyendo, el codón de inicio AUG, deberían ser los más eficientes en la

inhibición de la traducción. Sin embargo, se ha demostrado que las secuencias complementarias de las secuencias no traducidas en 3' de los ARNm son también eficaces en la inhibición de la traducción de los ARNm. Véase de forma general, Wagner, R., Nature 372: 333 - 335 (1994). Por lo tanto, podrían usarse los oligonucleótidos complementarios de cualquiera de las regiones no traducidas en 5' o en 3' no codificantes en una metodología antisentido para inhibir la traducción del NgR1. Los oligonucleótidos complementarios de la región no traducida en 5' del ARNm deberían incluir el complemento del codón de inicio AUG. Los oligonucleótidos antisentido complementarios de las regiones codificantes del ARNm son unos inhibidores menos eficaces de la traducción, pero podrían usarse de acuerdo con la divulgación. Los ácidos nucleicos antisentido deberían tener al menos seis nucleótidos de longitud y son preferiblemente oligonucleótidos que varían desde 6 hasta aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En algunos aspectos específicos, el oligonucleótido tiene al menos 10 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos o al menos 50 nucleótidos.

[0303] Los polinucleótidos para su uso en los métodos terapéuticos divulgados en el presente documento, incluyendo los aptámeros descritos a continuación, pueden ser de ADN o de ARN, o mezclas químicas o derivados o versiones modificadas de los mismos, monocatenarios o bicatenarios. El oligonucleótido puede ser modificado en la fracción de la base, en la fracción del azúcar o en el esqueleto de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, la hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos anexos tales como péptidos (por ejemplo, para el direccionamiento hacia los receptores de la célula hospedadora *in vivo*) o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 6553 - 6556 (1989); Lemaitre y col., Proc Natl. Acad. Sci. 84: 648 - 652 (1987)); la Publicación PCT N° WO88/09810, publicada el 15 de diciembre de 1988) o de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la Publicación PCT N° WO89/10134, publicada el 25 de abril de 1988), agentes de escisión desencadenados por la hibridación (véase, por ejemplo, Krol y col., BioTechniques 6: 958 - 976 (1988)) o agentes intercalantes (véase, por ejemplo, Zon, Pharm. Res. 5: 539 - 549 (1988)). Con este fin, el oligonucleótido puede ser conjugado con otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente de reticulación desencadenada por la hibridación, un agente de transporte, un agente de escisión desencadenada por la hibridación, etc.

[0304] Un oligonucleótido antisentido para su uso en los métodos terapéuticos divulgados en el presente documento puede comprender al menos una fracción de base modificada que se elige de entre el grupo que incluye, pero no se limita a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetil-aminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N-6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N-6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N-6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metil éster del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3(3-amino-3-N2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina.

[0305] Un oligonucleótido antisentido para su uso en los métodos terapéuticos divulgados en el presente documento también puede comprender al menos una fracción de azúcar modificada elegida de entre el grupo que incluye, pero no se limita a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

[0306] En otro caso más, un oligonucleótido antisentido para su uso en los métodos terapéuticos divulgados en el presente documento comprende al menos un esqueleto de fosfato modificado elegido de entre el grupo que incluye, pero no se limita a, un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforamidotioato, un fosforamidato, un fosfordiamidato, un metilfosfonato, un fosfotriéster de alquilo y un formacetal o análogos de los mismos.

[0307] En otro caso más, un oligonucleótido antisentido oligonucleótido para su uso en los métodos terapéuticos divulgados en el presente documento es un oligonucleótido α -anomérico. Un oligonucleótido α -anomérico forma híbridos específicos bicatenarios con el ARN complementario, al contrario de la situación habitual, en las hebras que son paralelas entre sí (Gautier y col., Nucl. Acids Res. 15: 6625 - 6641 (1987)). El oligonucleótido es un 2'-O-metilribonucleótido (Inoue y col., Nucl. Acids Res. 15: 6131 - 6148 (1987)), o un análogo químico de ARN-ADN (Inoue y col., FEBS Lett. 215: 327 - 330 (1987)).

[0308] Los polinucleótidos de la divulgación, incluyendo los aptámeros, pueden ser sintetizados mediante los métodos habituales conocidos en la materia, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador automatizado de ADN (tal como los disponibles comercialmente en Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como ejemplos, pueden sintetizarse oligonucleótidos de fosforotioato mediante el método de Stein y col., Nucl. Acids Res. 16: 3209 (1988), los oligonucleótidos de metilfosfonato pueden prepararse mediante el uso de soportes de polímero de vidrio de poro

controlado (Sarin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85: 7448 - 7451(1988)), etc.

[0309] Las composiciones de polinucleótidos para su uso en los métodos terapéuticos divulgados en el presente documento incluyen adicionalmente ARN catalítico o una ribozima (Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT WO 90/11364, publicada el 4 de octubre de 1990; Sarver y col., Science 247: 1222 - 1225 (1990). Se prefiere el uso de ribozimas cabeza de martillo. Las ribozimas cabeza de martillo escinden los ARNm en unas ubicaciones dictadas por las regiones flanqueantes que forman los pares de bases complementarios del ARNm objetivo. El único requisito es que el ARNm objetivo tenga la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y la producción de ribozimas cabeza de martillo es bien conocida en la materia y se describe más completamente en Haseloff y Gerlach, Nature 334: 585 - 591 (1988). Preferiblemente, la ribozima se diseña de tal forma que el sitio de reconocimiento de la escisión esté ubicado cerca del extremo 5' del ARNm objetivo; es decir, para aumentar la eficacia y minimizar la acumulación intracelular de transcritos no funcionales del ARNm.

[0310] Como en la metodología antisentido, las ribozimas para su uso en los métodos diagnósticos y terapéuticos divulgados en el presente documento pueden estar formadas por oligonucleótidos modificados (por ejemplo, para mejorar la estabilidad, el direccionamiento, etc.) y pueden ser administradas a células que expresan el NgR1 *in vivo*. Los constructos de ADN que codifican para la ribozima pueden ser introducidos en la célula de la misma forma a la descrita anteriormente para la introducción del ADN codificante antisentido. Un método de administración preferido implica el uso de un constructo de ADN "que codifica para" la ribozima bajo el control de un fuerte promotor constitutivo, tal como, por ejemplo, el promotor pol III o pol II, de forma que las células transfectadas producirán unas cantidades suficientes de la ribozima para destruir los mensajes endógenos de NgR1 e inhibir la traducción. Dado que las ribozimas, al contrario que las moléculas antisentido, son catalíticas, se necesita una menor concentración intracelular para su eficacia.

25 Aptámeros

[0311] En otro caso, el antagonista NgR1 para su uso en los métodos de la presente divulgación es un aptámero. Un aptámero puede ser un nucleótido o un polipéptido que tiene una secuencia única, tiene la propiedad de unirse específicamente a un objetivo deseado (por ejemplo, un polipéptido) y es un ligando específico de un objetivo dado. Los aptámeros de los nucleótidos de la divulgación incluyen moléculas de ADN bicatenario y de ARN monocatenario que se unen al NgR1.

[0312] Los aptámeros de ácidos nucleicos se seleccionan mediante el uso de métodos conocidos en la materia, por ejemplo, a través del proceso de evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX). El SELEX es un método para la evolución *in vitro* de moléculas de ácidos nucleicos con una elevada especificidad de unión con las moléculas objetivo según se describe, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. Nº 5.475.096, 5.580.737, 5.567.588, 5.707.796, 5.763.177, 6.011.577 y 6.699.843. Otro método de cribado para la identificación de aptámeros se describe en la Patente de EE.UU. Nº 5.270.163. El proceso de SELEX se basa en la capacidad de los ácidos nucleicos de formar diversas estructuras bi y tridimensionales, así como la versatilidad química disponible en los monómeros de nucleótidos para que actúen como ligandos (formen pares de unión específicos) con prácticamente cualquier compuesto químico, tanto monomérico como polimérico, incluyendo otras moléculas de ácidos nucleicos y polipéptidos. Pueden servir como objetivo moléculas de cualquier tamaño o composición.

[0313] El método SELEX implica la selección a partir de una mezcla de oligonucleótidos candidatos y repeticiones por etapas de unión, partición y amplificación, mediante el uso del mismo esquema general de selección, para conseguir la afinidad y la selectividad de unión deseadas. Partiendo de una mezcla de ácidos nucleicos, que preferiblemente comprende un segmento de una secuencia aleatorizada, el método SELEX incluye las etapas de poner en contacto la mezcla con el objetivo en unas condiciones favorables para la unión; particionar los ácidos nucleicos no unidos de aquellos ácidos nucleicos que se han unido específicamente a las moléculas objetivo; disociar los complejos de ácido nucleico-objetivo; amplificar los ácidos nucleicos disociados de los complejos de ácido nucleico-objetivo para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en ligando. Las etapas de unión, partición, disociación y amplificación se repiten durante muchos ciclos según se desee para producir ligandos de ácidos nucleicos con una alta especificidad y una alta afinidad por la molécula objetivo.

[0314] Los aptámeros de nucleótidos pueden usarse, por ejemplo, como herramientas diagnósticas o como inhibidores específicos para interrumpir la señalización intracelular y las rutas de transporte (James (2001) Curr. Opin. Pharmacol. 1: 540 - 546). La elevada afinidad y especificidad de los aptámeros de nucleótidos los hace buenos candidatos para el descubrimiento de fármacos. Por ejemplo, se han aislado los antagonistas aptámeros de la toxina ricina y tienen unos valores de la CI50 en el intervalo nanomolar (Hesselberth JR y col. (2000) J Biol Chem

275: 4937 - 4942). Los aptámeros de nucleótidos también pueden usarse frente a enfermedades infecciosas, cánceres y proteínas de superficie víricas para reducir la infectividad celular.

[0315] Los aptámeros de nucleótidos para su uso en los métodos de la presente divulgación pueden ser modificados (por ejemplo, mediante la modificación del esqueleto o de las bases, o conjugados con péptidos) según se describe en el presente documento para otros polinucleótidos.

[0316] Mediante el uso de la estructura proteica del NgR1, el cribado en busca de aptámeros que actúen sobre el NgR1 mediante el uso del proceso SELEX permitiría la identificación de los aptámeros que inhiben los procesos mediados por el NgR1 (por ejemplo, la inhibición mediada por el NgR1 de la regeneración axonal).

[0317] Los aptámeros de polipéptidos para su uso en los métodos de la presente divulgación son péptidos aleatorios seleccionados por su capacidad para unirse, y por lo tanto bloquear, la acción del NgR1. Los aptámeros de polipéptidos pueden incluir un dominio peptídico variable corto unido a ambos extremos de un armazón proteico. Esta doble restricción estructural incrementa en gran medida la afinidad de unión del péptido a unos niveles comparables a los de un anticuerpo (intervalo nanomolar). Véase, por ejemplo, Hoppe-Seyler F y col. (2000) J Mol Med 78 (8): 426 - 430. La longitud del péptido variable corto es normalmente de entre aproximadamente 10 y 20 aminoácidos y el armazón puede ser cualquier proteína que tenga una buena solubilidad y propiedades de compacidad. Un ejemplo no limitante de una proteína de armazón es la proteína bacteriana Tiorredoxina-A. Véase, por ejemplo, Cohen BA y col. (1998) PNAS 95 (24): 14272 - 14277.

[0318] Los aptámeros de polipéptidos son péptidos o pequeños polipéptidos que actúan como inhibidores dominantes de la función proteica. Los aptámeros de péptidos se unen específicamente a las proteínas objetivo, bloqueando su capacidad funcional (Kolonin y col. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 14.266 - 14.271). Los aptámeros de péptidos que se unen con una elevada afinidad y especificidad a una proteína objetivo pueden ser aislados mediante una variedad de técnicas conocidas en la materia. Los aptámeros de péptidos pueden ser aislados a partir de bibliotecas de péptidos aleatorios mediante cribados de dos híbridos de levadura (Xu, C. W., y col. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 12.473 - 12.478) o mediante su expresión en ribosomas (Hanes y col. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 4937 - 4942). También pueden ser aislados a partir de bibliotecas de fagos (Hoogenboom, H. R., y col. (1998) Immunotechnology 4: 1 - 20) o de bibliotecas de péptidos generadas químicamente. Adicionalmente, los aptámeros de polipéptidos pueden ser seleccionados mediante el uso de la selección de aptámeros de péptidos regulados por ligando (LiRPAs). Véase, por ejemplo, Binkowski B F y col., (2005) Chem & Biol 12(7): 847 - 855. A pesar de que el difícil medio mediante el cual son sintetizados los aptámeros de péptidos hace su uso más complejo que el de los aptámeros de polinucleótidos, tienen una diversidad química ilimitada. Los aptámeros de polinucleótidos están limitados porque utilizan únicamente las cuatro bases de nucleótidos, mientras que los aptámeros de péptidos tendrían un repertorio mucho más amplio (es decir, 20 aminoácidos).

[0319] Los aptámeros de péptidos para su uso en los métodos de la presente divulgación pueden ser modificados (por ejemplo, conjugados con polímeros o condensados con proteínas) según se describe para otros polipéptidos en cualquier parte del presente documento.

Composiciones

[0320] En algunos casos, la divulgación proporciona composiciones que comprenden un polipéptido seleccionado de entre el grupo que consiste en los ID. SEC. Nº: 1 - 5, 26 - 27, 29 - 37 y 41 - 45.

[0321] En algunos casos, la divulgación proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo anti-receptor Nogo-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, o un polipéptido soluble del receptor Nogo-1 o una proteína de fusión de la presente divulgación.

[0322] En algunos casos, la divulgación proporciona una composición que comprende un polinucleótido de la presente divulgación.

[0323] En algunos casos, la divulgación proporciona composiciones que comprenden un polipéptido de la presente divulgación y un agente antiinflamatorio.

[0324] En algunos casos, la presente divulgación puede contener portadores farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y sustancias auxiliares que facilitan el procesado de los compuestos activos en preparaciones que pueden ser usadas farmacéuticamente para una administración en el sitio de acción. Algunas formulaciones adecuadas para su administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos

en formas solubles en agua, por ejemplo, sales solubles en agua. Además, pueden administrarse suspensiones de los compuestos activos en forma de las apropiadas suspensiones oleosas para inyección. Algunos disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener

5 sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetil celulosa de sodio, sorbitol y dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes. También pueden usarse liposomas para encapsular las moléculas de esta invención para su administración en la célula. Algunos ejemplos de "portadores farmacéuticamente aceptables" son cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares

10 que sean fisiológicamente compatibles, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En algunos casos, la composición comprende agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio. En algunos casos, las composiciones comprenden sustancias farmacéuticamente aceptables tales como humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o

15 tampones, que mejoran la vida de almacenamiento o la eficacia de los anticuerpos, de los fragmentos de unión al antígeno, de los receptores Nogo solubles o de las proteínas de fusión de la divulgación.

[0325] Las composiciones de la divulgación pueden estar en una diversidad de formas, que incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, inyectables estériles e infundibles), dispersiones o suspensiones. La forma preferida depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica previstos. En un caso, las composiciones están en forma de soluciones inyectables o infundibles, tales como composiciones similares a las utilizadas para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos.

20

[0326] La composición puede ser formulada en forma de una solución, una microemulsión, una dispersión, un liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una elevada concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación de un anticuerpo anti-receptor Nogo-1 en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de una esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se

30 preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado a vacío y liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada estéril de los mismos. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por

35 ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

[0327] En algunos casos, el compuesto activo puede ser preparado con un portador que protegerá al compuesto frente a una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles y biodegradables, tales como acetato de vinil etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Se han patentado muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones, o son conocidos

40 generalmente por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery System, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York (1978).

45

[0328] También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones. En algunos casos, un anticuerpo del receptor Nogo-1 o fragmentos de unión al antígeno del mismo, o los polipéptidos solubles del receptor Nogo-1 o las proteínas de fusión de la invención, son formulados conjuntamente y/o administrados conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales que incluyen, por ejemplo, un agente antiinflamatorio. En un caso, el agente antiinflamatorio es un agente antiinflamatorio no esteroideo. En otro caso, el agente antiinflamatorio es un agente antiinflamatorio esteroideo. En un caso particular, el agente antiinflamatorio es metilprednisolona.

50

[0329] En un caso, la presente divulgación se refiere al uso de un antagonista del receptor Nogo junto con un agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE), ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Algunos ejemplos de AINEs que son bien conocidos en la materia incluyen derivados del ácido propiónico (por ejemplo, ahnino profeno, benoxaprofeno, ácido buclórico, carprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indoprofeno, ketoprofeno, miroprofeno, naproxeno, oxaprozina, piroprofeno, pranoprofeno,

55

60

suprofenos, ácido tiaprofenoico y tioxaprofeno), derivados del ácido acético (por ejemplo, indometacina, acemetacina, alclofenaco, clidanaco, diclofenaco, fenclofenaco, ácido fenclórico, fentiazaco, furofenaco, ibufenaco, isoxepaco, oxpinaco, sulindaco, tiopinaco, tolmetina, zidometacina y zomepiraco), derivados del ácido fenámico (por ejemplo, ácido flufenámico, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico y ácido tolfenámico), derivados del ácido

5

bifenilcarboxílico (por ejemplo, diflunisal y flufenisal), oxicams (por ejemplo, isoxicam, piroxicam, sudoxicam y tenoxicam), salicilatos (por ejemplo, ácido acetilsalicílico y sulfasalazina) y las pirazonas (por ejemplo, apazona, bezpiperilona, feprazona, mofebutazona, oxifenbutazona y fenilbutazona); los AINEs estructuralmente relacionados con propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares a las de los AINEs también pretenden estar englobados en este grupo.

10

[0330] En otro caso, la presente divulgación se refiere al uso de un antagonista del receptor Nogo junto con cualquiera de uno o más agentes antiinflamatorios esteroideos, tales como corticosteroides, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Algunos ejemplos no limitantes de dichos agentes esteroideos incluyen hidrocortisona y los compuestos que derivan de la hidrocortisona, tales como 21-acetoxipregnenolona, alclomerasona, algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, valerato de betametasona, budesonida, cloroprednisona, clobetasol, propionato de clobetasol, clobetasona, butirato de clobetasona, clocortolona, clonprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacón, desonida, desoximarasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, enoxolona, fluazacort, flucoronida, flumetasona, pivalato de flumetasona, flunisolida, acetónido de flucinolona, fluciclonida, acetónido de fluorocinolona, flucortin butilo, flucortolona, hexanoato de fluorocortolona, valerato de diflucortolona, fluorometolona, acetato de fluprednolona, acetónido de triamcinolona, fluprednisolona, flurandrenolida, formocortal, halcinonida, halometasona, acetato de haloprednolona, hidrocortamato, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, fosfato de hidrocortisona, 21-succinato de sodio de hidrocortisona, tebutato de hidrocortisona, maziprednolona, medrisolona, meprednisolona, metilprednisolona, furoato de mometasona, parametasona, prednicarbato, prednisolona, 21-diedriaminoacetato de prednisolona, fosfato de sodio de prednisolona, succinato de sodio de prednisolona, 21-m-sulfobenzoato de sodio de prednisolona, 21-estearoglucolato de sodio de prednisolona, tebutato de prednisolona, 21-trimetilacetato de prednisolona, prednisona, prednival, prednilideno, 21-dietilaminoacetato de prednilideno, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, benetónido de triamcinolona y hexacetónido de triamcinolona. Los corticosteroides estructuralmente relacionados con unas propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también pretenden estar englobados en este grupo.

15

En un caso particular, el antagonista del receptor Nogo se usa junto con metilprednisolona.

20

[0331] Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo, de un fragmento de unión al antígeno, del (los) polipéptido(s) o de la proteína de fusión de la divulgación. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una

25

cantidad eficaz, a unas dosis y durante unos periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo del receptor Nogo-1 o de un fragmento de unión al antígeno del mismo, de un polipéptido soluble del receptor Nogo-1 o de una proteína de fusión del receptor Nogo puede variar dependiendo de factores tales como el estado patológico, la edad, el sexo y el peso del individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo,

30

del fragmento de unión al antígeno, del polipéptido soluble del receptor Nogo-1 o de la proteína de fusión del receptor, está sopesado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a unas dosis y durante unos periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, dado que la dosis profiláctica se usa en los sujetos antes o en una fase temprana de la enfermedad, la cantidad profiláctica será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

35

[0332] Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo, o la dosis puede ser reducida o aumentada proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones

40

parenterales en formas de dosificación unitarias para facilitar la administración, y la uniformidad de la forma de dosificación unitaria, según se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente individuales adecuadas como dosis unitarias para los sujetos mamíferos que se van a tratar, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitarias de la divulgación

45

está dictada por, y será directamente dependiente de (a) las características únicas del anticuerpo, del fragmento de unión al antígeno y del polipéptido soluble del receptor-1 o de la proteína de fusión del receptor Nogo y el efecto terapéutico o profiláctico en particular que se va a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la materia de la combinación de dicho anticuerpo, fragmento de unión al antígeno y polipéptido soluble del receptor-1 o proteína de fusión del receptor Nogo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos. En algunos casos un intervalo de dosis

50

terapéuticamente eficaz para los anticuerpos del receptor Nogo-1 o los fragmentos de unión al antígeno de los

misimos es de 0,1 - 4 mg/Kg por día. En algunos casos un intervalo de dosis terapéuticamente eficaz para los anticuerpos del receptor Nogo-1 o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos es de 0,2 - 4 mg/Kg por día. En algunos casos un intervalo de dosis terapéuticamente eficaz para los anticuerpos del receptor Nogo-1 o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos es de 0,2 mg/Kg por día.

5

[0333] En los métodos de la divulgación, los antagonistas del NgR1 se administran generalmente directamente en el sistema nervioso, intracerebroventricularmente o intratecalmente, por ejemplo, en una lesión crónica de MS. Las composiciones para su administración de acuerdo con los métodos de la divulgación pueden ser formuladas de forma que se administre una dosis de 0,001 - 10 mg/kg de peso corporal por día del antagonista del
10 NgR1. En algunos casos de la divulgación, la dosis es de 0,01 - 1,0 mg/kg de peso corporal por día. En algunos casos, la dosis es de 0,001 - 0,5 mg/kg de peso corporal por día.

[0334] Para el tratamiento con un antagonista del NgR1 de la invención, la dosis puede variar, por ejemplo, desde aproximadamente 0,0001 hasta 100 mg/kg y más habitualmente desde 0,01 hasta 5 mg/kg (por ejemplo, 0,02
15 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o de 10 mg/kg de peso corporal o en el intervalo de 1 - 10 mg/kg, preferiblemente de al menos 1 mg/kg. Las dosis intermedias de los intervalos anteriores también pretenden estar en el ámbito de la divulgación. Los sujetos pueden recibir las dosis diariamente, en días alternos, semanalmente o de acuerdo con cualquier otro esquema determinado mediante un análisis empírico. Un ejemplo de tratamiento implica la administración de múltiples dosis durante un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Algunos
20 ejemplos de regímenes de tratamiento adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 hasta 6 meses. Algunos ejemplos de esquemas de dosificación incluyen 1 - 10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanalmente.

[0335] En algunos métodos se administran simultáneamente dos o más antagonistas del NgR1, en cuyo caso la dosis de carga del antagonista administrado estará en los intervalos indicados. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones usadas en los métodos de la divulgación. Por ejemplo, un antagonista del NgR1 puede formularse conjuntamente y/o administrarse conjuntamente con uno o más agentes
25 terapéuticos adicionales, tal como un agente antiinflamatorio, por ejemplo, metilprednisolona.

30

[0336] La divulgación engloba cualquier método de administración adecuado para un antagonista del NgR1 en un tejido objetivo seleccionado, incluyendo una inyección en bolo de una solución acuosa o la implantación de un sistema de liberación controlada. El uso de un implante de liberación controlada reduce la necesidad de inyecciones repetidas.

35

[0337] Los antagonistas del NgR1 usados en los métodos de la divulgación pueden ser infundidos directamente en el cerebro. Se conocen diversos implantes para la infusión cerebral directa de los compuestos, y son eficaces en la administración de compuestos terapéuticos en pacientes humanos que padecen trastornos neurológicos. Éstos incluyen la infusión crónica en el cerebro mediante el uso de una bomba, catéteres intersticiales
40 temporales implantados estereotácticamente, implantes de catéteres intracraneales permanentes e implantes biodegradables implantados quirúrgicamente. Véase, por ejemplo, Gill y col., *supra*; Scharfen y col., "High Activity Iodine-125 Interstitial Implant For Gliomas", Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 24 (4): 583 - 91 (1992); Gaspar y col., "Permanent 125I Implants for Recurrent Malignant Gliomas", Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 43 (5): 977 - 82 (1999); capítulo 66, páginas 577 - 580, Bellezza y col., "Stereotactic Interstitial Brachytherapy", en Gildenberg y
45 col., *Textbook of Stereotactic and Functional Neurosurgery*, McGraw-Hill (1998); y Brem y col., "The Safety of Interstitial Chemotherapy with BCNU-Loaded Polymer Followed by Radiation Therapy in the Treatment of Newly Diagnosed Malignant Gliomas: Phase I Trial", J. Neuro-Oncology 26: 111 - 23 (1995).

[0338] Las composiciones también pueden comprender un antagonista del NgR1 de la invención dispersado
50 en un material portador biocompatible que funciona como un sistema adecuado de administración o de soporte para los compuestos. Algunos ejemplos adecuados de portadores de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos moldeados tales como supositorios o cápsulas. Algunas matrices implantables o microcapsulares de liberación sostenida incluyen polilactidas (Patente de EE.UU. Nº 3.773.319; documento EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman y col., *Biopolymers* 22:
55 547 - 56 (1985)); poli(2-hidroxietil-metacrilato), acetato de vinil etileno (Langer y col., J. Biomed. Mater. Res. 15: 167 - 277 (1981); Langer, Chem. Tech. 12: 98 - 105 (1982)) o ácido poli-D-(-)-3hidroxibutírico (documento EP 133.988).

[0339] En algunos casos se administra un antagonista del NgR1 de la divulgación a un paciente mediante infusión directa en una región apropiada del cerebro. Véase, por ejemplo, Gill y col., "Direct brain infusion of glial cell
60 line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease", Nature Med. 9: 589 - 95 (2003). Hay técnicas alternativas

disponibles y pueden ser aplicadas para la administración de un antagonista del NgR de acuerdo con la divulgación. Por ejemplo, la colocación estereotáctica de un catéter o de un implante puede realizarse mediante el uso de la unidad de Riechert-Mundinger y la unidad de localización multipropósito ZD (Zamorano-Dujovny). Un escáner de tomografía computerizada mejorada por contraste (CT), mediante la inyección de 120 ml de omnipaque, 350 mg de yodo/ml, con 2 mm de espesor de corte, puede permitir la planificación de un tratamiento tridimensional multiplanar (STP, Fischer, Friburgo, Alemania). Este equipo permite la planificación sobre la base de los estudios por imagen de resonancia magnética, combinando la información del objetivo de la CT y de la MRI para una confirmación clara del objetivo.

- 10 **[0340]** El sistema estereotático Leksell (Downs Surgical, Inc., Decatur, GA) modificado para su uso con un escáner GE CT (General Electric Company, Milwaukee, WI) así como el sistema estereotático de Brown-Roberts-Wells (BRW) (Radionics, Burlington, MA) puede usarse para este fin. Por lo tanto, la mañana del implante, puede fijarse el anillo de base anular del marco estereotático BRW al cráneo del paciente. Pueden obtenerse secciones sucesivas de CT a unos intervalos de 3 mm a través de la región (tejido objetivo) con un marco localizador de barra de grafito fijado en la placa de base. Puede ejecutarse un programa de planificación de tratamiento computerizado con un ordenador VAX 11/780 (Digital Equipment Corporation, Maynard, Mass.) mediante el uso de las coordenadas de CT de las imágenes de la barra de grafito para el cartografiado entre el espacio de la CT y el espacio del BRW.

Usos de los anticuerpos, los fragmentos de unión al antígeno, los receptores solubles, las proteínas de fusión, los polinucleótidos y las composiciones

- 25 **[0341]** En algunos casos, la divulgación proporciona métodos para la inhibición de la actividad del receptor Nogo-1 mediante la administración de anticuerpos anti-receptor Nogo-1, de fragmentos de unión al antígeno de dichos anticuerpos, de polipéptidos solubles del receptor Nogo-1 o de proteínas de fusión que comprenden dichos polipéptidos, a un mamífero en necesidad de los mismos.

- 30 **[0342]** En algunos casos, la divulgación proporciona un método para la inhibición de la unión del receptor Nogo-1 a un ligando, que comprende la etapa de poner en contacto el receptor Nogo-1 con un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de esta divulgación. En algunos casos, el ligando se elige de entre el grupo que consiste en NogoA, NogoB, NogoC, MAG y OM-gp.

- 35 **[0343]** En algunos casos, la divulgación proporciona un método para la inhibición del colapso del cono de crecimiento en una neurona, que comprende la etapa de poner en contacto la neurona con el anticuerpo o con el fragmento de unión al antígeno del mismo de esta invención divulgación. En algunos casos, la divulgación proporciona un método para la disminución de la inhibición del crecimiento de la neurita o de la germinación en una neurona, que comprende la etapa de poner en contacto la neurona con el anticuerpo o con el fragmento de unión al antígeno de esta divulgación. En algunos casos, la neurona es una neurona del CNS. En algunos de estos casos, el crecimiento o la germinación de la neurita es un crecimiento axonal.

- 40 **[0344]** En algunos casos, la divulgación proporciona un método para promover la supervivencia de una neurona en un mamífero, una que está en riesgo de morir, que comprende (a) proporcionar una célula hospedadora cultivada que expresa (i) un anticuerpo anti-receptor Nogo-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo; o (ii) un polipéptido soluble del receptor Nogo-1; y (b) introducir la célula hospedadora en el mamífero en el sitio de la neurona o cerca. Almudena Ramón-Cueto, M Isabel Cordero, Fernando F Santos-Benito y Jesús Ávila (2000) Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing cells. Neuron 25, 425 - 435.

- 50 **[0345]** En algunos casos, la divulgación proporciona un método de terapia génica para promover la supervivencia de una neurona en riesgo de morir, neurona que está en un mamífero, que comprende la administración en el sitio de la neurona o cerca, de un vector vírico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para (a) un anticuerpo anti-receptor Nogo-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo; o (b) un polipéptido soluble del receptor Nogo-1, en el que el anticuerpo anti-receptor Nogo-1, el fragmento de unión al antígeno o el polipéptido soluble del receptor Nogo-1 es expresado a partir de la secuencia de nucleótidos en el mamífero en una cantidad suficiente para promover la supervivencia de la neurona. Algunas vectores víricos y los métodos útiles para estas formas de realización se describen, por ejemplo, en Noel y col., Human Gene Therapy, 13: 1493 - 93 (2002).

- 60 **[0346]** En algunos casos, la divulgación proporciona un método para la inhibición de la unión del receptor Nogo-1 a un ligando, que comprende la etapa de poner en contacto el ligando con el polipéptido soluble del receptor Nogo-1 o la proteína de fusión del receptor Nogo-1 de esta invención.

[0347] En algunos casos, la divulgación proporciona un método para modular una actividad de un ligando del receptor Nogo-1, que comprende la etapa de poner en contacto el ligando del receptor Nogo-1 con un polipéptido soluble del receptor Nogo-1 o con una proteína de fusión del receptor Nogo-1 de la invención.

[0348] En algunos casos la divulgación proporciona un método para la inhibición del colapso del cono de crecimiento en una neurona, que comprende la etapa de poner en contacto un ligando del receptor Nogo-1 con un polipéptido soluble del receptor Nogo-1 o con una proteína de fusión del receptor Nogo-1 de esta divulgación. En algunos casos, la divulgación proporciona un método para disminuir la inhibición del crecimiento de la neurita o de la germinación en una neurona, que comprende la etapa de poner en contacto un ligando del receptor Nogo-1 con el polipéptido soluble del receptor Nogo-1 o con la proteína de fusión del receptor Nogo-1 de esta divulgación. En algunos casos, la neurona es una neurona del CNS. En algunos casos, el ligando se elige de entre el grupo que consiste en NogoA, NogoB, NogoC, MAG y OM-gp. En algunos casos, el crecimiento de la neurita o la germinación es un crecimiento axonal.

[0349] En algunos casos, la divulgación proporciona un método para promover el crecimiento de la neurita que comprende poner en contacto una neurona con un polipéptido, un polinucleótido o una composición de la divulgación. En algunos casos, el polipéptido, el polinucleótido o la composición inhibe la inhibición del crecimiento de la neurita. En algunos casos, la neurona está en un mamífero. En algunos casos, el mamífero es un ser humano.

[0350] En algunos casos, la divulgación proporciona un método para la inhibición de la transducción de señales por el complejo de señalización del NgR1, que comprende poner en contacto una neurona con una cantidad eficaz de un polipéptido, de un polinucleótido o de una composición de la divulgación. En algunos casos, la neurona está en un mamífero. En algunos casos, el mamífero es un ser humano.

[0351] En algunos casos, la divulgación proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad, de un trastorno o de una lesión en el sistema nervioso central (CNS) de un mamífero, que comprende la administración a un mamífero en necesidad de tratamiento de una cantidad eficaz de un polipéptido, de un polinucleótido o de una composición de la presente divulgación. En algunos casos, la enfermedad, el trastorno o la lesión es esclerosis múltiple, ALS enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, neuropatía diabética, apoplejía, lesiones cerebrales traumáticas, lesiones en la médula espinal, neuritis óptica, glaucoma, pérdida de audición y leucodistrofia adrenal.

[0352] Cualquiera de los tipos de anticuerpos o de receptores descritos en el presente documento pueden ser usados terapéuticamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-receptor Nogo-1 es un anticuerpo humano. En algunos casos, el mamífero es un paciente humano. En algunos casos, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo se administra a un mamífero no humano que expresa un receptor Nogo-1 con el que el anticuerpo reacciona de forma cruzada (por ejemplo, un primate, un mono cinomólogo o rhesus) con fines veterinarios, o como un modelo animal de enfermedad humana. Dichas modelos animales pueden ser útiles para la evaluación de la eficacia terapéutica de los anticuerpos de esta divulgación.

[0353] En algunos casos, la administración del anticuerpo anti-receptor Nogo-1 o de un fragmento de unión al antígeno, o de un polipéptido soluble del receptor Nogo-1 o de una proteína de fusión, se usa para el tratamiento de una lesión en la médula espinal o para facilitar el crecimiento axonal en todo el sitio lesionado.

[0354] Los anticuerpos anti-receptor Nogo-1 o los fragmentos de unión al antígeno, o los polipéptidos solubles del receptor Nogo-1 o las proteínas de fusión de la presente divulgación, pueden proporcionarse individualmente o en combinación, o en combinación secuencial con otros agentes que modulan un proceso patológico en particular. Por ejemplo, pueden administrarse conjuntamente agentes antiinflamatorios después de una apoplejía como medio para bloquear adicionalmente el daño neuronal y la inhibición de la regeneración axonal. Según se usa en el presente documento, se dice que los anticuerpos del receptor Nogo-1, los fragmentos de unión al antígeno, el receptor soluble Nogo-1 y las proteínas de fusión del receptor Nogo, se administran junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales cuando los dos se administran simultáneamente, consecutivamente o independientemente.

[0355] Los anticuerpos anti-receptor Nogo-1, los fragmentos de unión al antígeno, los polipéptidos solubles del receptor Nogo-1, las proteínas de fusión del receptor Nogo-1 de la presente divulgación, pueden ser administrados a través de la vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, por inhalación o bucal. Por ejemplo, un agente puede ser administrado localmente en el sitio de una lesión a través de una microinfusión. Algunos sitios típicos incluyen, pero no se limitan a, áreas dañadas de la médula espinal resultantes de una lesión. La dosis administrada dependerá de la edad, de la salud y del peso del receptor, del tipo

de tratamiento concomitante, si lo hubiera, de la frecuencia del tratamiento y de la naturaleza del efecto deseado.

[0356] Los compuestos de esta divulgación pueden ser utilizados *in vivo*, habitualmente en mamíferos, tales como seres humanos, ovejas, caballos, ganado, cerdos, perros, gatos, ratas y ratones, o *in vitro*.

5

Vectores de la divulgación

[0357] En algunos casos, la divulgación proporciona moléculas de ADN recombinante (ADNr) que contienen una secuencia codificante. Según se usa en el presente documento, una molécula de ADNr es una molécula de ADN que ha sido sometida a una manipulación molecular. Los métodos para la generación de moléculas de ADNr son bien conocidos en la materia, por ejemplo, véase Sambrook y col., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). En algunas moléculas de ADNr, una secuencia codificante de ADN está unida operativamente a secuencias de control de la expresión y a secuencias del vector.

[0358] En algunos casos, la divulgación proporciona vectores que comprenden los ácidos nucleicos que codifican para los polipéptidos de la invención. La elección del vector y de las secuencias de control de la expresión a las que los ácidos nucleicos de esta divulgación están unidas operativamente depende directamente, como es bien conocido en la materia, de las propiedades funcionales deseadas (por ejemplo, de la expresión de la proteína y de la célula hospedadora que se va a transformar). Un vector de la presente divulgación pueden ser al menos capaz de dirigir la replicación o la inserción en el cromosoma del hospedador, y preferiblemente también la expresión, del gen estructural incluido en la molécula de ADNr.

[0359] Los elementos de control de la expresión que se usan para la regulación de la expresión de una secuencia codificante de una proteína unida operativamente son conocidos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, promotores inducibles, promotores constitutivos, señales de secreción y otros elementos reguladores. Preferiblemente, el promotor inducible se controla fácilmente, tal como siendo sensible a un nutriente del medio de la célula hospedadora.

[0360] En un caso, el vector que contiene una molécula de ácido nucleico codificante incluirá un replicón procariota, es decir, una secuencia de ADN que tiene la capacidad de dirigir la replicación autónoma y el mantenimiento de la molécula de ADN recombinante extracromosómicamente en una célula hospedadora procariota, tal como una célula hospedadora bacteriana, transformada con el mismo. Dichos replicones son bien conocidos en la materia. Además, los vectores que incluyen un replicón procariota también pueden incluir un gen cuya expresión confiere un marcador detectable o seleccionable tal como la resistencia a un fármaco. Los genes bacterianos típicos de resistencia a fármacos son aquellos que confieren resistencia a la ampicilina o a la tetraciclina.

[0361] Los vectores que incluyen un replicón procariota pueden incluir adicionalmente un promotor procariota o de bacteriófago capaz de dirigir la expresión (la transcripción y la traducción) de las secuencias codificantes del gen en una célula hospedadora bacteriana, tal como en *E. coli*. Un promotor es un elemento de control de la expresión formado por una secuencia de ADN que permite que se produzca la unión de la polimerasa de ARN y la transcripción. Las secuencias promotoras compatibles con hospedadores bacterianos normalmente se proporcionan en vectores de plásmidos que contienen los sitios de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN de la presente divulgación. Algunos ejemplos de dichos plásmidos vectores son pUC8, pUC9, pBR322 y pBR329 (Bio-Rad® Laboratories), pPL y pKK223 (Pharmacia). Puede usarse cualquier hospedador procariota adecuado para la expresión de una molécula de ADN recombinante que codifica para una proteína de la invención.

[0362] También pueden usarse vectores de expresión compatibles con células eucariotas, preferiblemente aquellos compatibles con células de vertebrados, para formar moléculas de ADNr que contienen una secuencia codificante. Los vectores de expresión de células eucariotas son bien conocidos en la materia y están disponibles en numerosas fuentes comerciales. Normalmente, dichos vectores se proporcionan conteniendo los sitios de restricción convenientes para la inserción del segmento de ADN deseado. Algunos ejemplos de dichos vectores son pSVL y pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1, pML2d (International Biotechnologies), pTDT1 (ATCC® 31255) y otros vectores de expresión eucariotas.

[0363] Los vectores de expresión de células eucariotas usados para la construcción de las moléculas de ADNr de la presente divulgación pueden incluir adicionalmente un marcador seleccionable que sea eficaz en una célula eucariota, preferiblemente un marcador de selección de resistencia a fármacos. Un marcador de resistencia a fármacos preferido es el gen cuya expresión da como resultado una resistencia a la neomicina, es decir, el gen de la fosfotransferasa de neomicina (neo) (Southern y col., *J. Mol. Anal. Genet.* 1: 327 - 341 (1982)). Alternativamente, el marcador seleccionable puede estar presente en un plásmido individual, introducirse los dos vectores mediante una

transfección conjunta de la célula hospedadora y seleccionarse los transfectantes mediante el cultivo en el fármaco apropiado para el marcador seleccionable.

[0364] Para expresar los anticuerpos, o porciones del anticuerpo de la divulgación, se insertan los ADN que codifican para las cadenas ligera y pesada parciales o completas en vectores de expresión de forma que los genes estén unidos operativamente a secuencias de control de la transcripción y de la traducción. Algunos vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, cósmidos, YAC, episomas derivados del EBV, y similares. El gen del anticuerpo está ligado en un vector de forma que las secuencias de control de la transcripción y de la traducción del vector sirven para su función prevista de regular la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la célula hospedadora de expresión usada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden ser insertados en vectores individuales. En algunos casos, ambos genes son insertados en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo son insertados en el vector de expresión mediante los métodos habituales (por ejemplo, ligación en sitios de restricción complementarios del fragmento de gen del anticuerpo y el vector, o ligación de extremos romos si no hay presentes sitios de restricción).

[0365] Un vector conveniente es aquel que codifica para una secuencia CH o CL de una inmunoglobulina humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados diseñados de forma que cualquier secuencia de VH o de VL pueda ser fácilmente insertada y expresada, como se ha descrito anteriormente. En dichos vectores habitualmente se produce un ajuste entre el sitio donante de ajuste en la región J insertada y el sitio aceptor de ajuste que precede a la región C humana, y también en las regiones de ajuste que aparecen en los exones CH humanos. La poliadenilación y la terminación de la transcripción se producen en los sitios cromosómicos nativos de la secuencia abajo de las regiones codificantes. El vector de expresión recombinante también puede codificar para un péptido de señalización que facilite la secreción de la cadena del anticuerpo desde una célula hospedadora. El gen de la cadena de anticuerpo puede ser clonado en el vector de forma que el péptido de señalización esté conectado en marco con el amino terminal del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido de señalización puede ser un péptido de señalización de una inmunoglobulina o un péptido de señalización heterólogo (es decir, un péptido de señalización de una proteína que no es una inmunoglobulina).

[0366] Además de los polipéptidos inmunógenos, los anticuerpos del receptor Nogo-1, los fragmentos de unión al antígeno, los polipéptidos solubles del receptor Nogo-1 y las proteínas de fusión solubles del receptor Nogo-1 de la presente divulgación, los vectores de expresión recombinantes de la divulgación portan secuencias reguladoras que controlan su expresión en una célula hospedadora. Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que va a ser transformada, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para células hospedadoras de expresión de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen unos elevados niveles de expresión de proteínas en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de LTR retrovíricas, de citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor / potenciador del CMV), del virus simio (SV40) (tal como el promotor / potenciador del SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)), promotores de polioma y promotores fuertes de mamífero tales como los promotores nativos de inmunoglobulina y de actina. Para una descripción adicional de los elementos reguladores víricos y de las secuencias de los mismos, véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.168.062 de Stinski, la Patente de EE.UU. N° 4.510.245 de Bell y col. y la Patente de EE.UU. N° 4.968.615 de Schaffner y col.

[0367] Puede usarse un vector de expresión propiedad de Biogen IDEC, Inc., denominado NEOSPLA (Patente de EE.UU. 6.159.730). Este vector contiene el promotor / potenciador de citomegalovirus, el promotor principal de la globina beta de ratón, el origen de replicación del SV40, la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, el exón 1 y el exón 2 de la fosfotransferasa de neomicina, el gen de la reductasa de dihidrofolato y la secuencia líder. Se ha encontrado que este vector da como resultado un nivel de expresión muy alto tras su transfección en células CHO, seguido de una selección en medio que contiene G418 y una amplificación con metotrexato. Por supuesto, en la presente divulgación puede usarse cualquier vector de expresión que sea capaz de desencadenar la expresión en células eucariotas. Algunos ejemplos de vectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, los plásmidos pADNc3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 y pZeoSV2 (disponibles en Invitrogen, San Diego, CA) y el plásmido pCI (disponible en Promega, Madison, WI). Otros vectores de expresión de células eucariotas adicionales son conocidos en la materia y están disponibles en el mercado. Normalmente, dichos vectores contienen los sitios de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN deseado. Algunos ejemplos de vectores incluyen pSVL y pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1, pm12d (International Biotechnologies), pTDT1 (ATCC 31255), los vectores de expresión retrovíricos pMIG y pLL3.7, el vector lanzadera de adenovirus pDC315 y vectores AAV. Otros ejemplos de

sistemas de vectores se divulgan, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. 6.413.777.

[0368] Otros casos de la divulgación usan un vector lentivírico para la expresión de los polinucleótidos de la divulgación, por ejemplo, polinucleotídicos antagonistas del NgR, por ejemplo, moléculas de ARNip. Los lentivirus pueden infectar células fuera del ciclo y postmitóticas y proporcionan también la ventaja de que no son silenciados durante el desarrollo, lo que permite la generación de animales transgénicos a través de la infección de células madre embrionarias. Milhavet y col., *Pharmacological Rev.* 55: 629 - 648 (2003). Pueden construirse otros vectores víricos que expresen polinucleótidos basados en, pero no se limitan a, virus adenoasociados, retrovirus, adenovirus o alfavirus.

10

[0369] La transcripción de los polinucleótidos de la divulgación, por ejemplo, de las secuencias de la molécula de ARNip, puede estar guiada desde un promotor de una polimerasa I de ARN eucariota (pol I), una polimerasa II de ARN (pol II) o una polimerasa III de ARN (pol III). Los transcritos de los promotores de la pol II o de la pol III son expresados a altos niveles en todas células; los niveles de un promotor dado de la pol II en un tipo celular dado dependen de la naturaleza de las secuencias reguladoras del gen (potenciadores, silenciadores, etc.) presentes en las proximidades. También se usan promotores de la polimerasa de ARN procariota, siempre que la enzima del ARN procariota sea expresada en las células apropiadas (Elroy-Stein y Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 87: 6743 - 7 (1990); Gao y Huang, *Nucleic Acids Res.* 21: 2867 - 72 (1993); Lieber y col., *Methods Enzymol.* 217: 47 - 66 (1993); Zhou y col., *Mol. Cell. Biol.* 10: 4529 - 37 (1990)). Numerosos investigadores han demostrado que los polinucleótidos expresados a partir de dichos promotores pueden funcionar en células de mamífero (por ejemplo, Kashani - Sabet y col., *Antisense Res. Dev.* 2: 3 - 15 (1992); Ojwang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89: 10802 - 6 (1992); Chen y col., *Nucleic Acids Res.* 20: 4581 - 9 (1992); Yu y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 6340 - 4 (1993); L'Huillier y col., *EMBO J.* 11: 4411 - 8 (1992); Lisiewicz y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 8000 - 4 (1993); Thompson y col., *Nucleic Acids Res.* 23: 2259 (1995); Sullenger & Cech, *Science* 262: 1566 (1993)). Más específicamente, las unidades de transcripción tales como las derivadas de los genes que codifican para el U6 nuclear pequeño (ARNnp), el ARN de transferencia (ARNt) y el ARN VA de adenovirus son útiles en la generación de altas concentraciones de las moléculas de ARN deseadas tales como el ARNip en células (Thompson y col., *supra*; Couture y Stinchcomb, 1996, *supra*; Noonberg y col., *Nucleic Acid Res.* 22: 2830 (1994); Noonberg y col., Patente de EE.UU. Nº 5.624.803; Good y col., *Gene Ther.* 4: 45 (1997); Beigelman y col., Publicación Internacional PCT Nº WO 96/18736. Las unidades de transcripción del ARNip que pueden ser incorporadas en una variedad de vectores para su introducción en células de mamífero incluyen, pero no se restringen a, vectores de ADN de plásmido, vectores de ADN vírico (tales como vectores víricos de adenovirus o adenoasociados) o vectores de ARN vírico (tales como vectores retrovíricos o de alfavirus) (para una revisión, véase Couture y Stinchcomb, 1996, *supra*).

[0370] Además de los genes heterólogos y de las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la divulgación pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nº 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel y col.). Por ejemplo, normalmente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tal como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables incluyen el gen de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr- con una selección / amplificación por metotrexato) y el gen neo (para la selección G418).

45 Células hospedadoras y métodos de producción recombinante de la proteína de la invención

[0371] Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican para los anticuerpos anti-receptor Nogo-1, los péptidos inmunógenos, los polipéptidos solubles del receptor Nogo-1, las proteínas de fusión solubles del receptor Nogo-1 de esta divulgación y los vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleicos, pueden ser usados para la transformación de una célula hospedadora adecuada. La transformación puede ser mediante cualquier método conocido para la introducción de los polinucleótidos en una célula hospedadora. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la materia e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibrenio, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del (los) polinucleótido(s) en liposomas y microinyección directa del ADN en los núcleos. Además, las moléculas de ácidos nucleicos pueden ser introducidas en las células de mamífero mediante vectores víricos.

[0372] La transformación de las células hospedadoras apropiadas con una molécula de ADN de la presente divulgación se consigue mediante métodos bien conocidos que normalmente dependen del tipo del vector usado y del sistema hospedador empleado. Con respecto a la transformación en células hospedadoras procariotas, puede

emplearse una electroporación y métodos de tratamiento salino (véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Cohen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 69: 2110 - 2114 (1972)). Con respecto a la transformación en células de vertebrados con vectores que contienen el ADNr, puede emplearse una electroporación, lípidos catiónicos o métodos de tratamiento salino (véase, por ejemplo, Graham y col., Virology 52: 456 - 467 (1973); Wigler y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 76: 1373 - 1376 (1979)).

[0373] Las células transformadas con éxito, es decir, las células que contienen una molécula de ADNr de la presente divulgación, pueden ser identificadas mediante técnicas bien conocidas que incluyen la selección para un marcador seleccionable. Por ejemplo, pueden clonarse las células resultantes de la introducción de un ADNr de la presente divulgación para producir colonias individuales. Las células de esas colonias pueden ser recogidas, lisadas, y examinarse su contenido en ADN para comprobar la presencia del ADNr mediante el uso de un método tal como el descrito por Southern, J. Mol. Biol. 98: 503 - 517 (1975), o pueden ensayarse las proteínas producidas en la célula mediante un método inmunológico.

[0374] Las células hospedadoras para la expresión de un polipéptido o de un anticuerpo de la divulgación para su uso en un método de la divulgación pueden ser procariotas o eucariotas. Las líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadores de expresión son bien conocidas en la materia e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC®). Estas incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), NSO, células SP2, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549 y muchas otras líneas celulares. Las líneas celulares de preferencia particular se seleccionan a través de la determinación de qué líneas celulares tienen unos niveles de expresión elevados. Otras células hospedadoras eucariotas útiles incluyen células vegetales. Otras líneas celulares que pueden usarse son líneas celulares de insecto, tales como las células Sf9. Algunos ejemplos de células hospedadoras procariotas son *E. coli* y *Streptomyces*.

[0375] Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican para los polipéptidos inmunógenos, los anticuerpos del receptor Nogo-1 o los fragmentos de unión al antígeno, los polipéptidos solubles del receptor Nogo-1 y las proteínas de fusión solubles del receptor Nogo-1 de la divulgación, son introducidos en células hospedadoras de mamífero, son producidos mediante el cultivo de las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo, del polipéptido y del polipéptido de fusión en las células hospedadoras o, más preferiblemente, la secreción de los polipéptidos inmunógenos, de los anticuerpos del receptor Nogo-1 o de los fragmentos de unión al antígeno, de los polipéptidos solubles del receptor Nogo-1 y de las proteínas de fusión solubles del receptor Nogo-1 de la divulgación en el medio de cultivo en el que crecen las células hospedadoras. Los polipéptidos inmunógenos, los anticuerpos del receptor Nogo-1 o los fragmentos de unión al antígeno, los polipéptidos solubles del receptor Nogo-1 y las proteínas de fusión solubles del receptor Nogo-1 de la divulgación, pueden ser recuperados a partir del medio de cultivo mediante el uso de los métodos de purificación de proteínas habituales.

[0376] Además, la expresión de los polipéptidos inmunógenos, de los anticuerpos del receptor Nogo-1 o de los fragmentos de unión al antígeno, de los polipéptidos solubles del receptor Nogo-1 y de las proteínas de fusión solubles del receptor Nogo-1 de la divulgación (o de otras fracciones de los mismos) a partir de las líneas celulares de producción puede mejorarse mediante el uso de numerosas técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión del gen de la sintetasa de glutamina (el sistema GS) es una metodología habitual para mejorar la expresión en ciertas condiciones. El sistema GS se analiza total o parcialmente en relación con las Patentes Europeas N° 0 216 846, 0 256 055 y 0 323 997 y la Solicitud de Patente Europea N° 89303964.4.

Células hospedadoras

[0377] La presente divulgación también proporciona células hospedadoras transformadas con una molécula de ácido nucleico que codifica para un anticuerpo del receptor Nogo-1, un fragmento de unión al antígeno, un polipéptido soluble del receptor Nogo-1 y/o una proteína de fusión soluble del receptor Nogo-1 de la divulgación. La célula hospedadora puede ser procariota o eucariota. Las células eucariotas útiles para la expresión de una proteína de la invención no están limitadas siempre que la línea celular sea compatible con los métodos de cultivo celular y compatible con la propagación del vector de expresión y la expresión de producto del gen. Las células hospedadoras eucariotas preferidas incluyen, pero no se limitan a, células de levadura, de insecto y de mamífero, preferiblemente células de vertebrado tales como aquellas de una línea celular de ratón, de rata, de mono o humana. Algunos ejemplos de células hospedadoras eucariotas útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles en la ATCC® como CCL61, células embrionarias de ratón suizo NIH NIH-3T3 disponibles en la ATCC como

CRL1658, células de riñón de cría de hámster (BHK), y líneas celulares eucariotas de cultivo tisular similares.

[0378] Otras células hospedadoras eucariotas útiles incluyen células vegetales. Otras líneas celulares que pueden usarse son líneas celulares de insecto, tales como las células Sf9. Algunos ejemplos de células
5 hospedadoras procariotas son *E. coli* y *Streptomyces*.

Producción de proteínas recombinantes mediante el uso de una molécula ADNr

[0379] La presente divulgación también proporciona métodos para la producción de un anticuerpo del receptor
10 Nogo-1 o de un fragmento de unión al antígeno, de un polipéptido soluble del receptor Nogo-1 y/o de una proteína de fusión soluble del receptor Nogo-1 de la divulgación, mediante el uso de las moléculas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento. En términos generales, la producción de una forma recombinante de una proteína implica normalmente las siguientes etapas:

15 **[0380]** En primer lugar, se obtiene una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de la invención. Si la secuencia codificante está ininterrumpida por intrones, es directamente adecuada para su expresión en cualquier hospedador.

[0381] Después, la molécula de ácido nucleico se coloca opcionalmente en unión operativa con unas
20 secuencias de control adecuadas, según se describió anteriormente, para formar una unidad de expresión que contiene el marco abierto de lectura de la proteína. La unidad de expresión se usa para transformar un hospedador adecuado, y el hospedador transformado se cultiva en unas condiciones que permitan la producción de la proteína recombinante. Opcionalmente, la proteína recombinante se aísla a partir del medio o a partir de las células; la recuperación y la purificación de la proteína pueden no ser necesarias en algunos casos en los que pueden tolerarse
25 algunas impurezas.

[0382] Cada una de las etapas anteriores puede llevarse a cabo de diversas formas. Por ejemplo, las secuencias codificantes deseadas pueden obtenerse a partir de fragmentos genómicos y usarse directamente en los hospedadores apropiados. La construcción de vectores de expresión que sean operables en diversos hospedadores
30 se consigue mediante el uso de los replicones y de las secuencias de control apropiadas, según se estableció anteriormente. Las secuencias de control, los vectores de expresión y los métodos de transformación dependen del tipo de célula hospedadora usada para expresar el gen, y fueron analizados con detalle anteriormente. Si normalmente no estuvieran disponibles, los sitios de restricción adecuados pueden ser añadidos a los extremos de la secuencia codificante de forma que se proporcione un gen escindible para ser insertado en estos vectores. Un
35 artesano experto puede adaptar fácilmente cualquier sistema de hospedador / expresión conocido en la materia para usarlo con las moléculas de ácidos nucleicos de la divulgación para producir la proteína recombinante.

[0383] El experto habitual en el arte pertinente apreciará fácilmente que son obvias otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos y las aplicaciones descritas en el presente documento, y pueden ser
40 realizadas sin desviarse del ámbito de la invención o de cualquier forma de realización de la misma. Con objeto de que esta invención sea mejor comprendida se establecen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos tienen únicamente fines ilustrativos y no deben ser interpretados como limitantes del ámbito de la invención en modo alguno.

EJEMPLO 1

45 **PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES MURINOS ANTI-RECEPTOR NOGO-1**

[0384] Los anticuerpos anti-receptor Nogo-1 que se unen específicamente a un polipéptido inmunógeno del receptor Nogo-1 de la divulgación se fabricaron mediante el uso de los siguientes métodos y procedimientos.

50 Inmunizaciones

[0385] Se usaron dos metodologías de inmunización:

55 1. Células COS-7 o membranas celulares que contienen el receptor Nogo-1 (NogoR-1) como inmunógeno

[0386] Se subclonó el gel del receptor Nogo-1 de rata (GenBank™ N° AF 462390) en el vector de expresión de mamífero pEAG1256 (Biogen®) que contenía el promotor del CMV y el gen de resistencia a la geneticina para la selección farmacológica. El plásmido recombinante se transfectó en células COS-7 mediante el uso de Superfect
60 (Qiagen®). Los transfectantes se seleccionaron mediante el uso de geneticina (Gibco™, 2 mg/ml), se clonaron y se

verificó la expresión en superficie de la proteína del receptor Nogo-1 mediante FACS. Se prepararon membranas de COS-7 a partir de estas células de acuerdo con los procedimientos descritos [Wang y col., J. Neurochem. 75: 1155 - 1161 (2000)] con dos lavados y se almacenaron a 1 mg/ml [concentración de proteína] en glicerol al 10 % a -70 °C.

- 5 **[0387]** Se inmunizaron intraperitonealmente ratones RBF hembras de ocho semanas de edad (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) bien con una emulsión que contiene 50 µg del receptor Nogo-1 de rata – membranas de COS-7 o bien con células COS-7 completas que expresan el receptor Nogo-1 en la superficie y 50 µl de coadyuvante RIBI MPL + TDM + CWS (Sigma® Chemical Co., St. Louis, MO) una vez cada dos semanas (Lipman y col., 1992). Los sueros de los ratones inmunizados se recogieron antes de la primera inmunización, 7 días después de la segunda y
10 de la tercera inmunización y 38 días después de la tercera inmunización, y se midieron los títulos del anticuerpo anti-receptor Nogo-1 mediante un ELISA como se describe a continuación.

2. Péptidos específicos del receptor Nogo-1 como inmunógeno

- 15 **[0388]** La secuencia génica del receptor Nogo-1 de rata se sometió a análisis de antigenicidad mediante el uso del programa informático Vector NTI™ (Fig. 2). Los péptidos antigénicos que fueron identificados en los análisis se conjugaron con hemocianina de lapa californiana (KLH) mediante el uso de los procedimientos habituales con glutaraldehído.
- 20 **[0389]** Se inmunizaron intraperitonealmente ratones RBF hembras de ocho semanas de edad (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) con una emulsión que contiene 50 µg de los péptidos conjugados con KLH y 50 µl de coadyuvante completo de Freund (Sigma® Chemical Co., St. Louis, MO) una vez cada dos semanas. El suero de los ratones inmunizados se recogió antes de la primera inmunización y 1 semana después de la segunda y de la tercera inmunización, y se midieron los títulos del anticuerpo anti-receptor Nogo-1. Se administró una dosis de refuerzo
25 después de la tercera inmunización. Tres días después de esta dosis de refuerzo, se iniciaron los experimentos de fusión.

Producción de hibridomas y cribado

- 30 **[0390]** Los sueros de los ratones inmunizados con los péptidos antigénicos del receptor Nogo-1 fueron cribados mediante un ELISA, mientras que los sueros de los ratones inmunizados con las células COS-7 que expresan el receptor Nogo-1 fueron cribados mediante una citometría de flujo. Los ratones que eran positivos para los anticuerpos que se unían específicamente a las células COS-7 con el receptor Nogo-1 fueron identificados mediante una citometría de flujo y fueron sacrificados. Se aislaron los esplenocitos de los ratones y se condensaron
35 con el mieloma FL653 (un derivado de APRT de un mieloma Ig- / HG-PRT- de ratón Balb/c, mantenido en DMEM que contiene un 10 % de FBS, 4.500 mg/l glucosa, L-glutamina 4 mM y 20 mg/ml de 8-azaguanina) según se describe (Kennett y col., Monoclonal Antibodies: A New Dimension in Biological Analysis, Plenum Press, Nueva York (1993)). Las células fusionadas se colocaron en placas de 24 o de 48 pocillos (Corning Glass Works, Coming, NY) y se alimentaron con un medio de cultivo que contiene adenina, aminopterina y timidina. Los cultivos resistentes a
40 AAT fueron cribados mediante un ELISA o mediante una citometría de flujo para comprobar la unión a las células COS-7 con el receptor Nogo-1 o al péptido antigénico del receptor Nogo-1 según se describe a continuación. Las células de los pocillos positivos se subclonaron adicionalmente mediante una dilución limitante.

- [0391]** Para cribar la unión del anticuerpo al péptido antigénico del receptor Nogo-1, los péptidos que se usaron como inmunógenos se conjugaron con BSA. Se añadieron 0,5 µg del péptido conjugado a 50 µl de tampón de bicarbonato de sodio 0,1 M, a pH 9,0 a cada pocillo de una placa de 96 pocillos MaxiSorp™ (Nunc™). La placa se incubó después a 37 °C durante 1 hora o a 4 °C durante 16 horas, y los sitios de unión no específica se bloquearon mediante el uso de HEPES 25 mM, a pH 7,4 que contiene un 0,1 % de BSA, un 0,1 % de ovoalbúmina, un 0,1 % de blotto y un 0,001 % de azida. Se añadió el sobrenadante del hibridoma y se incubó a 25 °C durante 1 hora. Después
50 de lavar tres veces con PBS, se añadieron en cada pocillo 50 µl de una dilución 1:10.000 de anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Inc.) y se incubaron adicionalmente durante 1 hora. Después de tres lavados se desarrolló un color mediante TMB (Pierce) y se detuvo con ácido sulfúrico 2 M. La intensidad del color se monitorizó con un espectrofotómetro a 450 nm.

- 55 **[0392]** Se cribaron los anticuerpos para comprobar la unión al receptor Nogo-1 completo como sigue. Las células COS-7 se marcaron con CellTracker™ Green CMFDA 0,1 µM (Molecular Probes, Eugene, OR) según describe el vendedor. Se mezclaron volúmenes iguales de células de control marcadas con CellTracker™ con células COS-7 con el receptor Nogo-1 lavadas antes de la incubación con los sueros de ensayo anti-receptor Nogo-1. Se dispensaron cincuenta microlitros de la mezcla celular en cada pocillo de placas de poliestireno de fondo en V de 96
60 pocillos (Costar® 3877, Coming, NY) y se añadieron 100 µl del sobrenadante del hibridoma o un anticuerpo de

control anti-receptor Nogo-1. Después de una incubación a 4 °C durante 30 minutos, las células se lavaron y se incubaron con 50 µl de un segundo anticuerpo específico de un fragmento F(ab')₂ de Fc gamma de IgG de afinidad pura anti-ratón de cabra conjugado con R-ficoeritrina (1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA) en PBS. Al final de la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS y se suspendieron en 200 µl de PBS que contiene un 1 % de FBS y de sometieron a un análisis mediante FACS. Alternativamente, las células COS-7 con el receptor Nogo-1 se mezclaron con el sobrenadante del hibridoma y después se trataron con el anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con R-ficoeritrina y se sometieron directamente a los análisis habituales mediante FACS.

- 10 **[0393]** Generamos 25 anticuerpos anti-receptor Nogo-1 mediante el uso de varios inmunógenos. Generamos dos anticuerpos, 7E11 y 5B10, mediante el uso de una secuencia peptídica correspondiente a los residuos 110 - 125 del receptor Nogo-1 de rata como inmunógeno. Generamos tres anticuerpos, 1H2, 3G5 y 2F7, mediante el uso de las membranas preparadas a partir de las células COS7 transfectadas con el receptor Nogo-1 completo de rata como inmunógeno. Generamos 13 anticuerpos mediante el uso de sNogoR310-Fc como inmunógeno (1D9.3, 1E4.7, 1B4.3, 2C4.3, 1F10.3, 2H1.4, 1H3.3, 1G4.1, 1E4.1, 2G7.1, 2C4.1, 2F11.1 y 1H4.1) y 7 anticuerpos mediante el uso de una secuencia peptídica correspondiente a los residuos 423 - 434 del receptor Nogo-1 de rata como inmunógeno (2E8.1, 2G11.2 y 1B5.1).

Análisis de la secuencia de los anticuerpos monoclonales 7E11 y 5B10

- 20 **[0394]** Extrajimos el ARN total mediante el uso del mini kit Qiagen® RNeasy® y generamos el ADNc a partir del ARN aislado. Amplificamos la secuencia de la cadena ligera mediante una PCR mediante el uso de los cebadores 5'-TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG-3' (ID. SEC. N°: 12) y 5'-AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG-3' (ID. SEC. N°: 25). Amplificamos la secuencia de la cadena pesada mediante una PCR mediante el uso de los cebadores 5'-GGGGATATCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTG-3' (ID. SEC. N°: 13) y 5'-GGGGATATCCACCATGAGGKCCCCWGCTCAGYTYCTKGGA-3' (ID. SEC. N°: 14). Estos cebadores comprenden nucleótidos degenerados como sigue: S representa G o C; M representa A o C, R representa G o A; W representa A o T; K representa G o T; e Y representa T o C. Clonamos los fragmentos de la PCR en un vector de secuenciación y determinamos la secuencia de ADN de las CDR mediante una terminación de la didesoxicadena mediante el uso de cebadores específicos para el vector de secuenciación. Tradujimos conceptualmente las secuencias de ADN, y las secuencias parciales de los aminoácidos de las regiones CDR de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales 7E11 y 5B10 se muestran en la Tabla 2. Las 3 CDR de las cadenas pesada y ligera de los mAb están subrayadas en la Tabla 2. Las cadenas ligeras de 7E11 y de 5B10 tienen una identidad de la secuencia de aminoácidos del 94 % y las cadenas pesadas tienen una identidad de la secuencia de aminoácidos del 91 %. Los mAb 7E11, 5B10 y 1H2 son del isotipo IgG1 y los mAb 3G5 y 2F7 son del isotipo IgG2a. Cada uno de estos cinco mAb tiene una cadena ligera del isotipo kappa. Analizamos la secuencia de los demás anticuerpos monoclonales mediante esta metodología.

TABLA 2. SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LOS MAB 7E11 Y 5B10

	Secuencia	ID. SEC. N°:
7E11 Cadena ligera	MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMQTPLSLPVSLGDAQASISCR <u>SSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS</u>NRFSGV PDR FSGSGSGTDFTLKISRVD <u>AE</u>DLGVYFC <u>SQ</u>STHVPFTFGGGTKL EIKRADAAPT VSISHH	5
	Secuencia	ID. SEC. N°:
5B10 Cadena ligera	MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMQTPLSLPVSLGDAQASISCR <u>SSQSLVHSNGYTYLHWYLQRP</u>GQSPKLLIYKVS <u>NR</u>FSGV PDR FSGSGSGTDFTLKISRVD <u>AE</u>DLGVYFC <u>SQ</u>STHVPYTF GGGGTKL EIKRADAAPT VSISHH	6
7E11 Cadena pesada	VQLQESGAELVMPGASVKMSCKASGYTFTDYWMHWVKQRP GQGLEWIG <u>AI</u>DP <u>SD</u>SYSSYNQ <u>N</u>FKG KATLTVDGSSSTAYMQL SSLTSEDS AVYYCARRITEAGAWFAYWGQGT TVT	7

5B10 Cadena pesada	LQXSGAEIVMPGTAVTMSCKASGYTFTDFWMHWVKQRPGQ GLEWIGAIDPSSDYSRINOKFKGKATLTVDESSSTAYMQLSSL TSEDSAVVYCARRITEAGAWFAYWGQGTITVT	18
--------------------	--	----

Cartografiado de los epítomos del anticuerpo monoclonal 7E11

[0395] El mAb 7E11 se une tanto al NgR1 de rata como al humano. Para determinar el epítipo responsable de la unión del 7E11, generamos fragmentos y péptidos sintéticos del NgR1 de rata y los ensayamos para comprobar la unión del 7E11.

[0396] Se trató un fragmento recombinante del NgR1 de rata que contiene la totalidad de los 8 dominios LRR con protecciones N y C terminales (sNgR310) con ácido o con bromuro de cianógeno (CNBr) y los fragmentos se separaron mediante una electroforesis en gel. El sNgR310 no tratado migra con un peso molecular aparente de 42 kDa. El tratamiento ácido del sNgR310 produjo dos productos de escisión principales de 15 kDa (aa 27 - aa 122) y de 30 kDa (aa 123 - aa 310). El tratamiento con CNBr generó tres fragmentos, un doblete de 33 / 35 kDa (aa 27 - aa 229), que puede representar los fragmentos con una glucosilación heterogénea, un producto de 10 kDa (aa 241 - aa 310) y un fragmento de 11 aminoácidos (aa 230 - aa 240) que no es retenido en el gel. Una inmunotransferencia western del gel se sondeó con 7E11 y se demostró que se unía al NgR1 de rata intacto (aa 27 - aa 310), al fragmento de ácido de 15 kDa (aa 27 - aa 122) y al fragmento de CNBr de 35 kDa (aa 27 - aa 229). El 7E11 no se une al fragmento ácido de 30 kDa (aa 123 - aa 310) ni al fragmento de CNBr de 10 kDa (aa 241 - aa 310). Tanto el fragmento ácido de 15 kDa como el fragmento de CNBr de 35 kDa contenían la secuencia LDLSADNQLRVDPPTT (ID. SEC. Nº: 1), coherente con la unión del 7E11 a un único epítipo del NgR1.

[0397] El sitio de unión del 7E11 se analizó adicionalmente mediante el ensayo de los digeridos peptídicos tripticos del sNgR310. Los análisis mediante HPLC mostraron numerosos fragmentos, indicando que había numerosos residuos de lisina y de arginina sensibles a la tripsina en la secuencia del NgR1. El 7E11 se unió únicamente a un único digerido peptídico triptico, proporcionando pruebas adicionales de que el 7E11 se une a un único epítipo del NgR1. La subsiguiente espectroscopía de masas (MS) y análisis de la secuencia identificaron el péptido unido como AAFTGLTLEQLDLSADNQLR (ID. SEC. Nº: 26).

[0398] El péptido LDLSADNQLRVDPPTT (ID. SEC. Nº: 1) se sometió a un análisis de cartografiado adicional. El péptido se digirió con tripsina, lo que produjo dos fragmentos principales, LDLSADNQLR (ID. SEC. Nº: 27) y VDPPTT (ID. SEC. Nº: 28) y se ensayó la capacidad del 7E11 para unirse a ellos. El análisis mediante EM reveló que el anticuerpo se unía al péptido LDLSADNQLR (ID. SEC. Nº: 27) y por lo tanto este péptido contiene el epítipo de unión para el 7E11. En esta fracción peptídica, un análisis detallado mediante EM identificó numerosos péptidos desordenados que también se unían al 7E11, incluyendo péptidos con una desaminación en la Asn115 y en la Gln117, una adición de Alanina en 112 o en 113, o una adición de Serina en 114 (Tabla 3). Estos datos indican que numerosos residuos de aminoácidos ubicados en este fragmento peptídico pueden no ser críticos para la unión del 7E11.

TABLA 3. PÉPTIDOS MUTANTES UNIDOS POR EL 7E11.

Péptidos unidos	Secuencia de aminoácidos
Fragmento natural desaminado	LDLSADNQLR (ID. SEC. Nº: 27) LDLSDDAELR (ID. SEC. Nº: 29)
Fragmento desordenado #1 desaminado	LDLASADNQLR (ID. SEC. Nº: 30) LDLASDDAELR (ID. SEC. Nº: 31)
Fragmento desordenado #2 desaminado	LDALSADNQLR (ID. SEC. Nº: 32) LDALSDDAELR (ID. SEC. Nº: 33)
Fragmento desordenado #3 desaminado	LDLSSADNQLR (ID. SEC. Nº: 34) LDLSSDEAELR (ID. SEC. Nº: 35)

[0399] El péptido LDLSADNQLRVDPPTT (ID. SEC. Nº: 1) también se digirió con la endoproteasa Asp-N y se ensayó la unión del 7E11. La endoproteasa Asp-N escindió el péptido en 3 fragmentos peptídicos, L, DLS y ADNQLPVPDPTT (ID. SEC. Nº: 36). De estos productos, el 7E11 se unió al péptido ADNQLRWDPPTT (ID. SEC. Nº: 36). Tomados conjuntamente, los datos de escisión de la tripsina y de la Asp-N localizan adicionalmente el epítipo de unión del 7E11 en la secuencia compartida por ambos, el ADNQLR (ID. SEC. Nº: 37).

[0400] Se analizaron las secuencias de aminoácidos del NgR1, del NgR2 y del NgR3 de varias especies para predecir residuos críticos en el epítipo de unión del 7E11 basándose en la observación de que el 7E11 se une al NgR1 de rata y humano pero no al NgR1 de ratón, al NgR2 humano ni al NgR3 de ratón. La alineación de la secuencia reveló que los aminoácidos 110 - 125 del NgR1 de rata y la correspondiente secuencia del NgR1 humano son idénticos, y que la secuencia del NgR1 de ratón difieren únicamente en un aminoácido en la posición 119 (Arg119 en el NgR1 de rata y humano e His119 en el NgR1 de ratón; Tabla 4).

TABLA 4. ALINEACIÓN DE LA SECUENCIA DE LOS NGR DE DIFERENTES ESPECIES.

Proteína(s)	Secuencia desde el aa 110 hasta el aa 119	ID. SEC. Nº:
NgR1 de rata y humana	LDLSADNQLR	27
NgR1 de ratón	LDLSADNQLH	38
NgR2 de rata y humana	LDLGDNRLHR	39
NgR3 de rata, humana y de ratón	LDLGDNRLR	40

10

[0401] La Arg119 del NgR1 contribuye a la unión del 7E11 porque se une bien al NgR1 de rata y humano pero mal al NgR1 de ratón. De forma análoga, debido a que el 7E11 no se une bien al NgR3, la Ala116 está implicada en el epítipo porque dentro de la secuencia ADNQLR (ID. SEC. Nº: 37), el NgR3 sólo difiere del NgR1 en una Arginina en la secuencia correspondiente. En la secuencia ADNQLR (ID. SEC. Nº: 37), 4 de los 6 residuos del NgR2 son idénticos a los del NgR1 de rata. La Ala116 y la Gln117 están sustituidas por Arginina e Histidina, respectivamente. Esto confirma que la Ala116 es un residuo de aminoácido importante que contribuye a la unión del 7E11, pero que no descarta necesariamente la implicación de la Gln 117.

[0402] Para verificar estos puntos de contacto se generaron numerosos péptidos que contienen mutaciones puntuales en la secuencia LDLSADNQLR (ID. SEC. Nº: 27) y se ensayaron para comprobar la unión del 7E11. Los péptidos se inmovilizaron en una placa MaxiSorp™ (Nunc™) y se aplicaron diluciones sucesivas del 7E11. Los valores resultantes de la CE₅₀ se muestran en la Tabla 5. El 7E11 se une a los mutantes de Leu110Ala y de Asp111Ala con unos valores de la CE₅₀ similares a los del péptido original. Cuando se ensayó con Gln117Ala, la CE₅₀ aumentó 30 veces, y cuando se ensayó con Arg119His la CE₅₀ aumentó 25 veces. El cambio más significativo en la CE₅₀ se observó cuando la Arg119 se mutó por Alanina.

TABLA 5. EL 7E11 SE UNE A LOS PÉPTIDOS MUTANTES CON DIFERENTES CE₅₀

Cambio en el péptido	Secuencia	CE ₅₀	ID. SEC. Nº:
Nº de cambios	LDLSADNQLRVVDPTT	0,55	1
L110A	<u>A</u> LDLSADNQLRVVDPTT	0,62	41
D111A	L <u>A</u> LSADNQLRVVDPTT	0,31	42
Q117A	LDLSADN <u>A</u> LRVVDPTT	16	43
R119H	LDLSADNQLH <u>V</u> VDPTT	12	44
R119A	LDLSADNQLA <u>V</u> VDPTT	88	45

[0403] También se determinó la posición del epítipo de unión del 7E11 en la recientemente resuelta estructura cristalina del sNgR310. Como se esperaba, la estructura demostró que el epítipo del 7E11 está expuesto en la superficie de la molécula. Los residuos Arg119, Gln117, Ala116 y Asp114 sobresalen hacia fuera de la estructura, mientras que la Leu118 y la Asn115 están localizadas hacia dentro. El epítipo está en la parte superior de un parche ácido de una superficie cóncava de la estructura y una superficie básica orientada hacia uno de los lados.

Inhibición de la unión del ligando al receptor soluble Nogo-1 por el anticuerpo monoclonal anti-receptor Nogo-1

[0404] Los anticuerpos monoclonales anti-receptor Nogo-1 producidos como se ha descrito anteriormente se ensayaron para determinar si inhibían la unión del ligando al receptor Nogo-1.

[0405] Se inmovilizaron 0,5 µg de una proteína de fusión de un receptor soluble Nogo-1 que comprende los residuos de aminoácidos 26 - 344 del receptor Nogo-1 de rata y la región bisagra y Fc de la molécula de IgG1 de

rata (sNogoR344-Fc) producidos como se describe a continuación, en 250 µg de microesferas de SPA conjugadas con proteína-A o con aglutinina de germen de trigo (Amersham Pharmacia Biotech) durante 2 horas a 25 °C. Se añadieron las microesferas de SPA acopladas con el mAb Fc-sNogoR-1 anti-receptor Nogo-1 y 1 µl de ¹²⁵I-Nogo66 (Amersham, 2.000 Ci/mmol, 1 nM) en 50 µl del medio de incubación tamponado con HEPES (HEPES 10 mM, pH 7,4, 0,1 % de albúmina sérica bovina, 0,1 % de ovoalbúmina, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM e inhibidores de la proteasa) a cada pocillo de muestra. Después de 16 horas se midió la radioactividad en las muestras por cuadruplicado mediante el uso de un TopCount® (Packard). Los valores de la CI₅₀ se calcularon a partir del análisis del ajuste de la curva (Fig. 3) (PRISM, programa informático GraphPad, NJ). En algunos experimentos también usamos conjugados de AP-ligando (por ejemplo, AP-Nogo66) y detectamos la unión mediante la monitorización de la actividad de la fosfatasa alcalina. También ensayamos la capacidad de los mAb para bloquear la unión de los ligandos MAG-Fc y AP-OM-gp al receptor Nogo-1.

[0406] Los anticuerpos monoclonales 7E11, 5B10, 1H2, 3G5 y 2F7 inhibían, todos, la unión del Nogo66, del MAG y del OM-gp al sNogoR344-Fc. La CI₅₀ calculada para el Nogo66 para el 7E11 y el 1H2 era de 400 nM y de 60 nM, respectivamente. Los datos de los ELISA que monitorizan la inhibición mediada por el mAb de la unión de los tres ligandos al receptor Nogo-1 se resumen en la Tabla 6.

TABLA 6. LOS MAB INHIBEN LA UNIÓN DEL NOGO66, DEL MAG Y DEL OM-GP AL RECEPTOR NOGO-1.

mAb	MAG + sNogoR344-Fc	Nogo66 + sNogoR344-Fc	OM-gp + sNogoR344-Fc
7E11	30 nM (60 %) CE ₅₀ = 0,5 mM	CE ₅₀ = 1,7 mM	CE ₅₀ = 150nM
1H2	30 nM (60 %)	ND	ND
3G5	30 nM (60 %)	CE ₅₀ = 9 nM	ND
2F7	30 nM (55 %)	CE ₅₀ = 10 nM	CE ₅₀ = 5 nM
1D9.3	30 nM (70 %) CE ₅₀ = 2,7 nM	CE ₅₀ = 13 nM	CE ₅₀ = 5,2 nM
2G7.1	30 nM (84 %)	CE ₅₀ = 18 nM	CE ₅₀ = 1 nM
1E4.1	30 nM (75 %) CE ₅₀ = 2,8 nM	-	CE ₅₀ = 9,1 nM
1G4.1	30 nM (90 %) CE ₅₀ = 9,9 nM	-	CE ₅₀ = 8,2 nM
2C4.1	30 nM (50 %)	-	ND
2F11.1	30 nM (45 %)	ND	ND
1H4.1	-	ND	ND
2E8.1	30 nM (87 %) CE ₅₀ = 9,2nM	CE ₅₀ = 1,5 mM	CE ₅₀ = 42,9 nM
2G11.2	30 nM (80 %)	ND	ND
1B5.1	30 nM (0 %)	ND	ND

20

[0407] Se muestra el porcentaje de desplazamiento a 30 nM de anticuerpo y la CE₅₀ para algunos mAb determinada a partir del análisis de ajuste de la curva según se describe. "—" indica que no hay ninguna actividad detectable, y "ND" indica no determinado.

25 EJEMPLO 2

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS FAB-FAGO ANTI-RECEPTOR NOGO-1

[0408] Los anticuerpos Fab-fago anti-receptor Nogo-1 que se unen específicamente a un polipéptido inmunógeno del receptor Nogo-1 de la divulgación también fueron elaborados mediante el cribado de una biblioteca de Fab-fago como sigue.

[0409] Se cribó la biblioteca de MorphoSys Fab-fago HuCAL® GOLD frente a la proteína recombinante soluble de rata sNogoR310-Fc y células COS7 que expresan el receptor Nogo-1 de rata. Los Fab-fagos que se unen específicamente al receptor Nogo-1 se purificaron y se caracterizaron. La cadena pesada de 14D5 deriva del gen

35

V_H2 y la cadena ligera deriva del gen V_κ1. Las secuencias de aminoácidos de las CDR de la cadena pesada y de la cadena ligera de uno de estos Fab-fagos, el 14D5, se muestran en la Tabla 7.

TABLA 7. SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LAS CDR DE 14D5

	Secuencia de aminoácidos	ID. SEC. Nº:
Cadena pesada de la CDR1	GFSLSSTSGGSVG	19
Cadena pesada de la CDR2	LIYSNDTKYYSTSLKT	20
Cadena pesada de la CDR3	SRFWTGEYDV	21
Cadena ligera de la CDR1	RASQNIATLN	22
Cadena ligera de la CDR2	LASSLQS	23
Cadena ligera de la CDR3	QQYDNYPL	24

[0410] El 14D5 se une al receptor Nogo-1 de rata en ambas formas monovalente y bivalente. Además, el 14D5 se une al receptor Nogo-1 humano y de ratón y al receptor Nogo-2 humano, pero no al receptor Nogo-3 de ratón.

EJEMPLO 3

INMUNOPRECIPITACIÓN DEL RECEPTOR NOGO-1 MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-RECEPTOR NOGO-1

[0411] Para llevar a cabo la inmunoprecipitación, se mezclaron 100 µl de células lisadas o 50 µl de células PiPLC tratadas con 400 o con 450 µl de tampón de extracción [Tris-HCl 10 mM, pH 7,2, 0,5 % de Tween-20™, PMSF 0,2 mM] o de tampón RIPA, respectivamente, en presencia de 30 µl de Proteína A o G y 1 - 2 µg de anticuerpo. La mezcla se incubó en un agitador a 4 °C durante 16 horas.

[0412] Las muestras se agitaron suavemente para sedimentar las microesferas acopladas a la proteína A o G. Las microesferas se lavaron tres veces con 1 ml de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM, pH 7,2, 0,1 % de Tween-20™). El lavado final se realizó mediante el uso de un 10 % del tampón de lavado original.

[0413] Las microesferas se resuspendieron en 100 µl de 2X SDS con un 10 % de beta-mercaptoetanol. Las muestras se incubaron a la temperatura ambiente antes de ser analizadas en un 4 - 20 % de gel de Tris-Glicina para una SDS-PAGE. Según se determinó mediante el análisis en gel de SDS-PAGE, los anticuerpos monoclonales, 3G5 y 2F7, inmunoprecipitan el receptor Nogo-1.

EJEMPLO 4

DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO MEDIANTE ELISA

[0414] Para determinar la especificidad de los anticuerpos monoclonales y Fab-fago producidos en los Ejemplos 1 y 2, llevamos a cabo un ELISA mediante el uso de un conjunto de polipéptidos del receptor Nogo-1. El conjunto consistía en la sNogoR310-Fc (una proteína de fusión que comprende los aminoácidos 26 - 310 del receptor Nogo-1 de rata y un fragmento Fc de rata), la sNogoR344-Fc (véase *supra*), el polipéptido p-617 (ID. SEC. Nº: 1), el polipéptido p-618 (un polipéptido de 19 aminoácidos de la región LRR7 del receptor Nogo-1 de rata; Fig. 2; ID. SEC. Nº: 11) y los polipéptidos p-4 y p-5 (polipéptidos de las regiones LRR5 y LRRCT del receptor Nogo-1, respectivamente). Se usaron ovoalbúmina y BSA como controles. Según se muestra en la Fig. 4, los mAb 1H2, 3G5 y 2F7 se unían todos específicamente al sNogoR344-Fc. En experimentos similares, esos anticuerpos también se unían específicamente a un polipéptido que consiste en los aminoácidos 310 - 344 del receptor Nogo-1 de rata (ID. SEC. Nº: 3) y los mAb 7E11 y 5B10 se unen específicamente al polipéptido p-617 (ID. SEC. Nº: 1).

[0415] Diez de los anticuerpos (1D9.3, 1E4.7, 1B4.3, 2C4.3, 1F10.3, 2H1.4, 1H3.3, 1G4.1, 1E4.1 y 2G7.1) de la inmunización sNogoR310-Fc se desplazaron entre sí por la unión, indicando que reconocen epítomos similares o solapantes del sNogoR310-Fc. Los otros tres anticuerpos de la inmunización sNogoR310-Fc (2C4.1, 2F11.1 y 1H4.1) reconocen epítomos diferentes localizados en los residuos de 26 - 310.

[0416] También llevamos a cabo ensayos de unión mediante ELISA mediante el uso del Fab-fago 14D5.

Cuando los ligandos AP-Nogo66, AP-OM-gp y MAG-Fc se dejaron unir al sNogoR344-Fc inmovilizado, el 14D5 a 1 mM inhibió completamente la unión a Nogo y MAG. Se requirió 10 mM de 14D5 para inhibir completamente la unión del OM-gp al sNogoR344-Fc.

5 EJEMPLO 5

ENSAYO DE CRECIMIENTO DE LAS NEURITAS

[0417] Para ensayar la capacidad de los anticuerpos monoclonales y Fab-fago producidos anteriormente para reducir el efecto inhibitorio de la mielina del CNS sobre las neuronas, se recubrieron portaobjetos de cultivo Lab-Tek® (4 pocillos) con 0,1 mg/ml de poli-D-lisina (Sigma®). Se punteó mielina del CNS o PBS en forma de gotas de 3 µl. Se añadieron microesferas fluorescentes (Polysciences) a la mielina / PBS para facilitar la posterior identificación de la gotas (Grandpre y col., Nature 403: 439 - 444 (2000)). Los portaobjetos Lab-Tek® se aclararon después y se recubrieron con 10 µg/ml de laminina (Gibco™). Se disociaron los ganglios de las raíces dorsales (DRG) de crías de ratas Sprague Dawley P3-4 con 1 mg/ml de colagenasa de tipo 1 (Worthington), se trituraron con pipetas Pasteur pulidas al fuego, y se colocaron previamente en las placas para enriquecer en células neuronales y finalmente se colocaron en placas a 23.000 células/pocillo en los portaobjetos de cultivo Lab-Tek® prerrecubiertos. El medio de cultivo era F12 que contiene un 5 % de suero equino de donante inactivado por calor, un 5 % de suero bovino fetal inactivado por calor y 50 ng/ml de mNGF, y se incubaron a 37 °C y un 5 % de CO₂ durante 6 horas. Se añadieron quince µg/ml del mAb 7E11 inmediatamente después de la colocación en las placas.

[0418] Los portaobjetos se fijaron durante 20 minutos con un 4 % de paraformaldehído que contiene un 20 % de sacarosa y se tiñeron para el marcador neuronal anti-tubulina beta-III (Covance TUJ1) diluido a 1:500. Como anticuerpo secundario se diluyó a 1:300 anti-ratón Alexa Fluor® 594 (Molecular Probes) y los portaobjetos se cubrieron con Gel/Mount™ (Biameda™). Se adquirieron imágenes digitales a 5x con el programa OpenLab™ y se analizaron mediante el uso del programa informático MetaMorph® para la cuantificación del crecimiento de la neurita.

[0419] El mAb 7E11 protegió las neuronas de los DRG de la inhibición del crecimiento de la neurita mediada por mielina (Fig. 5). Se observaron unos resultados similares con los mAb 1H2 y 3G5.

[0420] En un ensayo de protección del crecimiento de la neurita en el que se cultivaron neuronas de los DRG P7 de rata sobre el sustrato de mielina del CNS, el 14D5 bivalente también promovió eficazmente el crecimiento de la neurita.

35 EJEMPLO 6

INMUNOHISTOQUÍMICA CON EL 7E11 EN CÉLULAS TRANSFECTADAS CON EL RECEPTOR NOGO-1

[0421] Para caracterizar adicionalmente las propiedades de unión de los mAb anti-receptor Nogo-1 producidos según se describe en el Ejemplo 1, comparamos la unión a células COS-7 o 293 tanto fijadas como vivas que expresan el receptor Nogo-1 humano o de rata.

Células fijadas:

[0422] Se colocaron en placas células transfectadas y no transfectadas con el receptor Nogo-1 en portaobjetos de cultivo de 8 pocillos Lab-Tek®, se fijaron con un 4 % de paraformaldehído durante 15 minutos, se bloquearon con un 10 % de suero de cabra normal, un 0,1 % de Triton X-100 en PBS durante 1 hora. Se añadió el mAb 7E11 a 15 µg/ml y a 1,5 µg/ml en solución de bloqueo y se incubó durante 2 horas a la temperatura ambiente; el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa® (Molecular Probes) se incubó a una dilución de 1:300 en solución de bloqueo durante 1 hora; se añadió DAPI a 5 µg/ml al anticuerpo secundario para marcar todos los núcleos.

Células vivas:

[0423] Se colocaron en placas células transfectadas y no transfectadas en portaobjetos de cultivo de 8 pocillos Lab-Tek®, se bloquearon con tampón de FACS (que contiene un 4 % de suero equino de donante) durante 30 minutos a 4 °C, se incubaron con 7E11 a 15 µg/ml y a 1,5 µg/ml en tampón de FACS durante 1 hora a 4 °C, se aclararon y se incubaron con anticuerpo secundario anti-ratón-Alexa® (a 1:300 en tampón de FACS) durante 30 minutos a 4 °C.

[0424] Los experimentos de tinción inmunohistoquímica demostraron que todos los mAb se unían a las células que expresaban el receptor Nogo-1 de rata. Los mAb 7E11, 2G7.1 y 2C4.1 se unían tanto a las células fijadas como a las vivas que expresan el receptor Nogo-1 humano.

5 EJEMPLO 7

MODELO DE RATÓN DE LESIÓN CONTUSA DE LA MÉDULA ESPINAL

[0425] Para ensayar el efecto de los mAb anti-receptor Nogo-1 producidos en el Ejemplo 1 en neuronas *in vivo*, usamos un modelo de ratón de lesión contusa de la médula espinal.

[0426] Se tratan profilácticamente ratones hembra (18 - 22 g) con agentes analgésicos y antibióticos. Los ratones son anestesiados y colocados en un aparato estereotáxico con fijación de la columna vertebral bajo un estereomicroscopio. El traumatismo de la médula espinal se introduce mediante una versión modificada del método de caída por peso (M. Li y col., Neuroscience 99: 333 - 342 (2000).

[0427] En resumen, se realiza una laminectomía T9 y T10 y la columna vertebral se estabiliza mediante el uso de un par pinzas transversales de ratón que soportan los procesos transversales T9 - T10 bilateralmente. Una varilla de impacto de acero inoxidable con un diámetro de 1,4 mm y un peso de 2 g, se eleva 2,5 cm por encima de la duramadre y se deja caer en la médula espinal a nivel de la T10. Durante la cirugía, los ratones se mantienen en una manta calefactora a 37 °C y se administra 1 ml de solución salina estéril subcutáneamente a cada ratón después de la cirugía para evitar la deshidratación. La vejiga se exprime manualmente una vez al día hasta que se recupera el control reflejo de la vejiga.

[0428] Todos los animales reciben una analgesia postoperatoria cada 8 - 12 horas después de la cirugía, y tratamiento antibiótico dos veces al día durante 7 días a continuación. Los animales tienen acceso libre a alimentos y agua durante la duración del estudio. Los anticuerpos anti-receptor Nogo-1 son administrados en el sitio de la lesión a través de una inyección intratecal durante 28 días según se describe en el modelo de sección transversal de médula espinal de rata, a continuación.

EJEMPLO 8

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN SOLUBLES DEL RECEPTOR NOGO-1

[0429] Para caracterizar los polipéptidos solubles del receptor Nogo-1 (sNogoR-1) y las proteínas de fusión (Fc-sNogoR-1) llevamos a cabo el siguiente experimento.

[0430] Se inmovilizaron tres µg de receptores solubles Nogo (sNogoR310-Fc y sNogoR344-Fc) en 250 µg de microesferas WGA-SPA y recibieron 0,5 µl de ligando radioactivo (concentración final de 0,5 nM) en un volumen final de 100 µl de tampón de unión (HEPES 20 mM, a pH 7,4, Ca 2 mM, Mg 2 mM, un 0,1 % de BSA, un 0,1 % de ovoalbúmina e inhibidores de la proteasa). Los ligandos incluían Nogo66 10 µM, ¹²⁵I-Nogo40 10 µM (los aminoácidos 1 - 40 del NogoA) y 10 µl de anticuerpo anti-receptor Nogo-1 sobrenadante para cada conjunto de ligandos. Las tres tirosinas del Nogo40 se yodaron por separado y se denominaron Nogo40-A, -B y -C respectivamente. Los valores medios de los triplicados se presentan como el % normalizado de radioactividad unida (Figs. 6, 7 y 8). Las barras de error indican el EEM. La radioactividad unida en ausencia de inhibidores se tomó como el 100 %, y la menor radiactividad en presencia de Nogo40 10 µM se tomó como el 0 % para la normalización de los datos.

EJEMPLO 9

INHIBICIÓN DE LA UNIÓN DEL LIGANDO A LA PROTEÍNA DE FUSIÓN SOLUBLE DEL RECEPTOR NOGO-1

[0431] Se usó un ensayo de unión similar al ensayo de unión del Ejemplo 8 para ensayar la capacidad de dos mAb producidos en el Ejemplo 1 para inhibir la unión del ¹²⁵I-Nogo66 al sNogoR344-Fc. Los mAb 2F7 y 3G5 inhibieron la unión del ¹²⁵I-Nogo66 al sNogoR344-Fc.

EJEMPLO 10

ENSAYO DE CRECIMIENTO DE LA NEURITA

[0432] Se recubrieron portaobjetos de cultivo Lab-Tek® (4 pocillos) con 0,1 mg/ml de poli-D-lisina (Sigma®). Se

punteó por separado mielina del CNS sola o mezclada con el sNogoR310, la proteína de fusión sNogoR310-Fc, el mAb 5B10 o PBS de control en forma de gotas de 3 µl. Se añadieron microesferas fluorescentes (Polysciences) a la mielina / PBS para facilitar la posterior identificación de las gotas (Grand-pre y col., Nature 403: 439 - 444 (2000)). Después los portaobjetos Lab-Tek® se aclararon y se cubrieron con 10 µg/ml de laminina (Gibco™).

5

[0433] Se disociaron los ganglios de las raíces dorsales (DRG) de crías de ratas Sprague Dawley P3-4 con 1 mg/ml de colagenasa de tipo 1 (Worthington), se trituraron con pipetas Pasteur pulidas al fuego, y se colocaron previamente en las placas para enriquecer en células neuronales y finalmente se colocaron en placas a 23.000 células/pocillo en los portaobjetos de cultivo Lab-Tek® prerrecubiertos. El medio de cultivo era F12 que contiene un 10 5 % de suero equino de donante inactivado por calor, un 5 % de suero bovino fetal inactivado por calor y 50 ng/ml de mNGF, y se incubaron a 37 °C y un 5 % de CO₂ durante 6 horas.

[0434] Los portaobjetos se fijaron durante 20 minutos con un 4 % de paraformaldehído que contiene un 20 % de sacarosa y se tiñeron para el marcador neuronal anti-tubulina beta-III (Covance TUJ1) diluido a 1:500. Como 15 anticuerpo secundario se diluyó a 1:300 anti-ratón Alexa Fluor® 594 (Molecular Probes) y los portaobjetos se cubrieron con Gel/Mount™ (Biomed™). Se adquirieron imágenes digitales a 5x con el programa informático OpenLab™ y se analizaron mediante el uso del programa informático MetaMorph® para la cuantificación del crecimiento de la neurita.

20 **[0435]** El sNogoR310, el sNogoR310-Fc y el mAb 5B10 protegieron, todos, a las neuronas de los DRG de la inhibición del crecimiento de la neurita mediada por la mielina (Figs. 9 - 11). El sNogoR310 se usó en un ensayo similar mediante el uso de neuronas de pollo, y se averiguó que era protector.

[0436] También ensayamos el efecto neuroprotector de los receptores solubles Nogo mediante la realización 25 de experimentos con células cultivadas en presencia y en ausencia de laminina. El crecimiento de las células neuronales en medio sin laminina es bajo y sirve como modelo de condiciones de estrés neuronal.

[0437] Se diseccionaron los DRG de crías de rata de 6 - 7 días post-natales (P6-7), se disociaron en células individuales y se colocaron en placas de 96 pocillos cubiertas previamente con poli-D-lisina como se ha descrito 30 anteriormente. En algunos pocillos se añadieron 2 µg/ml de laminina durante 2 - 3 horas y se aclararon antes de poner las células en las placas. Después de 18 - 20 h de incubación, las placas se fijaron con un 4 % de paraformaldehído, se tiñeron con un anticuerpo anti-tubulina beta-III de conejo diluido a 1:500 (Covance®) y anti-HuC/D diluido a 1:100 (Molecular Probes) y se añadieron los anticuerpos secundarios fluorescentes (Molecular Probes) a una dilución de 1:200. Se usó el ArrayScan® II (Cellomics®) para capturar imágenes digitales a 5x y para 35 cuantificar el crecimiento de la neurita como el crecimiento promedio de la neurita/neurona por pocillo, mediante el uso de la aplicación de crecimiento de Neuritas. Se analizaron nueve imágenes a 5x de 3 pocillos / condición.

[0438] En algunos experimentos se usó un subclon de células PC12 (Neuroscreen™) (Cellomics®). Las células Neuroscreen™ se diferenciaron previamente durante 7 días con 200 ng/ml de NGF, se desprendieron y se volvieron 40 a colocar en placas de 96 pocillos recubiertas previamente con poli-D-lisina. En algunos pocillos se añadieron 5 µg/ml de laminina durante 2 - 3 horas y se aclararon antes de poner las células en las placas. Después de 2 días de incubación, las placas se fijaron con un 4 % de paraformaldehído, de tiñeron con un anticuerpo anti-tubulina beta-III de conejo diluido a 1:500 (Covance®) y con Hoechst (tinción nuclear). Se usó el ArrayScan® II para cuantificar el crecimiento de la neurita como en las células de los DRG.

45

[0439] Se añadieron el sNogoR344-Fc o la IgG de rata en solución a las neuronas de los DRG P6-7 y a células diferenciadas Neuroscreen™ en el momento de colocarlas en las placas.

[0440] El efecto neuroprotector del sNogoR344-Fc se observó a 1 µM y a 10 µM cuando se cultivaron las 50 neuronas de los DRG P6 en ausencia de laminina. La cuantificación del crecimiento de la neurita mostró un aumento dependiente de la dosis con la adición del sNogoR344-Fc. La adición de sNogoR344-Fc a las mismas concentraciones a las neuronas de los DRG que crecían en un sustrato de laminina no produjo ningún efecto inusual, lo que indica que el sNogoR344-Fc sólo es activo en las células estresadas. También se observó el efecto neuroprotector del sNogoR344-Fc a las mismas concentraciones en ausencia de laminina con las células 55 Neuroscreen™.

EJEMPLO 11

PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN FC-SNOGOR-1

60

[0441] Se condensó un constructo de ADNc que codifica para los aminoácidos 1 - 310 del receptor Nogo-1 de rata con Fc de IgG1 de rata que contenía un vector de expresión de mamífero, y este vector fue electroporado en células de ovario de hámster chino (CHO) (DG44). Las células se mantuvieron en alfa-MEM, complementado con un 10 % de suero bovino fetal dializado, glutamina 2 mM y reactivos antibióticos-antimicóticos. Dos días después de la transfección, el medio condicionado se recogió y se analizó mediante una inmunotransferencia Western en condiciones reductoras. Se detectó una banda proteica de aproximadamente 60 kDa mediante el uso de un anticuerpo policlonal de conejo anti-receptor Nogo-1. Las células se expandieron y se clasificaron mediante el uso de un anticuerpo de cabra anti-IgG de rata conjugado con R-PE. Después de la segunda clasificación, las células se colocaron en placas a una densidad de una célula/pocillo en placas de 96 pocillos. Los niveles de proteína secretada de receptor soluble Nogo-1 de los pocillos individuales fueron ensayados y comparados mediante el uso de un ELISA en sándwich. La placa de ELISA se recubrió con un anticuerpo específico Fck de cabra anti-IgG de rata. Se aplicó medio condicionado. La proteína del receptor soluble Nogo-1 unida fue detectada mediante un anticuerpo de burro específico de Fc anti-Fab de IgG de rata conjugado con HRP. El clon 4C12 tenía el mayor nivel de secreción. Se expandió el 4C12 y se cultivó en medio CHO-M7 en un matraz rotatorio. El nivel de secreción era de aproximadamente 10 mg/l a 37 °C.

[0442] Se cultivaron a gran escala células CHO que expresan la proteína de fusión sNogoR310-Fc. Se obtuvieron 1,7 l de medio condicionado concentrado a partir de un proceso en un biorreactor de 10 l. El pH se elevó mediante la adición de un décimo de volumen de Tris-HCl 1,0 M, a pH 8,9. Se añadieron cloruro de sodio sólido y glicina a 3,0 M y a 1,5 M, respectivamente. Se preparó una columna de A-Sepharose™ con 60 ml de proteína equilibrada con Tris-HCl 10 mM, cloruro de sodio 3 M, glicina 1,5 M, a pH 8,9. Se aplicó medio condicionado concentrado a la columna a 1,5 ml/min mediante el uso de una bomba peristáltica. La columna se lavó con 300 ml de Tris-HCl 10 mM, cloruro de sodio 3 M, glicina 1,5 M, a pH 8,9 seguido de 120 ml de Tris-HCl 5 mM, cloruro de sodio 3 M, a pH 8,9. La proteína se eluyó con fosfato de sodio 25 mM, cloruro de sodio 100 mM, a pH 2,8. Se recogieron fracciones de 10 ml en tubos que contienen 1,0 ml de HEPES 1,0 M, a pH 8,5. Las fracciones proteicas se agruparon y se dializaron frente a 3 x 2 l de fosfato de sodio 5 mM, NaCl 300 mM, a pH 7,4.

EJEMPLO 12

30 ENSAYO DE SECCIÓN TRANSVERSAL DE LA MÉDULA ESPINAL

[0443] Para ensayar su capacidad de promover la recuperación funcional *in vivo*, se ensayó una proteína de fusión sNogoR-1 en un ensayo de sección transversal de médula espinal de rata.

[0444] Se cargaron bombas osmóticas Alzet® con la solución de ensayo (sNogoR310-Fc en PBS) recién preparada el día de su uso. La concentración de carga se calculó en 5 y en 50 µM. Las bombas se cebaron durante > 40 horas a 37 °C antes de su implantación en los animales. A las ratas Long Evans hembras se les administró analgesia preoperatoria y un tranquilizante, y se anestesiaron mediante el uso de isoflurano (al 3 % en O₂).

[0445] Las ratas se colocaron en un marco estereotáxico y se expuso la corteza motora para la infusión del agente de trazado del tracto BDA (PM de 10.000) bilateralmente. Las ratas experimentaron una hemisección dorsal de la médula espinal en T5 - T6, seguido de la implantación del catéter intratecal y del sistema de bombeo para administrar el compuesto de ensayo (n = 11 por grupo).

[0446] Las ratas se dejaron recuperar y sobrevivieron hasta 28 días después de la cirugía. Se registró la puntuación de comportamiento mediante el uso del sistema BBB hasta 28 días después de la inducción de la lesión, justo antes de la finalización de la fase en vida del estudio. Después de una perfusión y una fijación, se extrajeron las médulas espinales, se crioprotegieron, se seccionaron, se tiñeron y se llevaron a cabo los recuentos axonales.

[0447] En las ratas y en los ratones después de la lesión se monitorizaron la escala de valoración locomotora de Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) (Basso y col., Neurotrauma 13: 343 - 359 (1996)), la prueba de plano inclinado y la prueba de caminar sobre una rejilla inclinada (Li y Strittmatter, J Neurosci. 23: 4219 - 27 (2003)). En la prueba del plano inclinado medimos el ángulo máximo con el que podía inclinarse una tabla de 50 cm x 60 cm durante 5 s sin que el ratón se deslizara. Para la prueba de caminar sobre una rejilla inclinada, se entrenaron los ratones para que escalaran una rejilla de alambre (35 cm de largo con cuadrados de 2,54 cm) con una pendiente de 45 grados. Se puntuó el número de casos en los que la extremidad posterior caía por debajo del plano de la rejilla para cada excursión desde la parte inferior hacia la superior. Para el ensayo de comportamiento de la rata se realizaron la escala locomotora BBB, caminar sobre la rejilla y el análisis de las huellas. Para caminar sobre la rejilla, las ratas se entrenaron para que caminaran sobre una rejilla de alambre (de 70 cm de largo con cuadrados de 2,54 cm) y se contó el número de casos en los que la extremidad posterior caía por debajo del plano de la rejilla. Para el análisis

de las huellas se registraron los patrones de pisada de las extremidades posteriores de la rata con tinta durante una locomoción continua a lo largo de una pista de 90 cm y se calcularon la longitud de la zancada en cada lado y el ancho de la zancada (Metz y col., Brain Res. 883: 165 - 177 (2000)). Todos estos ensayos de comportamiento fueron realizados por al menos dos individuos. A lo largo de la cirugía, los ensayos de comportamiento y de los análisis histológicos, los investigadores desconocían la identidad del compuesto de la minibomba.

[0448] El sNogoR310-Fc promovió la recuperación funcional (Fig. 12).

EJEMPLO 13

10

ENSAYO DE CONTUSIÓN DE LA MÉDULA ESPINAL DE RATA

[0449] Se ensaya el efecto de los polipéptidos y de las proteínas de fusión solubles del receptor Nogo-1 en neuronas *in vivo* en un ensayo de contusión de la médula espinal de rata.

15

[0450] Se tratan profilácticamente ratas Long Evans hembras encapuchadas (de 170 - 190 g) con agentes analgésicos y antibióticos. Diez minutos antes de la cirugía los animales se tranquilizan con 2,5 mg/kg de midazolam i.p. y se anestesian con un 2 - 3 % de isoflurano en O₂. Después las ratas se rasuran, se limpian con alcohol y betadine y se aplica lubricante ocular en los ojos. Después se realiza a una incisión hacia abajo a lo largo de la línea media y se exponen las vértebras T7 hasta T12.

20

[0451] Se realiza una laminectomía dorsal en T9 1/2 y en T10 para exponer la médula. La rata se monta en el Impactor. En primer lugar se fijan los segmentos T7 y T8, y después los segmentos T11 y T12 se unen a la fijación caudal. Se pone un material blando bajo el pecho de la rata. La varilla del Impactor se pone en posición cero y la presilla de tierra eléctrica se une al borde de la herida. Entonces se eleva la varilla del Impactor hasta 25,0 mm y se ajusta apropiadamente en una posición directamente por encima de la médula espinal expuesta. Después se libera la varilla del Impactor para que golpee la médula expuesta e inmediatamente se sube la varilla del Impactor.

25

[0452] Después se desmonta la rata y se pone Gelespuma® en la herida. Se sutura el músculo que rodea la herida y la incisión se grapa quirúrgicamente. Los animales se colocan en una incubadora hasta que se recuperan de la anestesia. A las ratas se les administran antibióticos, analgésicos y solución salina según sea necesario. Las vejigas se exprimen cada mañana y tarde a continuación hasta que se recupera la función.

30

[0453] La proteína de fusión soluble del receptor Nogo-1 (por ejemplo, sNogoR310-Fc) se administra intratecalmente según se describe en el modelo anterior de sección transversal de médula espinal de rata. La puntuación de BBB se realiza un día después de la cirugía, después cada semana a continuación hasta entre 4 y 6 semanas.

35

EJEMPLO 14

40

EXPRESIÓN DEL SNOGOR310 EN RATONES TRANSGÉNICOS

[0454] Produjimos ratones transgénicos que expresan la proteína soluble del receptor Nogo-1 para ensayar su efecto cuando es expresada *in vivo*.

45

[0455] Clonamos el ADNc del sNogoR310 de ratón (correspondiente a los aminoácidos 1 - 310 del receptor Nogo-1) en el sitio *NotI* del vector C-3123. En este vector, la expresión del sNogoR310 está bajo el control de los elementos reguladores del gen de la proteína ácida fibrilar glial (*gfap*), que permiten un alto nivel de expresión con una secreción mejorada a partir de astrocitos reactivos en el sitio de la lesión. Digerimos el vector resultante secuencialmente con *AatII* y *SfiI* y aislamos el constructo *gfap*:*sNogoR310* en un fragmento de 3,4 kb. Microinyectamos este fragmento en embriones para generar ratones transgénicos. Verificamos mediante una PCR que el transgen se había integrado, e identificamos cinco líneas fundadoras. Cruzamos machos heterocigóticos de las dos líneas fundadoras con los mayores niveles de expresión, con ratones hembra C57BL/6J. Confirmamos que las células positivas para GFAP expresan y secretan el sNogoR310 en ratones transgénicos heterocigóticos mediante un análisis por inmunotransferencia Western mediante el uso de un anticuerpo creado contra el receptor Nogo-1.

50

[0456] Homogenizamos la corteza y la médula espinal en solución salina tamponada con Tris complementada con inhibidores de la proteasa (Roche) y centrifugamos el homogeneizado a 40.000 rpm durante 20 min a 4 °C. Tratamos el sobrenadante con un 4 % de paraformaldehído durante 20 min para mejorar la especificidad del

60

anticuerpo y dializamos antes de la inmunotransferencia. Homogeneizamos la fracción particulada mediante la aplicación de ultrasonidos en tampón RIPA (1 % de Triton® X-100, 0,5 % de desoxicolato de sodio, 0,1 % de SDS en PBS), centrifugamos homogeneizado resultante y tratamos este sobrenadante (fracción de particulado soluble en detergente) como anteriormente. Analizamos 20 µg de proteína cerebral o de médula espinal mediante una inmunotransferencia mediante el uso de antisuero de conejo creado contra el receptor Nogo-1 a una dilución de 1:2.000. Visualizamos la inmunorreactividad mediante una incubación con IgG anti-conejo conjugada con AP y sustratos de NBT/BCIP AP.

[0457] Detectamos el sNogoR310 de 37 kDa secretado en los extractos solubles exentos de detergente de la corteza y de la médula espinal de las dos líneas transgénicas Tg08 y Tg01, pero hay presente poca, si la hay, proteína soluble del receptor Nogo-1 a 37 o a 81 kDa en la camada de los ratones naturales (WT). El examen de las fracciones particuladas demostró que había niveles comparables del receptor Nogo-1 endógeno en ambos ratones naturales y transgénicos.

15 EJEMPLO 15

EXPRESIÓN DEL SNOGOR310 EN RATONES TRANSGÉNICOS DESPUÉS DE LA LESIÓN

[0458] Ensayamos el efecto de la lesión del CNS sobre la expresión del sNogoR310 en ratones transgénicos mediante la realización de una sobre-hemisección de la lesión dorsal. Obtuvimos animales sNogoR310 transgénicos y no transgénicos de control mediante el apareamiento de machos heterocigóticos con C57/BL6 según se describe en el Ejemplo 14.

[0459] Anestesiemos profundamente hembras adultas heterocigóticas transgénicas de la camada de ratones naturales (de 10 - 16 semanas de edad) y realizamos una laminectomía completa, exponiendo totalmente la parte dorsal de la médula espinal en los niveles de T6 y T7. Realizamos una sobre-hemisección dorsal en T6 con una aguja de calibre 30 y un par de microtijeras para seccionar completamente los tractos corticoespinales dorsales y dorsolaterales (CST). Pasamos una aguja marcada a través de la parte dorsal de la médula espinal varias veces para asegurar que la lesión estaba a una profundidad de 1,0 mm. Suturamos las capas musculares sobre las laminectomías y cerramos la piel de la espalda con de grapas quirúrgicas. Para trazar los tractos corticoespinales, realizamos una perforación con una fresa sobre la corteza cerebral del lado derecho del cráneo 14 días después de la lesión de la médula espinal. Aplicamos el trazador BDA (PM de 10.000, al 10 % en PBS) (Molecular Probes, Eugene, OR) en los 4 sitios de inyección a una profundidad de 0,7 mm de la superficie cortical. Cuatro semanas después de la lesión, los ratones fueron perfundidos transcardiacamente con PBS, seguido de un 4 % de paraformaldehído. Los ratones usados para los experimentos de expresión del sNogoR310 no recibieron inyección de trazador.

[0460] Para los ratones usados para el análisis mediante inmunotransferencia western, se recoge la médula espinal en el nivel entre T3 y L3 sin perfusión 14 días después de la lesión. Los ratones usados para la tinción inmunohistoquímica del receptor Nogo-1 fueron perfundidos con un 4 % de paraformaldehído 10 días después de la hemisección, y la médula espinal lesionada se extrajo para su seccionamiento. Para analizar la expresión del sNogoR310 en el cerebro lesionado de los ratones transgénicos y naturales, se realizó una herida penetrante en la corteza con una pala de escalpelo del número 11 sostenida en un aparato estereotáxico (David Kopf, Tujunga, CA). Se realiza un corte parasagital de 4 mm, 0,5 mm posterior al Bregma, 1,5 mm lateralmente de la línea media y a una profundidad de 3,5 mm.

[0461] Detectamos un aumento en los niveles del sNogoR310 en los extractos solubles de las médulas espinales diez días después de la lesión en los ratones transgénicos, pero no en los ratones naturales, lo que es coherente con la regulación por aumento después de la lesión del GFAP que rodea la lesión. Para confirmar que esto no era debido a una regulación por aumento compensatoria del Nogo-A, ensayamos su expresión y se averiguó que era similar tanto en la corteza como en la médula espinal lesionada o intacta tanto de los ratones naturales como de los transgénicos

[0462] Examinamos la expresión celular del sNogoR310 en el CNS lesionado mediante una inmunotinción del cerebro lesionado y de la médula espinal que contiene el área de la lesión con anticuerpos contra el receptor Nogo-1 y GFAP. La morfología general de la glía astrocítica reactiva no difiere entre los ratones naturales y los transgénicos, pero la densidad de la tinción para el receptor Nogo-1 en ambos espacios intra y extracelulares es notablemente superior en los ratones transgénicos *gfap: sNogoR310* con respecto a los ratones naturales, lo que indica un aumento de la expresión del sNogoR310 alrededor de la lesión en los ratones transgénicos. La proteína del receptor Nogo-1 se localiza conjuntamente con el marcador astrocítico GFAP únicamente en los ratones transgénicos.

También hay una tinción no celular difusa muy mejorada en las muestras transgénicas, lo que es coherente con el sNogoR310 en el espacio extracelular. La tinción del receptor Nogo-1 del cuerpo celular neuronal es detectada en ambos ratones tanto naturales como transgénicos.

5 EJEMPLO 16

EL SNOGOR310 SECRETADO INDUCE LA GERMINACIÓN DEL CST EN RATONES TRANSGÉNICOS

[0463] Ensayamos si el aumento en la expresión del sNogoR310 alrededor de la lesión en ratones transgénicos da como resultado la regeneración de los axones lesionados.

[0464] Investigamos la integridad de los tractos corticoespinales descendentes (CST) mediante la inyección anterógrada del trazador de biotina dextrano amina (BDA) en la corteza motora derecha según se describe en Li y Strittmatter, J. Neurosci. 23: 4219 - 27 (2003). En la camada de los ratones naturales, el prominente CST dorsal (dCST) está estrechamente empaquetado rostral a la lesión y son visibles unas pocas fibras dorsolaterales del CST ipsilateralmente. Un pequeño número de brotes colaterales cortos marcados con BDA se proyectan hacia la sustancia gris, particularmente en la médula ventral, pero la germinación está ampliamente confinada al lado de la médula contralateral a la inyección del trazador. Sin embargo, las secciones rostrales a la hemisección dorsal de los ratones transgénicos sNogoR310 lesionados indica un patrón de marcaje de BDA algo diferente. Se observa una elevada densidad de fibras del CST marcadas con BDA fuera del dCST prominente en todos los ratones transgénicos de la línea Tg08 o de la línea Tg01. Se extienden fibras ectópicas por toda el área de la sustancia gris y algunas fibras alcanzan la sustancia blanca lateral y dorsolateral. Se observan numerosas fibras (4 - 12 germinaciones por sección transversal) en el lado opuesto de la médula espinal (ipsilateral al sitio de inyección del trazador). La medición microdensitométrica de los brotes colaterales indica un aumento de aproximadamente diez veces en la densidad de germinación en los ratones transgénicos sNogoR310. El examen de las secciones parasagittales longitudinales de 1 a 4 mm rostrales a la lesión revela que las fibras del dCST se extienden en un gran número de brotes ramificados en el área ventral de la materia gris en ratones transgénicos sNogoR310, en contraste con los animales de la camada natural. Generalmente, el patrón y el grado de germinación rostral a la lesión en los ratones transgénicos son similares a los observados en los ratones tratados sistémicamente con el péptido antagonista del receptor Nogo-1 NEP1-40 (Li y Strittmatter, J. Neurosci, 23: 4219 - 27 (2003)).

[0465] Estos resultados demuestran que el sNogoR310 secretado induce la germinación del CST en los ratones transgénicos.

35 EJEMPLO 17

LOS AXONES DEL CST EN REGENERACIÓN ELUDEN EL SITIO DE LESIÓN EN LA MÉDULA ESPINAL DISTAL EN RATONES TRANSGÉNICOS SNOGOR310

[0466] Aislamos la médula espinal 4 mm rostral y 4 mm caudal al sitio de la lesión (8 mm de longitud en total) de ratones transgénicos y la incluimos en una matriz de albúmina polimerizada con glutaraldehído y la cortamos parasagittalmente con un vibratome (30 mm de espesor). Recogimos las secciones transversales (50 mm) de la médula espinal 5 - 7 mm rostral y 5 - 7 mm caudal al sitio de la lesión. Para los experimentos de inyección del sNogoR310-Fc en ratas se cortó parasagittalmente la médula espinal que se extiende desde 10 mm rostral hasta 10 mm caudal del sitio de la lesión (50 mm) con un micrótopo de vibración. Se recogieron secciones transversales de la médula espinal 11 - 16 mm rostral y 11 - 16 mm caudal al sitio de la lesión. Incubamos las lesiones con un complejo de avidina-biotina-peroxidasa y visualizamos el trazador BDA mediante una reacción con diaminobenzidina HRP potenciada con níquel (Grandpre, Nature 417: 547 - 551 (2002)). Procesamos algunas secciones para la inmunohistoquímica de serotonina (anticuerpo anti-5-HT) mediante una inmunofluorescencia indirecta. Para visualizar el área de la lesión, realizamos una tinción doble de algunas secciones con anticuerpos dirigidas contra la GFAP (Sigma®, St. Louis, MO). Montamos, deshidratamos y cubrimos las secciones con medio de montaje.

[0467] Ensayamos si las fibras inducidas por el sNogoR310 expresado en los ratones transgénicos después de la lesión (véase Ejemplo 16) atraviesan el área de la lesión de la médula espinal caudal para proporcionar una recuperación funcional.

[0468] Las secciones parasagittales sucesivas a través del sitio de la lesión en cámara lúcida muestran el patrón de distribución global de las fibras del CST en regeneración a unos pocos milímetros de la lesión. En las secciones de los ratones naturales no aparecen fibras del CST extendiéndose más allá del sitio de la lesión. Las secciones similares de los ratones transgénicos sNogoR310 muestran numerosas fibras del CST que atraviesan el

área de la sección transversal y se proyectan en las áreas de la sustancia gris y blanca distal con un patrón muy ramificado. Inmediatamente rostral a la sección transversal, se proyecta una elevada densidad de brotes del CST marcados con BDA originados en el dCST prominente en el área de la lesión, pero la mayoría de los brotes del CST no consiguió atravesar el área de la sección transversal en la que la formación de cicatrices y la cavitación del tejido son prominentes. Una pequeña pero muy significativa fracción de los axones en regeneración eluden el sitio de la lesión a través de puentes en el tejido remanente de la sustancia gris y blanca ventral y ventrolateral. Además, unas pocas fibras del CST parecen cruzar el área de la propia sección transversal a través de la médula espinal dorsal y dorsolateral en las regiones distales. En las inmediaciones de la lesión, el curso de las fibras en regeneración era normalmente tortuoso y bastante distinto de las fibras lineales normales del CST rostral. Las fibras colaterales y ramificadas se observan más frecuentemente en el área de la sustancia gris de la médula espinal distal. La reconstrucción muestra 5 - 15 fibras en regeneración marcadas con BDA a lo largo del eje rostral-caudal en cualquier nivel a 1 - 4 mm caudal a la lesión en cada ratón transgénico. Para las secciones transversales 5 - 7 mm de la sección transversal caudal hacia dorsal, se observan axones del CST marcados con BDA en ambas áreas de la sustancia gris y de la sustancia blanca en cada ratón transgénico. Los recuentos de fibras de los ratones transgénicos indican un número aproximadamente similar de fibras del CST marcadas con BDA en los niveles proximales de las secciones sagitales.

[0469] Además de las fibras del CST, los demás tractos descendentes, tales como las fibras rafespinales, también contribuyen a la función locomotora en los ratones. En este modelo de supra-hemisección dorsal de ratón, la sección transversal lesiona la mayoría de las fibras serotoninérgicas, disminuyendo la densidad de estas fibras en aproximadamente un 80 % en el asta anterior. El análisis de la longitud total de las fibras de serotonina en el asta anterior de la médula espinal caudal indica un número mucho mayor de estas fibras en ratones transgénicos que en el grupo natural, lo que indica que los efectos promotores del crecimiento del sNogoR310 en los ratones transgénicos no están limitados a una vía descendente de axones.

EJEMPLO 18

LA EXPRESIÓN TRANSGÉNICA DEL SNOGOR310 MEJORA LA RECUPERACIÓN LOCOMOTORA

[0470] El análisis del trazador del axón del CST y de la fibra serotoninérgica indica que el sNogoR310 liberado desde los astrocitos en los ratones transgénicos estimula una amplia regeneración anatómica de los axones descendentes lesionados de la médula espinal. Realizamos varias pruebas de comportamiento según se describe en el Ejemplo 12 para determinar si estas fibras regeneradas benefician una recuperación funcional

[0471] Como se evaluó mediante la prueba de BBB, los ratones naturales recuperaron parcialmente la función locomotora durante un periodo de supervivencia de cuatro semanas. A las cuatro semanas después de la lesión, la mayoría de los ratones naturales recuperó un nivel caracterizado por un apoyo plantar coherente con un soporte coherente del peso, pero mostraban una coordinación anteroposterior únicamente entre ocasional y frecuente, con una rotación de la posición predominante de la extremidad cuando realizaba el contacto inicial con la superficie. Por el contrario, las puntuaciones de BBB de los ratones transgénicos sNogoR310 de ambas líneas Tg08 y Tg 01 son significativamente superiores a las del grupo de control a lo largo del periodo de observación de 7 - 28 días (Figs. 13A y 13B). A los 28 días después de la lesión, la mayoría de los ratones transgénicos mostró una coordinación coherente anteroposterior, y la posición predominante de la extremidad es paralela al cuerpo.

[0472] Empleamos dos pruebas más de comportamiento para caracterizar adicionalmente el desempeño de los ratones transgénicos sNogoR310. En primer lugar medimos el ángulo máximo al cual podría inclinarse la tabla sin que el ratón perdiera su adherencia durante 5 s. Antes de la lesión por hemisección dorsal, tanto los ratones transgénicos como los naturales podían mantener su postura en una tabla inclinada a 55 grados. En los días 7 - 28 después de la lesión, el ángulo sostenible se reduce en todos los ratones, pero los ángulos sostenibles por los ratones transgénicos son significativamente mayores que los del grupo de control (Fig. 13C). En otra prueba de comportamiento los ratones ascendieron por una rejilla colocada a un ángulo de 45 grados con respecto a la vertical y se contaron las incursiones de las extremidades posteriores por debajo del plano de la rejilla (Metz y col., Brain Res. 883: 165 - 177 (2000)). Ningún ratón cometió errores en esta prueba durante el entrenamiento previo a la lesión. Se producen numerosos errores de fallo de pisada con únicamente una mínima mejora en los ratones naturales durante el periodo de 2 - 6 semanas después de la lesión. Por el contrario, los ratones transgénicos sNogoR310 mostraron una mejora progresiva en el ascenso de la rejilla durante este periodo, produciéndose la mayoría de las mejoras entre 1 - 3 semanas después de la lesión (Fig. 13D). Por lo tanto, los ratones transgénicos que secretan sNogoR310 desde los astrocitos muestran una regeneración del CST, una germinación rafespinal y una función locomotora mejorada después de una hemisección espinal torácica.

EJEMPLO 19**LA ADMINISTRACIÓN INTRATECAL DE LA PROTEÍNA SNOGOR310-FC INDUCE LA GERMINACIÓN DEL CST**

5 **[0473]** Como un segundo ensayo del beneficio promotor del crecimiento del receptor soluble Nogo-1 después de un traumatismo espinal, administramos la proteína purificada intratecalmente.

[0474] Fusionamos el dominio de unión al ligando (27 - 310) del receptor Nogo-1 con el dominio Fc de la IgG1 de rata para promover la estabilidad y la purificación. Purificamos la proteína a partir de células CHO transfectadas de forma estable. Esta proteína bloquea la acción del Nogo-66, de la MAG y de la mielina *in vitro*, como se mostró previamente para la His sNogoR310-Myc de ratón (Fournier y col., J Neurosci. 22: 8876 - 8883 (2002); Liu y col., Science 297: 1190 - 1193 (2002)). Administramos la proteína sNogoR310-Fc intratecalmente a ratas con una lesión por con hemisección dorsal torácica media a través de una minibomba osmótica. Durante un periodo de supervivencia de cuatro semanas después de la lesión, se administraron 1,2 mg de la proteína sNogoR310-Fc localmente a cada rata. En las ratas que recibieron al tratamiento con vehículo (1,2 mg de IgG de rata), las secciones rostrales a la hemisección muestran el CST dorsal prominente fuertemente empaquetado, y muy pocas fibras ectópicas del CST marcadas con BDA por encima del sitio la lesión. Las secciones rostrales a la lesión en las ratas lesionadas que recibían la proteína sNogoR310-Fc muestran un patrón de marcaje algo diferente. Se observan numerosas fibras ectópicas germinando del CST marcado con BDA en las secciones transversales y parasagitales. En algunos casos, hay proyecciones que cruzan el área del dCST próxima a la línea media de la circunferencia de la médula, entremezclándose con el CST dorsolateral. Los axones en germinación se extienden a través de la sustancia gris en un mayor grado que en la sustancia blanca. Una medición de las fibras ectópicas en germinación ($\geq 100 \mu\text{m}$ en las secciones transversales, $\geq 200 \mu\text{m}$ en las secciones sagitales) adyacentes al dCST revela un aumento mayor en las ratas tratadas con sNogoR310-Fc.

EJEMPLO 20**LOS AXONES DEL CST SE REGENERAN HACIA LA MÉDULA ESPINAL DISTAL EN RATAS TRATADAS CON SNOGOR310-FC**

30 **[0475]** Anestesiomas profundamente ratas Sprague-Dawley hembras (de 190 - 250 g) y realizamos laminectomías en los niveles de la médula T6 - 7, exponiendo la médula espinal. Cortamos la mitad dorsal de la médula espinal con una aguja de calibre 30 y un par de microtijeras para seccionar las partes dorsales de los tractos CSST y aseguramos la profundidad de la lesión (1,8 mm) haciendo pasar la parte afilada de una cuchilla del número 11 a través de la mitad dorsal de la médula (Grandpre y col., Nature 417: 547 - 551 (2002)). Se suturó una minibomba osmótica (Alzet® 2ML4, 2 ml de volumen, 2,5 ml/h, 28 vías de administración), que se llenó con 1,2 mg de IgG de rata en PBS o con 1,2 mg de la proteína de fusión sNogoR310-Fc en PBS, a los músculos subcutáneos de la espalda de los animales. Se insertó un catéter conectado a la salida de la bomba en el espacio intratecal de la médula espinal a nivel T7 - 8 a través de una pequeña perforación en la duramadre.

40 **[0476]** La proteína de fusión del antagonista del receptor Nogo-1 indujo una amplia germinación rostral a la hemisección en la rata, pero un aspecto más crítico es si las fibras del CST en germinación se proyectan hacia la médula espinal distal y contribuyen a la recuperación locomotora. Las secciones longitudinales a través del sitio de la lesión en las ratas tratadas con vehículo no muestran fibras del CST ventrales marcadas con BDA detectables, o un número muy bajo, por debajo del nivel de la lesión (Grandpre y col., Nature 417: 547 - 551 (2002); Weidner y col., Proc. Natl. Acad Sci. EE.UU. 98: 3513 - 3518 (2001)). Las secciones similares de las ratas tratadas con sNogoR310-Fc muestran muchas fibras marcadas con BDA eludiendo el sitio de la sección transversal y proyectándose hacia la médula espinal caudal ampliamente a través de tejidos de puente de la médula espinal ventral y ventrolateral. La inmunotinción para el marcador astrocítico GFAP muestra que el grado de la sección transversal alcanzó más allá del área del canal central. Al contrario que el perfil lineal de las fibras rostrales del CST dorsal prominente, las fibras del CST regenerado siguen habitualmente una trayectoria muy ramificada en la médula espinal distal, particularmente en el área de la sustancia gris. Estas fibras son detectadas en muchas regiones de la médula espinal, pero se ven más fácilmente en la parte de la mitad central y dorsal de la médula espinal a lo largo de la médula espinal. Los recuentos de las fibras del CST de las secciones sagitales indican aproximadamente 20 axones marcados con BDA a 1 - 2 mm caudal a la lesión y 15 axones localizados a 7 - 8 mm distales a la lesión de cada rata tratada con sNogoR310-Fc-.

55 **[0477]** Generalmente, el patrón de ramificación de estas fibras es similar al observado en los animales tratados con el péptido NEP 1-40 local, pero se observan más ramificaciones colaterales en cada brote en las secciones tratadas con la proteína sNogoR310-Fc. Una medición de los brotes de la médula espinal distal

demuestra que la longitud colateral total de cada brote en las ratas tratadas con sNogoR310-Fc es dos veces mayor que la de los animales tratados con NEP 1-40. El número de brotes ($\geq 200 \mu\text{m}$ de longitud) a 1 - 10 mm caudal a la médula espinal en ambos grupos tratados con un antagonista del receptor Nogo-1 es aproximadamente 20 - 40 veces mayor que en los grupos de control. Se observan más brotes en las ratas tratadas con sNogoR310-Fc que con el tratamiento con NEP 1-40 local (~ 50 frente a 25 brotes / rata), pero esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p = 0,1713$, prueba de la t).

[0478] Se observan axones del CST en regeneración en las secciones transversales de la médula espinal a 11 - 15 mm caudales a la hemisección en las ratas que recibieron el tratamiento con sNogoR310-Fc. Estas fibras son detectadas tanto en la sustancia gris como en la sustancia blanca de la médula espinal. Las fibras detectadas en la sustancia gris muestran a menudo más ramificaciones colaterales que en el área de la sustancia blanca. Por el contrario, en las secciones transversales del grupo tratado con vehículo sólo se observan ocasionalmente marcados con BDA en el área ventral de la sustancia blanca, coherente con los axones no lesionados del CST ventral. A este nivel de la médula espinal distal, el número medio de fibras del CST marcadas con BDA de ambos grupos tratados con un antagonista del receptor Nogo-1 [sNogoR310-Fc y NEP 1-40] es aproximadamente 20 veces mayor que las ratas tratadas con vehículo. Tomados conjuntamente, ambos antagonistas del receptor Nogo, la proteína sNogoR310-Fc y el péptido NEP 1-40, dan como resultado una drástica regeneración de los axones del CST en la médula espinal distal, pero la germinación inducida por el primero muestra un patrón mucho más ramificado.

20 EJEMPLO 21

EL SNOGOR310-FC LOCAL INDUCE LA GERMINACIÓN DE LOS AXONES RUBROESPINALES Y SEROTONINÉRGICOS EN LA MÉDULA ESPINAL LESIONADA DE RATA

[0479] Catorce días después de la hemisección se perfora un orificio en cada lado del cráneo por encima de la corteza sensitivomotora de las extremidades inferiores para el seguimiento de las fibras del CST. El trazador neuronal anterógrado BDA (al 10 % en PBS, 3,5 μl por corteza) se aplicó en siete sitios de inyección a una profundidad de 1,5 mm a cada lado de la duramadre (Grandpre y col., Nature 417: 547 - 551 (2002)). Para el seguimiento del tracto rubroespinal en ratas, se inyectó el trazador BDA (1 μl ; PM de 10.000; al 10 % en PBS) en el núcleo rojo del lado izquierdo (5,8 mm posterior al bregma, 0,7 mm lateral, 7,0 mm ventral a la superficie del cráneo). Dos semanas después de la inyección del BDA, estos animales fueron perfundidos con PBS, seguido de paraformaldehído al 4 % y se recogió tejido para histología.

[0480] La reparación de las fibras lesionadas del tracto rubroespinal (RST) contribuye a mejoras funcionales tras la lesión de la médula espinal (Liu y col., J. Neurosci., 19: 4370 - 4387 (1999)). La amplia distribución del receptor Nogo-1 en las neuronas del CNS (Wang y col., J. Neurosci. 22: 5505 - 5515 (2002)) hace posible que la inhibición del receptor Nogo-1 por parte de su antagonista pueda dar como resultado el rebrote de los axones del RST después de la lesión. Para ensayar los efectos del sNogoR310-Fc en el RST lesionado, se realizó un seguimiento de la integridad de esta vía mediante la inyección de BDA en el núcleo rojo izquierdo. Al nivel de la médula espinal, las fibras del RST están ubicadas normalmente en el área de la sustancia blanca dorsolateral de la médula espinal, y son cortadas por las hemisecciones dorsales de este estudio. En las secciones transversales 11 - 15 mm rostrales a la lesión en las ratas de control se observa un pequeño número de fibras cortas marcadas con BDA entre el RST prominente y la sustancia gris del asta posterior. Las secciones al mismo nivel tratadas con sNogoR310-Fc muestra muchas fibras de conexión entre el RST principal y la sustancia gris del asta posterior. Las secciones transversales 11 - 15 mm distales a la SCI, no hay fibras del RST marcadas con BDA en las ratas tratadas con vehículo. Por el contrario, las secciones al mismo nivel que reciben el tratamiento con sNogoR310-Fc muestran muchas fibras de RST marcadas con BDA tanto en la sustancia gris como en la blanca contralaterales a la inyección del trazador. Se observan algunos brotes con un patrón ramificado en la sustancia gris ipsilateral a la inyección del BDA.

[0481] También se examinaron las fibras espinales rufespinales en las ratas con lesión espinal tratadas con sNogoR310-Fc. La inmunotinción muestra la densidad de las fibras serotoninérgicas 11 - 15 mm rostrales a la lesión, que es similar entre los grupos tratados con vehículo y con sNogoR310-Fc. En las secciones 11 - 15 mm por debajo de la lesión, las fibras de serotonina en las ratas tratadas con sNogoR310-Fc son dos veces más numerosas que en el grupo de control. Estos resultados demuestran que la sensibilidad a la inhibición del receptor Nogo-1 por parte de la proteína sNogoR310-Fc no está limitada a las fibras del CST, y los otros tractos descendentes, tales como los axones rubroespinales y serotoninérgicos, también son sensibles al antagonismo del receptor Nogo-1.

EJEMPLO 22

60

EL TRATAMIENTO LOCAL CON SNOGOR310-FC MEJORA LA RECUPERACIÓN FUNCIONAL EN RATAS

[0482] La administración intratecal de la proteína sNogoR310-Fc estimula la regeneración de los axones en numerosas vías descendentes después de una lesión traumática de la médula espinal. Ensayamos si la proteína también mejoró la recuperación funcional de la médula espinal lesionada.

[0483] A las 2 semanas después de la hemisección, la puntuación locomotora del BBB de las ratas tratadas con vehículo alcanza un nivel estable de 12 (Fig. 14A). A las 4 semanas después de la lesión, la mayoría de los controles (6 de los 7) tienen un apoyo plantar soportado por el peso frecuente-coherente y una coordinación anteroposterior frecuente-coherente, pero tienen una rotación de la posición de la extremidad predominante cuando realizan en contacto inicial con la superficie. Por el contrario, en las ratas que reciben el tratamiento con la proteína sNogoR310-Fc, la puntuación locomotora continúa mejorando entre las 2 - 4 semanas después del traumatismo. A las 4 semanas después de la lesión, los 9 animales tratados con la sNogoR310-Fc tenían una coordinación anteroposterior coherente y una posición paralela de las patas en el contacto inicial con la superficie de ensayo.

[0484] Se ha usado el caminar sobre rejilla para evaluar las deficiencias en el control motor fino descendente después de la lesión de la médula espinal (Metz y col., Brain Res. 883: 165 - 177 (2000)). Esta ejecución requiere una coordinación anteroposterior y el control del movimiento voluntario mediado por las fibras ventrolaterales, corticoespiniales y rubroespiniales. Durante el entrenamiento previo a la lesión todas las ratas colocaron de forma precisa sus extremidades posteriores en las barras de la rejilla. A las 2 - 4 semanas después de la lesión, las ratas de control cometían 8 - 9 errores por sesión con únicamente una mínima mejora con el tiempo. Por el contrario, las ratas tratadas con sNogoR310-Fc muestran una mejora progresiva en el caminar sobre la rejilla y cometen significativamente menos errores (4 - 7 / sesión de promedio). La mayor parte de las mejoras se producen a las 2 - 3 semanas después de la lesión. El análisis de las pisadas de las patas posteriores en el grupo de control muestra que la longitud de la zancada ha disminuido significativamente y el ancho de la postura está aumentado a las 4 semanas después de la hemisección, en comparación con las ratas no lesionadas o con los animales lesionados que recibieron el tratamiento con sNogoR310-Fc (Fig. 14C). Por lo tanto, estos múltiples ensayos de comportamiento demuestran que el bloqueo de la función del receptor Nogo-1 con la inyección local de una proteína antagonista mejora la recuperación locomotora después de la lesión.

EJEMPLO 23

UNIÓN DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-NGRI, EL ID9, AL RECEPTOR SOLUBLE DE RATA NOGO 310 (SNGR310)

[0485] Los análisis estructurales realizados sobre el complejo co-cristalino del Fab 1D9 y un fragmento soluble del NgR1 de rata (srNgR310) muestran que este anticuerpo se une cerca de la unión del extremo N-terminal y el dominio de repeticiones ricas en leucina del NgR1 de rata. Figura 15. El 1D9 se une únicamente al NgR1 de rata y no reconoce los NgR1, NgR2 ni NgR3 humanos ni de ratón. Para la cristalización del srNgR310-Fc de rata con el Fab 1D9, cada macromolécula se escindió con papaína y se purificó a partir de la porción de Fc y se almacenó en Hepes 10 mM a pH 7, NaCl 50 mM. El complejo se preparó a 80 μ M cada uno, y se mezcló en una proporción volumétrica de 2:1 con una solución de depósito que consiste en Peg 3350 al 14 %, acetato de cinc 0,4 M, cloruro de magnesio 0,1 M. La solución se incubó a 20 °C durante 1 h y se centrifugó a 12.000 x g durante 3 minutos para eliminar el precipitado. Los cristales se hicieron crecer colocando 3 - 5 μ l del sobrenadante sobre pocillos que contienen entre un 50 % y un 100 % de la solución de reserva a 20 °C. Crecieron finos cristales con forma de placa durante un periodo de 1 semana a 20 °C. Los cristales se crioprotegieron mediante una rápida transferencia a acetato de cinc 0,2 M, Peg 3350 al 8 %, etilenglicol al 25 % durante 2 min y después se congelaron mediante una rápida transferencia a nitrógeno líquido.

[0486] Los cristales con un espesor de aproximadamente 10 μ m difractaron a 3,2 Å a una línea de haz X25 del National Synchrotron Light Source (Upton, NY). El procesamiento de los datos con un conjunto de programas HKL v. 1.97 (Otwinowski, Z. y Minor, W., Methods Enzymol 276: 307 - 326 (1997)) reveló que los cristales pertenecían al grupo espacial P21212 y tenían un tamaño de celda aproximado de a = 90,6 Å, b = 188,6 Å, c = 125,5 Å y $\alpha = \beta = \gamma = 90$, coherente con 2 complejos de Fab-NgRI por unidad asimétrica.

[0487] La estructura cristalina se resolvió mediante la utilización de la información de múltiples experimentos de sustitución isomorfa en cristales mojados para identificar los sitios de mercurio habituales unidos al NgR junto con la sustitución molecular. El grupo espacial fue identificado mediante la inspección de la diferencia en los mapas de los patrones de mercurio y de oro isomorfos, en los que se identificó un coherente pico sigma 5 en la sección de harker w = 0. La sustitución molecular con MOLREP (Vagin, A. y Teplyakov, A., J. Appl. Cryst. 30: 1022 - 1025

(1997)) utilizando un modelo de homología del NgR de rata basado en la estructura del NgR1 humano (código pdb 1OZN) (He, X.L. y col., Neuron 38: 177 (2003)) y un modelo de homología para el Fab 1D9 dio lugar a la ubicación de una molécula de NgR1, una de Fab y una segunda de NgR1, con un factor R resultante del 48 % y una densidad clara para las regiones CDR del Fab. La ubicación del modelo se confirmó mediante el cartografiado de los sitios de mercurio identificados a partir de las diferencias en los mapas de patterson con respecto a posiciones equivalentes a las de ambas moléculas del NgR1 cerca de la Asp138 y de la His182. No se han identificado claramente fragmentos adicionales de Fab en la densidad. Se ha procedido al perfeccionamiento de los dos NgR1 y Fab 1 mediante el uso de CNX (Brunger, A. T. y col., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 54: 905 - 921 (1998)) a una resolución de 3,2 Å con un factor R actual del 42 % y R libre del 46 %.

[0488] La Tabla 8 muestra los contactos entre el Fab 1D9 y el NgR1 de rata. Se recogen los contactos en los que los átomos del Fab están a una distancia de 3,9 Å de los átomos del NgR1 de rata y aquellos contactos que podrían formar un puente de hidrógeno bien con la cadena principal o bien con la cadena lateral tienen un asterisco (*) asociado.

Tabla 8.

CDRL1	CDR L2	CDR L3
KSSQSLNSRNRKNYLA	WASTRES	MQSYNLFT
N31 - 1D9 Y71 - NgRI		
R33 - 1D9		
CDRL1	CDR L2	CDR L3
Y71, D97*, A94 - NgRI		
N34 - 1D9 S70*, Y71 -NgRI		
CDR H1	CDR H2	CDR H3
GFSLSYGVH	VIWSGGNTHYNSALMS	VGIYYEGAWFAY
F27 - 1D9 P26 - NgRI	S53 - 1D9 S79* - NgRI	
S28 - 1D9 P26 - NgRI	G54 - 1D9 R81 - NgRI	Y101 - 1D9 P73*, A74*, S76*, A50, V51* -NgRI
S30 - 1D9 A57* - NgRI	N56 - 1D9 Q78* - NgRI	Y102 - 1D9 Y71, P73, A50, V51*, L36* - NgRI
S31 - 1D9 G54 - NgRI		E103 - 1D9 Q49, A50, V51, P52, A53*-NgRI
Y32 - 1D9 P26, P28 - NgRI		G104-1D9 A53 - NgRI
* indica interacciones de puentes de H		

EJEMPLO 24

CRIBADO DEL ARNI DEL NGR MEDIANTE TRANSFECCIÓN TRANSITORIA

[0489] Se diseñaron tres constructos de ARNi contra el transcrito del NogoRI humano (Figura 16A). El ARNi-1 y el ARNi-3 se dirigen específicamente al gen del NgR humano. El ARNi-2 se diseñó para que se dirigiera los genes del NgR humano, de ratón y de rata. Se sintetizaron pares de oligonucleótidos de ADN y se construyeron en un vector de expresión del constructo de ARNi basado en un promotor PolIII, pU6, que contenía el promotor U6 humano, el gen de resistencia a kar y un sitio de clonación Pacl. El NogoR 2m se diseñó para transportar dos desapareamientos de la secuencia objetivo y servía como control negativo. Las secuencias de nucleótidos de estos

oligonucleótidos se muestran en la Figura 16B.

[0490] Los constructos de ARNi se cribaron inicialmente mediante una transfección conjunta del vector de expresión del NgR humano junto con los plásmidos de expresión del ARNi (phU6NgR-ARNi-1, 2 y 3) en células L de ratón. Las células L de ratón se colocaron en placas de cultivo de 6 pocillos y después se transfectaron con el plásmido indicador de la GFP de control solo o con el vector de ARNi contra la GFP, el pU6GFPARNi (carriles 2 y 3). Se monitorizó la expresión de la GFP como control del silenciamiento génico de la GFP. Las células L de ratón se transfectaron con 0,5, 1 o 2 µg del vector de expresión del hNgR (carriles 4 - 6). La cantidad de ADN en cada pocillo se ajustó hasta un total de 4 µg de ADN mediante la adición del plásmido pUC19. La proporción ARNi:objetivo era de 4:1. Se transfectaron conjuntamente cinco microgramos del vector hNgR con 2 µg de plásmido de ARNi-1, 2, 3 o 2m del NgR (carriles 7 - 10). Cuarenta y ocho horas después de la transfección las células se recogieron en tampón de carga de SDS y se sometieron a una SDS-PAGE. La expresión del hNgR se analizó mediante una inmunotransferencia western mediante el uso de suero de conejo contra el anticuerpo R150 policlonal del hNgR (panel A) o el anticuerpo monoclonal 7E11 (panel B).

[0491] Se observó un silenciamiento efectivo de la expresión del NgR en las células phU6NgR-ARNi-1 y -2 transfectadas en la inmunotransferencia Western mediante el uso de los anticuerpos del NgR 7E11 (monoclonal) y R150 (policlonal de conejo). Los resultados se muestran en la Figura 17. La expresión del NgR se redujo hasta los niveles basales en las células transfectadas con el ARNi -1 y -2 del NgR. Por el contrario, el ARNi-3 del NgR no mostró ninguna reducción significativa del NgR, lo que era similar al ARNi-2m de control mutante del NgR. Por lo tanto, los ARNi-1 y -2 del NgR son eficaces en el silenciamiento génico del hNgR. Los resultados de la transfección transitoria mostraron una inhibición > 90 % en la expresión del NgR.

EJEMPLO 25

CONFIRMACIÓN DEL SILENCIAMIENTO DEL NGR HUMANO

[0492] Aunque las señales detectadas son específicas del hNgR (únicamente en las células transfectadas con el ADNc del hNgR) con dos tipos de anticuerpos (Figura 17), el PM aparente de las bandas detectadas (~ 50 kD) era menor del esperado. Sin estar ceñidos a ninguna teoría, es probable que esto sea debido a una glucosilación alterada del NgR humano en las células L de ratón. Con objeto de confirmar la observación de la discrepancia en el PM del NgR, se realizó de nuevo una transfección del ADNc del hNgR en células SKN y en células 293 humanas mediante el uso de Lipofectina. Cuarenta y ocho horas después de la transfección las células se recogieron en tampón de carga de SDS y se sometieron a una SDS-PAGE. La expresión del NgR se detectó mediante una inmunotransferencia Western mediante el uso de ambos 7E11 y R150 como se ha descrito anteriormente. No se detectó ninguna señal específica del hNgR en las células parentales SKN ni en las 293 y el PM aparente del hNgR detectado con R150 es el esperado en ambas células SKN y 293, > 65 kD (Figura 18).

[0493] El silenciamiento del hNgR mediado por el ARNi fue confirmado en las células SKN. Las células SKN se colocaron en placas de cultivo de 6 pocillos y después se transfectaron con el plásmido indicador de la GFP de control solo o con el vector de ARNi contra la GFP, el pU6GFPARNi (carriles 2 y 3). Se monitorizó la expresión de la GFP como control del silenciamiento génico de la GFP. Las células SKN se transfectaron con 2 µg del vector de expresión del hNgR (carril 4). La cantidad de ADN en cada pocillo se ajustó hasta un total de 4 µg de ADN mediante la adición de ADN del plásmido pUC19. Se transfectaron conjuntamente 0,5 µg del vector del hNgR con 2 µg de plásmido de ARNi-1, 2, 3, o 2m del NgR (carriles 5 - 8). Cuarenta y ocho horas después de la transfección las células se recogieron en tampón de carga de SDS y se sometieron a una SDS-PAGE. La expresión del hNgR se analizó mediante una inmunotransferencia western mediante el uso de suero de conejo contra el R150 del hNgR. De nuevo, se demostró una inactivación del NgR mayor del 90 % en los ARNi-1 y -2 del NgR, pero menos eficaz en los ARNi-3 y - 2m del NgR (Figura 19).

EJEMPLO 26

INACTIVACIÓN DEL NGR EN CÉLULAS NEUROSCREEN

[0494] Se obtuvieron células NeuroScreen que expresan el NgR en Cellomics Inc. para un análisis de la función del NgR. Con objeto de conseguir una inactivación estable del NgR en las células NeuroScreen, todos los constructos de ARNi se convirtieron en vectores lentivíricos en esqueletos de beta-gal o de GFP. En la Figura 20A se muestra una representación esquemática del vector lentivírico. Los vectores lentivíricos fueron generados mediante la transfección de células 293 con plásmidos de empaquetamiento (Invitrogen). Para la construcción del vector lentivírico para la expresión estable del ARNi del NgR1, se extirparon los casetes de ARN que consisten en el

promotor hU6 que dirigen la expresión de los horquillas (es decir, Nogo-1, Nogo-2, Nogo-2m, y Nogo-3) del vector pHU6 (descrito en el Ejemplo 24) mediante una digestión con *PacI*, y se clonaron en el sitio único *PacI* de plásmidos SSM007. Véanse, por ejemplo, los métodos descritos en Robinson y col., *Nature Genetics* 33: 401 - 406 (2003). Para hacer un seguimiento de la transcripción del vector lentivírico se insertó un casete de expresión de CBA-GFP o CMV-LacZ en el plásmido SSM007 en el sitio *XbaI* y los constructos resultantes se denominaron SSM007-BFGW y SSM007-BFZW, respectivamente.

[0495] Después de la conversión de todos los constructos de ARNi del NgR1 en el esqueleto SSM007-BFGW y SSM007-BFZW, los vectores se transfectaron conjuntamente con los plásmidos de empaquetamiento pLP1, pLP2 y pLP/VSVG en células FT293 para la producción del vector lentivírico (Viropower kit, Invitrogen). El pLP1 es un constructo de 8.889 pb que contiene la secuencia gag/pol del VIH-1 y el elemento de respuesta rev (RRE) expresado partir de un promotor del CMV y con una poli A de la b-globina; el pLP2 es un constructo de 4.180 pb que expresa el Rev del promotor del RSV y con una poli A del VIH-1 para terminar el transcrito; el pLP/VSVG es un plásmido de 5.821 pb y expresa la glucoproteína G del virus de la estomatitis vesicular del promotor del CMV y una poli A de la beta-globina.

[0496] Debido al efecto autolimitante de la interferencia del ARNi en el título lentivírico, todos los títulos madre víricos aparecieron menores que los vectores lentivíricos regulares, en el intervalo de $4 - 5 \times 10^5$ unidades de transducción en el medio de cultivo. Se usaron lentivectores de ARNi del NgR (ARNi del LV-NgR) para transducir células NeuroScreen a una *moi* (multiplicidad de infección) de 1. La eficacia de transducción era de aproximadamente un 1 % según indicó la expresión de la GFP o la tinción con beta-galactosidasa.

[0497] Debido a que se demostró que el ARNi-2 del NgR era eficaz en el silenciamiento del NgR y que se dirige a todos los NgR humano, de ratón y de rata, se eligió el ARNi-2 del LV-NgR para transducir células NeuroScreen. Las células transducidas se clonaron mediante una dilución limitada en placas de 96 pocillos. Los clones positivos para beta-galactosidasa o positivos para GFP fueron identificados y expandidos para análisis adicionales de la expresión del NgR.

[0498] Se analizaron aproximadamente 20 líneas celulares clonadas para comprobar la expresión del NgR mediante una inmunotransferencia Western mediante el uso del anticuerpo monoclonal 7E11. En la Figura 21A se muestran los resultados de una inmunotransferencia western típica. Se usó GAPDH como control para la normalización de la carga. La expresión del NgR en todos los clones fue cuantificada mediante un barrido de densitometría de las bandas de NgR en la inmunotransferencia western y se normalizaron a los niveles de GAPDH. Se usó la proporción entre NgR y GAPDH para medir los niveles de expresión del NgR. De los 12 clones cribados, 11 de ellos disminuyeron la expresión del NgR (usando el clon con la menor expresión de NgR en células transducidas LV-GFP, el 1E9, como referencia). Por el contrario, los 4 clones transducidos LV-GFP tenían unos niveles comparables de NgR a los de las células NeuroScreen sin tratar. Figura 22. Estos resultados demuestran que se establecieron líneas celulares estables con una expresión reducida del NgR.

40 EJEMPLO 27

ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS CON EL ARNI DEL LV-NGR

[0499] Seleccionamos cuatro clones de las células transducidas con el ARNi del LV-NgR para análisis funcionales. Usando los niveles del NgR de las células NeuroScreen sin tratar como referencia, los niveles del NgR de estos cuatro clones son de aproximadamente el 10 % para 3c12b, del 20 % para 3c4b, del 30 % para 5d12 y del 60 % para 4a12 de las células sin tratar, respectivamente (Figura 23).

50 EJEMPLO 28

LAS MUTACIONES EN EL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-NGR1, 1D9 PERMITEN EL RECONOCIMIENTO DEL NGR1 HUMANO

[0500] Mediante un modelado por ordenador se demostró que las mutaciones en el anticuerpo 1D9 permiten el reconocimiento del NgR1 humano. El N56 de la cadena pesada de 1D9, a través de un modelado por ordenador, puede ser mutado por serina, ácido glutámico, ácido aspártico o glutamina para interactuar con el R78 del NgR1 humano. Además, el R33 de la cadena ligera puede ser mutado, mediante un modelado por ordenador, en alanina o en serina para evitar conflictos electrostáticos y estéricos con el R95 del NgR1 humano.

60 EJEMPLO 29

EL ECTO-DOMINIO DEL NGR1 DE RATA (27 - 310) FUSIONADO CON UNA IGG DE RATA, PERO NO LA METILPREDNISOLONA, REVERTIÓ EL EFECTO INHIBIDOR SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA NEURITA DE LA MIELINA EN LAS CÉLULAS DE LOS GANGLIOS DE LAS RAÍCES DORSALES

5

[0501] En la investigación del tratamiento combinado con metilprednisolona (MP) y NgR(310)ecto-Fc para la lesión de médula espinal (SCI), deseamos verificar que estos reactivos tienen unos mecanismos de acción independientes. En resumen, se secó mielina durante una noche en placas prerrecubiertas con poli-L-lisina (Becton Dickinson, Bedford, MA, EE.UU.) a 80 o a 400 ng/pocillo (2,5 y 12,7 ng/mm², respectivamente). Los pocillos se recubrieron después con 10 µg/ml de laminina (Calbiochem La Jolla, CA, EE.UU.) durante 1 hora a la temperatura ambiente (22 - 24 °C). Se disociaron las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales de embriones de pollo de 13 días y se colocaron en placas durante 6 - 8 horas según se ha descrito previamente (GrandPre y col., 2000; Fournier y col., 2001). Las neuronas se trataron con NgR(310)ecto-Fc 8 mM en presencia o en ausencia de 10 µg/ml de MP (Pharmacia, Kalamazoo, MI, EE.UU.) Durante la totalidad del periodo de crecimiento. Después las neuronas se fijaron y se tiñeron con anticuerpo tubulina βIII (Covance, Princeton, NJ, EE.UU.) y el crecimiento de la neurita se cuantificó mediante el uso de un sistema de imagen y análisis celular automatizado (Axon Instrument, Union City, CA, EE.UU.). El crecimiento de las neuritas por célula fue normalizando al promedio de los pocillos de control por duplicado para cada experimento (n = 3). La actividad del NgR(310)ecto-Fc se basa su capacidad para revertir la inhibición del crecimiento axonal por parte de la mielina. Figuras 24A - B. Por el contrario, la MP sola no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de la neurita de las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales en un sustrato de mielina y la presencia de MP no alteró la estimulación del crecimiento axonal por parte del NgR(310)ecto-Fc. Estos datos indican que la MP no afecta directamente a la inhibición de la crecimiento de la neurita inducida por mielina, y que la MP y el NgR(310)ecto-Fc tienen acciones independientes. Estos datos *in vitro* apoyan la hipótesis de que la MP y el NgR(310)ecto-Fc mejorarán la recuperación de la lesión de la médula espinal de una forma secuencialmente eficaz.

EJEMPLO 30

EL ECTO-DOMINIO DEL NGR DE RATA (27 - 310) FUSIONADO CON UNA IGG DE RATA Y EL TRATAMIENTO CON METILPREDNISOLONA TUVO UN EFECTO TEMPORALMENTE DISTINTO SOBRE LA RECUPERACIÓN FUNCIONAL DESPUÉS DE LA SECCIÓN TRANSVERSAL DE LA MÉDULA ESPINAL

[0502] Ambos tratamientos con MP y con NgR(310)ecto-Fc tuvieron un efecto temporalmente distinto sobre la recuperación funcional después de la sección transversal de la médula espinal. En resumen, se anestesiaron ratas Long Evans hembras (de 7 semanas de edad; Charles River, Wilmington, MA, EE.UU.) mediante el uso de 25 mg/kg de midazolam i.p. (Abott Laboratories, Chicago, IL, EE.UU.) y un 2 - 3 % de fluotano (Baxter, Deerfield, IL, EE.UU.) en O₂ y se llevó a cabo una laminectomía dorsal al nivel espinal T6 y T7. La anestesia general se mantuvo al 1,5 - 2 % de fluotano en O₂. Se realizó una hemisección dorsal que interrumpía completamente los componentes del tracto corticoespinal principal dorsomedial y del dorsolateral menor (CST). Se usó un microescalpelo para cortar transversalmente estereotáxicamente la médula a una profundidad de 1,8 mm de la superficie de la médula. Inmediatamente después de la sección transversal del CST, se insertó un catéter intratecal en el espacio subaracnoideo en la T7 y se conectó con una minibomba osmótica cebada insertada en el espacio subcutáneo. Las minibombas osmóticas suministraron la proteína de control del isotipo IgG de rata o solución salina tamponada con fosfato (PBS) (5 mg/ml, n = 8) o NgR(310)ecto-Fc (50 µM, n = 19) a un caudal de 0,25 µl/h. Un grupo de ratas tratadas con NgR(310)ecto-Fc (n = 8) se trataron también con MP (Pharmacia; 30 mg/kg iv) y un grupo por separado se trató sólo con MP (30 mg/kg iv) inmediatamente después de la lesión, y de nuevo 4 y 8 horas después. La recuperación funcional fue evaluada mediante el uso del método de puntuación de campo abierto BBB (Basso y col., J. Neurotrauma 12: 1 - 21 (1995)) al día siguiente, y semanalmente a continuación. Los animales de control recuperaron la función de las extremidades posteriores en el transcurso del estudio, alcanzando una puntuación media de BBB de 12 ± 0,87 después de 4 semanas. Las puntuaciones medias de BBB para los grupos tratados en el mismo punto temporal fueron: MP, 14,9 ± 0,23; NgR(310)ecto-Fc, 14,8 ± 0,24 y NgR(310)ecto-Fc más MP, 15,63 ± 0,18. Todos los grupos de tratamiento mostraron una mejora en las puntuaciones de BBB en comparación con los controles durante el transcurso del estudio. P < 0/05 frente a control, medición repetida de la ANOVA bifactorial con la prueba posthoc de Tukey. (Figura 25A). Se observó un aumento estadísticamente significativo en la puntuación de BBB en las ratas tratadas con MP y con MP más NgR(310)ecto-Fc el día después de la cirugía en comparación con los animales de control o con los animales tratados sólo con NgR(310)ecto-Fc. La puntuación de BBB había mejorado significativamente en las ratas tratadas con MP 2 días después de la lesión de la médula espinal. P < 0/05 frente a control, medición repetida de la ANOVA bifactorial con la prueba posthoc de Tukey. (Figura 25B). Esta observación indicaba un efecto temprano del tratamiento con MP sobre la recuperación. Dado este efecto muy temprano de la MP, las puntuaciones de BBB se normalizaron al día 2 para restar este efecto temprano de la MP

(Figura 25C), ilustrando así la aparición mucho más tardía del efecto del NgR(310)ecto-Fc. Las puntuaciones de BBB normalizadas al día 2 para los animales individuales ilustran una mejora significativa en la recuperación funcional las ratas tratadas con NgR(310)ecto-Fc $\pm$ MP en las 2, 3 y 4 semanas después de la lesión de la médula espinal. $P < 0/05$ frente a control, medición repetida de la ANOVA bifactorial con la prueba posthoc de Tukey. (Figura 25C). En el grupo del tratamiento de combinación, las puntuaciones normalizadas de BBB anulaban el efecto potenciador de la MP sobre el tratamiento con NgR(310)(ecto)-Fc, lo que ilustra que (i) en el grupo de tratamiento combinado, el efecto de la MP se produjo tempranamente después de la lesión de la médula espinal, y (ii) al restar este efecto, el grado y la magnitud de la recuperación funcional en el grupo con el tratamiento combinado y en el grupo con NgR(310)ecto-Fc eran idénticos y más pronunciados que en el tratamiento sólo con MP.

[0503] Un punto de discriminación de la puntuación de BBB es una puntuación de 14, que se corresponde con unos apoyos plantares coherentes que soportan el peso correspondiente y una coherente coordinación anteroposterior. La frecuencia de los apoyos plantares y la coordinación anteroposterior coherentes, que ilustra la proporción de ratas de cada grupo que alcanzaban una puntuación de 14 o mayor 3 y 4 semanas después de la lesión de la médula espinal. Consecuentemente, los resultados se expresaron como la frecuencia con la que las ratas alcanzaban una puntuación de 14 o mayor; el 50 % de las ratas de control alcanzaban una puntuación de 14 o mayor en las 4 semanas después de la lesión (Figura 25D). El tratamiento combinado con NgR(310)ecto-Fc y MP mejoró significativamente la tasa de recuperación funcional. $P < 0/05$ frente a control prueba exacta de Fischer. Todas las ratas (100 %) tratadas con NgR(310)ecto-Fc o con MP o con la terapia combinada mostraron un apoyo plantar coherente y un movimiento coordinado a las 4 semanas. La terapia de combinación aumentó la tasa de recuperación de la función coordinada, ya que una proporción significativamente mayor de este grupo de tratamiento alcanzó una puntuación de 14 o más a las 3 semanas en comparación con los controles o con cualquiera de los tratamientos sólo con NgR(310)ecto-Fc o con MP (Figura 25D). La mejora en la recuperación funcional también fue demostrada por una mejora significativa en la longitud media de la zancada en los grupos tratados con NgR(310)ecto-Fc y con NgR(310)ecto-Fc más MP en comparación con los controles (Figura 25E). El tratamiento sólo con MP no mejoró significativamente la longitud de la zancada medida 4 semanas después de la lesión de la médula espinal. $P < 0/05$, ANOVA monofactorial con la prueba posthoc de Dunnett.

EJEMPLO 31

EL ECTO-DOMINIO DEL NGR1 DE RATA (27 - 310) FUSIONADO CON UNA IGG DE RATA Y EL TRATAMIENTO CON METILPREDNISOLONA MEJORÓ LA PLASTICIDAD / REGENERACIÓN AXONAL DESPUÉS DE LA SECCIÓN TRANSVERSAL DE LA MÉDULA ESPINAL

[0504] El tratamiento con NgR(310)ecto-Fc o el tratamiento combinado con MP y NgR(310)ecto Fc mejoró la plasticidad / regeneración axonal después de la sección transversal de la médula espinal. En resumen, para el seguimiento histológico de los CST, 2 semanas después de la sección transversal del CST los animales fueron anestesiados de nuevo y se realizó una incisión en el cuero cabelludo. En el área alrededor de la incisión cutánea se inyectó un anestésico local, la corteza sensitivomotora izquierda se expuso mediante una craneotomía y se inyectaron 7 μ l de biotina dextrano amina al 10 % (BDA; PM de 10.000; Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.) en PBS mediante el uso de un inyector de nanolitros y un controlador micro4 en 12 puntos a 0 - 3,5 mm posterior al Bregma y a 0 - 2,5 mm lateral a la línea media, a una profundidad de 1 mm por debajo de la superficie de la corteza. En algunos casos, el CST se marcó bilateralmente mediante el uso del mismo procedimiento.

[0505] A los 28 días después de la sección transversal del CST, las ratas se anestesiaron con inactina (100 - 110 mg/kg i.p.) y se perfundieron transcardiacamente con solución salina heparinizada (100 ml, 10 UI de heparina) seguido de paraformaldehído al 4 % (150 ml). Se extrajeron las médulas espinales, se postfijaron en paraformaldehído al 4 % y después se impregnaron con sacarosa al 30 % durante 48 horas; unos cortes de 25 mm de la médula espinal, 10 mm rostral y 15 mm caudal al sitio de la sección transversal, fueron incrustados en compuesto para temperatura de corte óptima (OCT) con los segmentos transversales de la médula tomados 10 - 15 mm rostral y 15 - 20 mm caudal a la lesión.

[0506] Las secciones congeladas (50 μ m) se cortaron sucesivamente y se tiñeron con AlexaFluor-594 conjugado con estreptavidina (a 1:200; Molecular Probes) para visualizar los axones marcados del CST. Se realizó un recuento de los axones sobre las secciones transversales tomadas a 10 y 15 mm caudal al sitio de la sección transversal. Todas las mediciones se realizaron con enmascaramiento. Se contó cada ocho secciones, es decir, secciones separadas 400 mm, para cada animal en cada nivel de la médula, y los valores se expresaron como el número medio de axones por sección.

[0507] El tratamiento con NgR(310)ecto-Fc o el tratamiento combinado con MP y NgR(310)ecto-Fc dieron

como resultado unas cifras significativamente mayores de axones marcados con biotina dextrano amina (BDA) contados 15 mm caudal al sitio de la lesión (Figura 26A). Los axones marcados con BDA parecían brotar tanto de las columnas dorsales de la sustancia gris del asta posterior como en el CST ventral preservado, proyectándose hacia la sustancia gris ventral. Los recuentos de axones en regiones individuales de la médula revelaron el mayor aumento en el número de axones en la sustancia gris. El mayor aumento en el número de axones se observó en la sustancia gris (GM) en comparación con la sustancia blanca ventral (vWM) y la sustancia blanca dorsal (dWM) (Figura 26B). $P \leq 0/05$, ANOVA monofactorial con la prueba posthoc de Dunnett. Estos datos sugieren que el tratamiento con NgR(310)ecto-Fc con o sin MP promueve la plasticidad en la médula espinal después de una lesión.

10 EJEMPLO 32

EL TRATAMIENTO COMBINADO CON EL ECTO-DOMINIO DEL NGR1 DE RATA (27 - 310) FUSIONADO CON UNA IGG DE RATA Y METILPREDNISOLONA AUMENTÓ EL NÚMERO DE CONEXIONES AXONALES ENTRE LAS FIBRAS DEL TRACTO CORTICOESPINAL MARCADAS CON BIOTINA DEXTRANO AMINA Y LAS NEURONAS MOTORAS LUMBARES

[0508] Se usó el anticuerpo anti-transportador de glutamato vesicular 1 (vGLUT1) (a una dilución de 1:2.500) para teñir los cuerpos de las células neuronales, y las neuronas motoras α y γ de la lámina 9 fueron identificadas por su tamaño y morfología. El número de axones en contacto con las neuronas motoras α y γ aumentó significativamente en el grupo tratado con MP + NgR(310)ecto-Fc en comparación con los animales de control, observándose el efecto más notable y significativo en los animales que recibieron el tratamiento combinado con NgR(310)ecto-Fc y MP (Figura 27). $P < 0/05$, ANOVA monofactorial con la prueba posthoc de Dunnett.

Depósitos biológicos

[0509] Los hibridomas HB 7E11 (ATCC® nº de acceso PTA-4587), HB 1H2 (nº de acceso de la ATCC® PTA-4584), HB 3G5 (nº de acceso de la ATCC® PTA-4586), HB 5B10 (nº de acceso de la ATCC® PTA-4588) y HB 2F7 (nº de acceso de la ATCC® PTA-4585) fueron depositados en la American Type Culture Collection ("ATCC®"), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EE.UU., el 9 de agosto de 2002.

LISTA DE SECUENCIAS

[0510] <110> Biogen Idec MA Inc. Lee, Daniel H. S. Wen, Dingyi Pepinsky, R. Blake Relton, Jane K. Wang, Xinzhong Lugovskoy, Alexey Meier, Werner Garber, Ellen A. Silvian, Laura Weinreb, Paul H.

<120> Antagonistas del Receptor Nogo

<130> 2159.097PCO2/EJH/SAC

<150> US 60/762.487
<151> 2006-01-27

<150> US 60/831.659
<151> 2006-07-19

<160> 89

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 16
<212> PRT
<213> Rattus

<400> 1

Leu Asp Leu Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg Val Val Asp Pro Thr Thr
1 5 10 15

<210> 2

<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 2

Leu Asp Leu Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg Ser Val Asp Pro Ala Thr
1 5 10 15

<210> 3

10 <211> 35
<212> PRT
<213> Rattus

<400>3

15

Ala Val Ala Ser Gly Pro Phe Arg Pro Phe Gln Thr Asn Gln Leu Thr
1 5 10 15

Asp Glu Glu Leu Leu Gly Leu Pro Lys Cys Cys Gln Pro Asp Ala Ala
20 25 30

Asp Lys Ala
35

<210> 4
<211> 35

20 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Val Ala Thr Gly Pro Tyr His Pro Ile Trp Thr Gly Arg Ala Thr
1 5 10 15

Asp Glu Glu Pro Leu Gly Leu Pro Lys Cys Cys Gln Pro Asp Ala Ala
20 25 30

Asp Lys Ala
35

25

<210> 5
<211> 10
<212> PRT

30 <213> Mus musculus

<400> 5

Cys Arg Leu Gly Gln Ala Gly Ser Gly Ala
1 5 10

35

<210> 6
<211> 344
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

Met Lys Arg Ala Ser Ala Gly Gly Ser Arg Leu Leu Ala Trp Val Leu
 1          5          10          15

Trp Leu Gln Ala Trp Gln Val Ala Ala Pro Cys Pro Gly Ala Cys Val
          20          25          30

Cys Tyr Asn Glu Pro Lys Val Thr Thr Ser Cys Pro Gln Gln Gly Leu
          35          40          45

Gln Ala Val Pro Val Gly Ile Pro Ala Ala Ser Gln Arg Ile Phe Leu
50          55          60

```

5

His Gly Asn Arg Ile Ser His Val Pro Ala Ala Ser Phe Arg Ala Cys
 65 70 75 80
 Arg Asn Leu Thr Ile Leu Trp Leu His Ser Asn Val Leu Ala Arg Ile
 85 90 95
 Asp Ala Ala Ala Phe Thr Gly Leu Ala Leu Leu Glu Gln Leu Asp Leu
 100 105 110
 Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg Ser Val Asp Pro Ala Thr Phe His Gly
 115 120 125
 Leu Gly Arg Leu His Thr Leu His Leu Asp Arg Cys Gly Leu Gln Glu
 130 135 140
 Leu Gly Pro Gly Leu Phe Arg Gly Leu Ala Ala Leu Gln Tyr Leu Tyr
 145 150 155 160
 Leu Gln Asp Asn Ala Leu Gln Ala Leu Pro Asp Asp Thr Phe Arg Asp
 165 170 175
 Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Phe Leu His Gly Asn Arg Ile Ser Ser
 180 185 190
 Val Pro Glu Arg Ala Phe Arg Gly Leu His Ser Leu Asp Arg Leu Leu
 195 200 205
 Leu His Gln Asn Arg Val Ala His Val His Pro His Ala Phe Arg Asp
 210 215 220
 Leu Gly Arg Leu Met Thr Leu Tyr Leu Phe Ala Asn Asn Leu Ser Ala
 225 230 235 240
 Leu Pro Thr Glu Ala Leu Ala Pro Leu Arg Ala Leu Gln Tyr Leu Arg
 245 250 255
 Leu Asn Asp Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys Arg Ala Arg Pro Leu Trp
 260 265 270
 Ala Trp Leu Gln Lys Phe Arg Gly Ser Ser Ser Glu Val Pro Cys Ser
 275 280 285
 Leu Pro Gln Arg Leu Ala Gly Arg Asp Leu Lys Arg Leu Ala Ala Asn
 290 295 300
 Asp Leu Gln Gly Cys Ala Val Ala Thr Gly Pro Tyr His Pro Ile Trp

[illegible]

<210> 7
<211> 310
<212> PRT
<213> Homo sapiens

$\langle 400 \rangle$ 7

Met	Lys	Arg	Ala	Ser	Ala	Gly	Gly	Ser	Arg	Leu	Leu	Ala	Trp	Val	Leu
1				5				10						15	
Trp	Leu	Gln	Ala	Trp	Gln	Val	Ala	Ala	Pro	Cys	Pro	Gly	Ala	Cys	Val
			20					25					30		
Cys	Tyr	Asn	Glu	Pro	Lys	Val	Thr	Thr	Ser	Cys	Pro	Gln	Gln	Gly	Leu
		35					40					45			
Gln	Ala	Val	Pro	Val	Gly	Ile	Pro	Ala	Ala	Ser	Gln	Arg	Ile	Phe	Leu
	50					55					60				
His	Gly	Asn	Arg	Ile	Ser	His	Val	Pro	Ala	Ala	Ser	Phe	Arg	Ala	Cys
65					70					75					80
Arg	Asn	Leu	Thr	Ile	Leu	Trp	Leu	His	Ser	Asn	Val	Leu	Ala	Arg	Ile
				85					90					95	
Asp	Ala	Ala	Ala	Phe	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Glu	Gln	Leu	Asp	Leu
			100					105					110		
Ser	Asp	Asn	Ala	Gln	Leu	Arg	Ser	Val	Asp	Pro	Ala	Thr	Phe	His	Gly
		115					120					125			
Leu	Gly	Arg	Leu	His	Thr	Leu	His	Leu	Asp	Arg	Cys	Gly	Leu	Gln	Glu
	130					135					140				
Leu	Gly	Pro	Gly	Leu	Phe	Arg	Gly	Leu	Ala	Ala	Leu	Gln	Tyr	Leu	Tyr
145					150					155					160
Leu	Gln	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ala	Leu	Pro	Asp	Asp	Thr	Phe	Arg	Asp
				165					170					175	

Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Phe Leu His Gly Asn Arg Ile Ser Ser
 180 185 190
 Val Pro Glu Arg Ala Phe Arg Gly Leu His Ser Leu Asp Arg Leu Leu
 195 200 205
 Leu His Gln Asn Arg Val Ala His Val His Pro His Ala Phe Arg Asp
 210 215 220
 Leu Gly Arg Leu Met Thr Leu Tyr Leu Phe Ala Asn Asn Leu Ser Ala
 225 230 235 240
 Leu Pro Thr Glu Ala Leu Ala Pro Leu Arg Ala Leu Gln Tyr Leu Arg
 245 250 255
 Leu Asn Asp Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys Arg Ala Arg Pro Leu Trp
 260 265 270
 Ala Trp Leu Gln Lys Phe Arg Gly Ser Ser Ser Glu Val Pro Cys Ser
 275 280 285
 Leu Pro Gln Arg Leu Ala Gly Arg Asp Leu Lys Arg Leu Ala Ala Asn
 290 295 300
 Asp Leu Gln Gly Cys Ala
 305 310

<210>8

<211> 344

5 <212> PRT

<213> Rattus

<400> 8

Met Lys Arg Ala Ser Ser Gly Gly Ser Arg Leu Pro Thr Trp Val Leu
 1 5 10 15
 Trp Leu Gln Ala Trp Arg Val Ala Thr Pro Cys Pro Gly Ala Cys Val
 20 25 30
 Cys Tyr Asn Glu Pro Lys Val Thr Thr Ser Arg Pro Gln Gln Gly Leu
 35 40 45
 Gln Ala Val Pro Ala Gly Ile Pro Ala Ser Ser Gln Arg Ile Phe Leu
 50 55 60
 His Gly Asn Arg Ile Ser Tyr Val Pro Ala Ala Ser Phe Gln Ser Cys

10

65.		70		75		80									
Arg	Asn	Leu	Thr	Ile	Leu	Trp	Leu	His	Ser	Asn	Ala	Leu	Ala	Gly	Ile
				85					90					95	
Asp	Ala	Ala	Ala	Phe	Thr	Gly	Leu	Thr	Leu	Leu	Glu	Gln	Leu	Asp	Leu
			100					105					110		
Ser	Asp	Asn	Ala	Gln	Leu	Arg	Val	Val	Asp	Pro	Thr	Thr	Phe	Arg	Gly
		115					120					125			
Leu	Gly	His	Leu	His	Thr	Leu	His	Leu	Asp	Arg	Cys	Gly	Leu	Gln	Glu
	130					135					140				
Leu	Gly	Pro	Gly	Leu	Phe	Arg	Gly	Leu	Ala	Ala	Leu	Gln	Tyr	Leu	Tyr
145					150				155						160
Leu	Gln	Asp	Asn	Asn	Leu	Gln	Ala	Leu	Pro	Asp	Asn	Thr	Phe	Arg	Asp
				165					170					175	
Leu	Gly	Asn	Leu	Thr	His	Leu	Phe	Leu	His	Gly	Asn	Arg	Ile	Pro	Ser
			180					185					190		
Val	Pro	Glu	His	Ala	Phe	Arg	Gly	Leu	His	Ser	Leu	Asp	Arg	Leu	Leu
		195					200					205			
Leu	His	Gln	Asn	His	Val	Ala	Arg	Val	His	Pro	His	Ala	Phe	Arg	Asp
	210					215					220				
Leu	Gly	Arg	Leu	Met	Thr	Leu	Tyr	Leu	Phe	Ala	Asn	Asn	Leu	Ser	Met
225					230					235					240
Leu	Pro	Ala	Glu	Val	Leu	Val	Pro	Leu	Arg	Ser	Leu	Gln	Tyr	Leu	Arg
				245					250					255	
Leu	Asn	Asp	Asn	Pro	Trp	Val	Cys	Asp	Cys	Arg	Ala	Arg	Pro	Leu	Trp
			260					265					270		
Ala	Trp	Leu	Gln	Lys	Phe	Arg	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Asn
		275					280					285			
Leu	Pro	Gln	Arg	Leu	Ala	Gly	Arg	Asp	Leu	Lys	Arg	Leu	Ala	Thr	Ser
	290					295					300				
Asp	Leu	Glu	Gly	Cys	Ala	Val	Ala	Ser	Gly	Pro	Phe	Arg	Pro	Phe	Gln
305					310					315					320

Thr Asn Gln Leu Thr Asp Glu Glu Leu Leu Gly Leu Pro Lys Cys Cys
 325 330 335

Gln Pro Asp Ala Ala Asp Lys Ala
 340

<210>9

<211> 310

5 <212> PRT

<213> Rattus

<400>9

Met Lys Arg Ala Ser Ser Gly Gly Ser Arg Leu Pro Thr Trp Val Leu
 1 5 10 15

Trp Leu Gln Ala Trp Arg Val Ala Thr Pro Cys Pro Gly Ala Cys Val
 20 25 30

Cys Tyr Asn Glu Pro Lys Val Thr Thr Ser Arg Pro Gln Gln Gly Leu
 35 40 45

Gln Ala Val Pro Ala Gly Ile Pro Ala Ser Ser Gln Arg Ile Phe Leu
 50 55 60

His Gly Asn Arg Ile Ser Tyr Val Pro Ala Ala Ser Phe Gln Ser Cys
 65 70 75 80

Arg Asn Leu Thr Ile Leu Trp Leu His Ser Asn Ala Leu Ala Gly Ile
 85 90 95

Asp Ala Ala Ala Phe Thr Gly Leu Thr Leu Leu Glu Gln Leu Asp Leu
 100 105 110

Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg Val Val Asp Pro Thr Thr Phe Arg Gly
 115 120 125

Leu Gly His Leu His Thr Leu His Leu Asp Arg Cys Gly Leu Gln Glu
 130 135 140

Leu Gly Pro Gly Leu Phe Arg Gly Leu Ala Ala Leu Gln Tyr Leu Tyr
 145 150 155 160

Leu Gln Asp Asn Asn Leu Gln Ala Leu Pro Asp Asn Thr Phe Arg Asp
 165 170 175

Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Phe Leu His Gly Asn Arg Ile Pro Ser
 180 185 190
 Val Pro Glu His Ala Phe Arg Gly Leu His Ser Leu Asp Arg Leu Leu
 195 200 205
 Leu His Gln Asn His Val Ala Arg Val His Pro His Ala Phe Arg Asp
 210 215 220
 Leu Gly Arg Leu Met Thr Leu Tyr Leu Phe Ala Asn Asn Leu Ser Met
 225 230 235 240
 Leu Pro Ala Glu Val Leu Val Pro Leu Arg Ser Leu Gln Tyr Leu Arg
 245 250 255
 Leu Asn Asp Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys Arg Ala Arg Pro Leu Trp
 260 265 270
 Ala Trp Leu Gln Lys Phe Arg Gly Ser Ser Ser Gly Val Pro Ser Asn
 275 280 285
 Leu Pro Gln Arg Leu Ala Gly Arg Asp Leu Lys Arg Leu Ala Thr Ser
 290 295 300
 Asp Leu Glu Gly Cys Ala
 305 310

<210> 10

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Rattus

<400> 10

10 Leu Asp Leu Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg Val Val Asp Pro Thr Thr
 1 5 10 15

<210> 11

<211> 19

<212> PRT

15 <213> Rattus

<400> 11

Arg Val His Pro His Ala Phe Arg Asp Leu Gly Arg Leu Met Thr Leu
 1 5 10 15

Tyr Leu Phe

20

<210> 12

<211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> Cebador sintético para la secuencia de la cadena ligera
 <400> 12
 tgaggagacg gtagcctgg tccctggcc ccag 34
 10
 <210> 13
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador sintético para la secuencia de la cadena pesada
 <400> 13
 ggggatatcc accatgaagt tgctgttag gctgtg 37
 20
 <210> 14
 <211> 40
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético para la secuencia de la cadena pesada
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> K es G o T
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> W es A o T
 40 <220>
 <221> misc_feature <222> (32)..(32)
 <223> Y es T o C
 <220>
 <221> misc_feature <222> (34)..(34)
 45 <223> Y es T o C
 <220>
 <221> misc_feature <222> (37)..(37)
 <223> K es G o T
 50
 <400> 14
 ggggatatcc accatgaggk ccccwgtca gtyctkgga 40
 55 <210> 15
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena ligera de 7E11

<400> 15

5

```

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1          5          10          15

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
          20          25          30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
          35          40          45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50          55          60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65          70          75          80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
          85          90          95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Asp Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
          100          105          110

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
          115          120          125

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Ser His His
130          135          140

```

<210> 16

<211> 144

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena ligera de 5B10

15

<400> 16

```

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1          5          10          15

```

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Val His Ser Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Arg Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Asp Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
100 105 110

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Ser His His
130 135 140

<210> 17

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena pesada de 7E11

10

<400> 17

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

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

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

Ala Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Ser Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
50 55 60

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

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

Arg Arg Ile Thr Glu Ala Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr
115

<210> 18

<211> 114

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena pesada de 5B10

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

15

<400> 18

Leu Gln Xaa Ser Gly Ala Glu Ile Val Met Pro Gly Thr Ala Val Thr
1 5 10 15

Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe Trp Met His
20 25 30

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

Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Ser Arg Ile Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys
50 55 60

Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu
65 70 75 80

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

Ile Thr Glu Ala Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr

20 <210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena pesada de 14D5

5

<400> 19

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Gly Ser Val Gly
1 5 10

10 <210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> CDR2 de la cadena pesada de 14D5

<400> 20

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

20

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena pesada de 14D5

30 <400> 21

Ser Arg Phe Trp Thr Gly Glu Tyr Asp Val
1 5 10

<210> 22

35 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> CDR1 de la cadena ligera de 14D5

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Ala Ile Thr Leu Asn
1 5 10

45

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> CDR2 de la cadena ligera de 14D5

<400> 23

Leu Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 24
<211> 8
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR3 de la cadena ligera de 14D5
10
<400> 24

Gln Gln Tyr Asp Asn Tyr Pro Leu
1 5

15 <210> 25
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Cebador sintético para la secuencia de la cadena ligera

<220>
<221> misc_feature
25 <222> (5)..(5)
<223> S es G o C

<220>
<221> misc_feature
30 <222> (6)..(6)
<223> M es A o C

<220>
<221> misc_feature
35 <222> (8)..(8)
<223> R es G o A

<220>
<221> misc_feature
40 <222> (15)..(15)
<223> S es G o C

<220>
<221> misc_feature
45 <222> (20)..(20)
<223> W es A o T

<400> 25

50 aggtsmarct gcagsagtcw gg

<210> 26
<211> 22
<212> PRT
55 <213> Rattus

<400> 26

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

Asp Asn Ala Gln Leu Arg
20

<210> 27

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Rattus/Homo Sapiens

<400> 27

10

Leu Asp Leu Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg
1 5 10

<210> 28

<211> 6

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> aa 120 - 125 del NgR1 mutante

20

<400> 28

Val Val Asp Pro Thr Thr
1 5

25 <210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> NgR1 mutante

<400> 29

Leu Asp Leu Ser Asp Asp Ala Glu Leu Arg
1 5 10

35

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> NgR1 mutante

45 <400> 30

Leu Asp Leu Ala Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg
1 5 10

<210> 31

50 <211> 11

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> NgR1 mutante

<400>31

Leu Asp Leu Ala Ser Asp Asp Ala Glu Leu Arg
1 5 10

10

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> NgR1 mutante

<400> 32

20

Leu Asp Ala Leu Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg
1 5 10

<210> 33

<211> 11

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> NgR1 mutante

30

<400> 33

Leu Asp Ala Leu Ser Asp Asp Ala Glu Leu Arg
1 5 10

35 <210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> NgR1 mutante

<400> 34

Leu Asp Leu Ser Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg

45

1

5

10

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> NgR1 mutante

<400> 35

Leu Asp Leu Ser Ser Asp Glu Ala Glu Leu Arg
1 5 10

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Rattus / Homo Sapiens

<400> 36

Asp Asn Ala Gln Leu Arg Val Val Asp Pro Thr Thr
1 5 10

15

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> Rattus / Homo Sapiens

20

<400> 37

Asp Asn Ala Gln Leu Arg
1 5

25 <210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

30 <400> 38

Leu Asp Leu Ser Asp Asn Ala Gln Leu His
1 5 10

<210> 39

35 $\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

<213> Rattus / Homo sapiens

<400> 39

40

Leu Asp Leu Gly Asp Asn Arg His Leu Arg
1 5 10

<210> 40

$\langle 211 \rangle$ 10

45 <212> PRT

<213> Rattus / Homo sapiens / Mus musculus

<400> 40

Leu Asp Leu Gly Asp Asn Arg Gln Leu Arg
1 5 10

<210> 41

<211> 16

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Péptido L110A sintético mutante

<400> 41

Ala Asp Leu Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg Val Val Asp Pro Thr Thr
1 5 10 15

10

<210> 42
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<223> Péptido D111A sintético mutante
<400> 42

Leu Ala Leu Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg Val Val Asp Pro Thr Thr
1 5 10 15

20

<210> 43
<211> 16
<212> PRT
25 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido Q117A sintético mutante

30 <400> 43

Leu Asp Leu Ser Asp Asn Ala Ala Leu Arg Val Val Asp Pro Thr Thr
1 5 10 15

<210> 44

35 <211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Péptido R119H sintético mutante

<400> 44

Leu Asp Leu Ser Asp Asn Ala Gln Leu His Val Val Asp Pro Thr Thr
1 5 10 15

45

<210> 45
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50

<220>
<223> Péptido R119A sintético mutante

<400> 45

55

Leu Asp Leu Ser Asp Asn Ala Gln Leu Ala Val Val Asp Pro Thr Thr
1 5 10 15

<210> 46

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido R119A sintético mutante

10

<400> 46

Leu Asp Leu Ser Asp Asn Ala Gln Leu Ala Val Val Asp Pro Thr Thr
1 5 10 15

15 <210> 47

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 47

Leu Asp Leu Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg Ser Val Asp Pro Thr Thr
1 5 10 15

<210> 48

25 <211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48 i

30

His Val His Pro His Ala Phe Arg Asp Leu Gly Arg Leu Met Thr Leu
1 5 10 15

Tyr Leu Phe

<210> 49

<211> 473

35 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

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

Leu Gly Arg Leu Met Thr Leu Tyr Leu Phe Ala Asn Asn Leu Ser Ala
 225 230 235 240
 Leu Pro Thr Glu Ala Leu Ala Pro Leu Arg Ala Leu Gln Tyr Leu Arg
 245 250 255
 Leu Asn Asp Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys Arg Ala Arg Pro Leu Trp
 260 265 270
 Ala Trp Leu Gln Lys Phe Arg Gly Ser Ser Ser Glu Val Pro Cys Ser
 275 280 285
 Leu Pro Gln Arg Leu Ala Gly Arg Asp Leu Lys Arg Leu Ala Ala Asn
 290 295 300
 Asp Leu Gln Gly Cys Ala Val Ala Thr Gly Pro Tyr His Pro Ile Trp
 305 310 315 320
 Thr Gly Arg Ala Thr Asp Glu Glu Pro Leu Gly Leu Pro Lys Cys Cys
 325 330 335
 Gln Pro Asp Ala Ala Asp Lys Ala Ser Val Leu Glu Pro Gly Arg Pro
 340 345 350
 Ala Ser Ala Gly Asn Ala Leu Lys Gly Arg Val Pro Pro Gly Asp Ser
 355 360 365
 Pro Pro Gly Asn Gly Ser Gly Pro Arg His Ile Asn Asp Ser Pro Phe
 370 375 380
 Gly Thr Leu Pro Gly Ser Ala Glu Pro Pro Leu Thr Ala Val Arg Pro
 385 390 395 400
 Glu Gly Ser Glu Pro Pro Gly Phe Pro Thr Ser Gly Pro Arg Arg Arg
 405 410 415
 Pro Gly Cys Ser Arg Lys Asn Arg Thr Arg Ser His Cys Arg Leu Gly
 420 425 430
 Gln Ala Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Asp Ser Glu Gly Ser Gly
 435 440 445
 Ala Leu Pro Ser Leu Thr Cys Ser Leu Thr Pro Leu Gly Leu Ala Leu
 450 455 460
 Val Leu Trp Thr Val Leu Gly Pro Cys
 465 470

<210> 50
 <211> 473
 <212> PRT
 5 <213> Rattus

<400> 50

```

Met Lys Arg Ala Ser Ser Gly Gly Ser Arg Leu Leu Ala Trp Val Leu
 1              5              10              15

Trp Leu Gln Ala Trp Arg Val Ala Thr Pro Cys Pro Gly Ala Cys Val
              20              25              30

Cys Tyr Asn Glu Pro Lys Val Thr Thr Ser Cys Pro Gln Gln Gly Leu
              35              40              45

Gln Ala Val Pro Thr Gly Ile Pro Ala Ser Ser Gln Arg Ile Phe Leu
 50              55              60

His Gly Asn Arg Ile Ser His Val Pro Ala Ala Ser Phe Gln Ser Cys
65              70              75              80

Arg Asn Leu Thr Ile Leu Trp Leu His Ser Asn Ala Leu Ala Arg Ile
              85              90              95

Asp Ala Ala Ala Phe Thr Gly Leu Thr Leu Leu Glu Gln Leu Asp Leu
              100              105              110

Ser Asp Asn Ala Gln Leu His Val Val Asp Pro Thr Thr Phe His Gly
              115              120              125

Leu Gly His Leu His Thr Leu His Leu Asp Arg Cys Gly Leu Arg Glu
              130              135              140

Leu Gly Pro Gly Leu Phe Arg Gly Leu Ala Ala Leu Gln Tyr Leu Tyr
145              150              155              160

Leu Gln Asp Asn Asn Leu Gln Ala Leu Pro Asp Asn Thr Phe Arg Asp
              165              170              175

Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Phe Leu His Gly Asn Arg Ile Pro Ser
              180              185              190

Val Pro Glu His Ala Phe Arg Gly Leu His Ser Leu Asp Arg Leu Leu
              195              200              205

```

Leu His Gln Asn His Val Ala Arg Val His Pro His Ala Phe Arg Asp
 210 215 220
 Leu Gly Arg Leu Met Thr Leu Tyr Leu Phe Ala Asn Asn Leu Ser Met
 225 230 235 240
 Leu Pro Ala Glu Val Leu Met Pro Leu Arg Ser Leu Gln Tyr Leu Arg
 245 250 255
 Leu Asn Asp Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys Arg Ala Arg Pro Leu Trp
 260 265 270
 Ala Trp Leu Gln Lys Phe Arg Gly Ser Ser Ser Glu Val Pro Cys Asn
 275 280 285
 Leu Pro Gln Arg Leu Ala Asp Arg Asp Leu Lys Arg Leu Ala Ala Ser
 290 295 300
 Asp Leu Glu Gly Cys Ala Val Ala Ser Gly Pro Phe Arg Pro Ile Gln
 305 310 315 320
 Thr Ser Gln Leu Thr Asp Glu Glu Leu Leu Ser Leu Pro Lys Cys Cys
 325 330 335
 Gln Pro Asp Ala Ala Asp Lys Ala Ser Val Leu Glu Pro Gly Arg Pro
 340 345 350
 Ala Ser Ala Gly Asn Ala Leu Lys Gly Arg Val Pro Pro Gly Asp Thr
 355 360 365
 Pro Pro Gly Asn Gly Ser Gly Pro Arg His Ile Asn Asp Ser Pro Phe
 370 375 380
 Gly Thr Leu Pro Ser Ser Ala Glu Pro Pro Leu Thr Ala Leu Arg Pro
 385 390 395 400
 Gly Gly Ser Glu Pro Pro Gly Leu Pro Thr Thr Gly Pro Arg Arg Arg
 405 410 415
 Pro Gly Cys Ser Arg Lys Asn Arg Thr Arg Ser His Cys Arg Leu Gly
 420 425 430
 Gln Ala Gly Ser Gly Ala Ser Gly Thr Gly Asp Ala Glu Gly Ser Gly
 435 440 445

Ala Leu Pro Ala Leu Ala Cys Ser Leu Ala Pro Leu Gly Leu Ala Leu
 450 455 460

Val Leu Trp Thr Val Leu Gly Pro Cys
 465 470

<210> 51
 <211> 473
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 51

Met Lys Arg Ala Ser Ser Gly Gly Ser Arg Leu Leu Ala Trp Val Leu
 1 5 10 15

Trp Leu Gln Ala Trp Arg Val Ala Thr Pro Cys Pro Gly Ala Cys Val
 20 25 30

Cys Tyr Asn Glu Pro Lys Val Thr Thr Ser Cys Pro Gln Gln Gly Leu
 35 40 45

Gln Ala Val Pro Thr Gly Ile Pro Ala Ser Ser Gln Arg Ile Phe Leu
 50 55 60

His Gly Asn Arg Ile Ser His Val Pro Ala Ala Ser Phe Gln Ser Cys
 65 70 75 80

Arg Asn Leu Thr Ile Leu Trp Leu His Ser Asn Ala Leu Ala Arg Ile
 85 90 95

Asp Ala Ala Ala Phe Thr Gly Leu Thr Leu Leu Glu Gln Leu Asp Leu
 100 105 110

Ser Asp Asn Ala Gln Leu His Val Val Asp Pro Thr Thr Phe His Gly
 115 120 125

Leu Gly His Leu His Thr Leu His Leu Asp Arg Cys Gly Leu Arg Glu
 130 135 140

Leu Gly Pro Gly Leu Phe Arg Gly Leu Ala Ala Leu Gln Tyr Leu Tyr
 145 150 155 160

Leu Gln Asp Asn Asn Leu Gln Ala Leu Pro Asp Asn Thr Phe Arg Asp
 165 170 175

Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Phe Leu His Gly Asn Arg Ile Pro Ser

180					185					190					
Val	Pro	Glu	His	Ala	Phe	Arg	Gly	Leu	His	Ser	Leu	Asp	Arg	Leu	Leu
		195					200					205			
Leu	His	Gln	Asn	His	Val	Ala	Arg	Val	His	Pro	His	Ala	Phe	Arg	Asp
	210					215					220				
Leu	Gly	Arg	Leu	Met	Thr	Leu	Tyr	Leu	Phe	Ala	Asn	Asn	Leu	Ser	Met
225					230					235					240
Leu	Pro	Ala	Glu	Val	Leu	Met	Pro	Leu	Arg	Ser	Leu	Gln	Tyr	Leu	Arg
				245					250					255	
Leu	Asn	Asp	Asn	Pro	Trp	Val	Cys	Asp	Cys	Arg	Ala	Arg	Pro	Leu	Trp
			260					265					270		
Ala	Trp	Leu	Gln	Lys	Phe	Arg	Gly	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Pro	Cys	Asn
		275					280					285			
Leu	Pro	Gln	Arg	Leu	Ala	Asp	Arg	Asp	Leu	Lys	Arg	Leu	Ala	Ala	Ser
	290					295					300				
Asp	Leu	Glu	Gly	Cys	Ala	Val	Ala	Ser	Gly	Pro	Phe	Arg	Pro	Ile	Gln
305					310					315					320
Thr	Ser	Gln	Leu	Thr	Asp	Glu	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Pro	Lys	Cys	Cys
				325					330					335	
Gln	Pro	Asp	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ser	Val	Leu	Glu	Pro	Gly	Arg	Pro
			340					345					350		
Ala	Ser	Ala	Gly	Asn	Ala	Leu	Lys	Gly	Arg	Val	Pro	Pro	Gly	Asp	Thr
		355					360					365			
Pro	Pro	Gly	Asn	Gly	Ser	Gly	Pro	Arg	His	Ile	Asn	Asp	Ser	Pro	Phe
	370					375					380				
Gly	Thr	Leu	Pro	Ser	Ser	Ala	Glu	Pro	Pro	Leu	Thr	Ala	Leu	Arg	Pro
385					390					395					400
Gly	Gly	Ser	Glu	Pro	Pro	Gly	Leu	Pro	Thr	Thr	Gly	Pro	Arg	Arg	Arg
				405					410					415	
Pro	Gly	Cys	Ser	Arg	Lys	Asn	Arg	Thr	Arg	Ser	His	Cys	Arg	Leu	Gly
			420					425					430		

Gln Ala Gly Ser Gly Ala Ser Gly Thr Gly Asp Ala Glu Gly Ser Gly
435 440 445

Ala Leu Pro Ala Leu Ala Cys Ser Leu Ala Pro Leu Gly Leu Ala Leu
450 455 460

Val Leu Trp Thr Val Leu Gly Pro Cys
465 470

<210> 52

<211> 18

5 <212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ARN_{Nic} o de ARN_{ph} sintético

10

<400> 52

cuacuucucc cgcaggcg 18

15 <210> 53

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Secuencia de polinucleótidos sintética complementaria del ARN_{Nic} o del ARN_{ph}

<400> 53

25 gatgaagagg gcgtccgct 19

<210> 54

<211> 19

<212> ARN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ARN_{Nic} o de ARN_{ph} sintético

35 <400> 54

cccggaccga cgucucaa 19

<210> 55

40 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Secuencia de polinucleótidos sintética complementaria del ARN_{Nic} o del ARN_{ph}

<400> 55

gggcctggct gcagaagt 19

50

<210> 56
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de ARNic o de ARNph sintético
 <400> 56
 10 cugaccacug agucuuccg 19
 <210> 57
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polinucleótidos sintética complementaria del ARNic o del ARNph
 20 <400> 57
 gactggtgac tcagagaagg c 21
 25 <210> 58
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> NgR1 humano mutante
 <400> 58

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

Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg Ser Val Asp Pro Ala Thr Phe His Gly
115 120 125

Leu Gly Arg Leu His Thr Leu His Leu Asp Arg Cys Gly Leu Gln Glu
130 135 140

Leu Gly Pro Gly Leu Phe Arg Gly Leu Ala Ala Leu Gln Tyr Leu Tyr
145 150 155 160

Leu Gln Asp Asn Ala Leu Gln Ala Leu Pro Asp Asp Thr Phe Arg Asp
165 170 175

Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Phe Leu His Gly Asn Arg Ile Ser Ser
180 185 190

Val Pro Glu Arg Ala Phe Arg Gly Leu His Ser Leu Asp Arg Leu Leu
195 200 205

Leu His Gln Asn Arg Val Ala His Val His Pro His Ala Phe Arg Asp
210 215 220

Leu Gly Arg Leu Met Thr Leu Tyr Leu Phe Ala Asn Asn Leu Ser Ala
225 230 235 240

Leu Pro Thr Glu Ala Leu Ala Pro Leu Arg Ala Leu Gln Tyr Leu Arg
245 250 255

Leu Asn Asp Asn Pro Trp Val Cys Asp Ala Arg Ala Arg Pro Leu Trp
260 265 270

Ala Trp Leu Gln Lys Phe Arg Gly Ser Ser Ser Glu Val Pro Cys Ser
275 280 285

Leu Pro Gln Arg Leu Ala Gly Arg Asp Leu Lys Arg Leu Ala Ala Asn
290 295 300

Asp Leu Gln Gly Ala Ala
305 310

<210> 59

<211> 310

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> NgR1 humano mutante

10

<400> 59

```

Met Lys Arg Ala Ser Ser Gly Gly Ser Arg Leu Pro Thr Trp Val Leu
1          5          10          15

Trp Leu Gln Ala Trp Arg Val Ala Thr Pro Cys Pro Gly Ala Cys Val
          20          25          30

Cys Tyr Asn Glu Pro Lys Val Thr Thr Ser Arg Pro Gln Gln Gly Leu
          35          40          45

Gln Ala Val Pro Ala Gly Ile Pro Ala Ser Ser Gln Arg Ile Phe Leu
50          55          60

His Gly Asn Arg Ile Ser Tyr Val Pro Ala Ala Ser Phe Gln Ser Cys
65          70          75          80

Arg Asn Leu Thr Ile Leu Trp Leu His Ser Asn Ala Leu Ala Gly Ile
          85          90          95

Asp Ala Ala Ala Phe Thr Gly Leu Thr Leu Leu Glu Gln Leu Asp Leu
          100          105          110

Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg Val Val Asp Pro Thr Thr Phe Arg Gly
          115          120          125

Leu Gly His Leu His Thr Leu His Leu Asp Arg Cys Gly Leu Gln Glu
          130          135          140

Leu Gly Pro Gly Leu Phe Arg Gly Leu Ala Ala Leu Gln Tyr Leu Tyr
145          150          155          160

Leu Gln Asp Asn Asn Leu Gln Ala Leu Pro Asp Asn Thr Phe Arg Asp
          165          170          175

Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Phe Leu His Gly Asn Arg Ile Pro Ser
          180          185          190

Val Pro Glu His Ala Phe Arg Gly Leu His Ser Leu Asp Arg Leu Leu
          195          200          205

Leu His Gln Asn His Val Ala Arg Val His Pro His Ala Phe Arg Asp
210          215          220

Leu Gly Arg Leu Met Thr Leu Tyr Leu Phe Ala Asn Asn Leu Ser Met
225          230          235          240

```

Leu Pro Ala Glu Val Leu Val Pro Leu Arg Ser Leu Gln Tyr Leu Arg
245 250 255

Leu Asn Asp Asn Pro Trp Val Cys Asp Ala Arg Ala Arg Pro Leu Trp
260 265 270

Ala Trp Leu Gln Lys Phe Arg Gly Ser Ser Ser Gly Val Pro Ser Asn
275 280 285

Leu Pro Gln Arg Leu Ala Gly Arg Asp Leu Lys Arg Leu Ala Thr Ser
290 295 300

Asp Leu Glu Gly Ala Ala
305 310

<210> 60

<211> 420

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Met Leu Pro Gly Leu Arg Arg Leu Leu Gln Ala Pro Ala Ser Ala Cys
1 5 10 15

Leu Leu Leu Met Leu Leu Ala Leu Pro Leu Ala Ala Pro Ser Cys Pro
20 25 30

Met Leu Cys Thr Cys Tyr Ser Ser Pro Pro Thr Val Ser Cys Gln Ala
35 40 45

Asn Asn Phe Ser Ser Val Pro Leu Ser Leu Pro Pro Ser Thr Gln Arg
50 55 60

Leu Phe Leu Gln Asn Asn Leu Ile Arg Thr Leu Arg Pro Gly Thr Phe
65 70 75 80

Gly Ser Asn Leu Leu Thr Leu Trp Leu Phe Ser Asn Asn Leu Ser Thr
85 90 95

Ile Tyr Pro Gly Thr Phe Arg His Leu Gln Ala Leu Glu Glu Leu Asp
100 105 110

Leu Gly Asp Asn Arg His Leu Arg Ser Leu Glu Pro Asp Thr Phe Gln
115 120 125

Gly Leu Glu Arg Leu Gln Ser Leu His Leu Tyr Arg Cys Gln Leu Ser
 130 135 140
 Ser Leu Pro Gly Asn Ile Phe Arg Gly Leu Val Ser Leu Gln Tyr Leu
 145 150 155 160
 Tyr Leu Gln Glu Asn Ser Leu Leu His Leu Gln Asp Asp Leu Phe Ala
 165 170 175
 Asp Leu Ala Asn Leu Ser His Leu Phe Leu His Gly Asn Arg Leu Arg
 180 185 190
 Leu Leu Thr Glu His Val Phe Arg Gly Leu Gly Ser Leu Asp Arg Leu
 195 200 205
 Leu Leu His Gly Asn Arg Leu Gln Gly Val His Arg Ala Ala Phe Arg
 210 215 220
 Gly Leu Ser Arg Leu Thr Ile Leu Tyr Leu Phe Asn Asn Ser Leu Ala
 225 230 235 240
 Ser Leu Pro Gly Glu Ala Leu Ala Asp Leu Pro Ser Leu Glu Phe Leu
 245 250 255
 Arg Leu Asn Ala Asn Pro Trp Ala Cys Asp Cys Arg Ala Arg Pro Leu
 260 265 270
 Trp Ala Trp Phe Gln Arg Ala Arg Val Ser Ser Ser Asp Val Thr Cys
 275 280 285
 Ala Thr Pro Pro Glu Arg Gln Gly Arg Asp Leu Arg Ala Leu Arg Glu
 290 295 300
 Ala Asp Phe Gln Ala Cys Pro Pro Ala Ala Pro Thr Arg Pro Gly Ser
 305 310 315 320
 Arg Ala Arg Gly Asn Ser Ser Ser Asn His Leu Tyr Gly Val Ala Glu
 325 330 335
 Ala Gly Ala Pro Pro Ala Asp Pro Ser Thr Leu Tyr Arg Asp Leu Pro
 340 345 350
 Ala Glu Asp Ser Arg Gly Arg Gln Gly Gly Asp Ala Pro Thr Glu Asp
 355 360 365
 Asp Tyr Trp Gly Gly Tyr Gly Gly Glu Asp Gln Arg Gly Glu Gln Met

370 375 380

Cys Pro Gly Ala Ala Cys Gln Ala Pro Pro Asp Ser Arg Gly Pro Ala
385 390 395 400

Leu Ser Ala Gly Leu Pro Ser Pro Leu Leu Cys Leu Leu Leu Leu Val
405 410 415

Pro His His Leu
420

<210> 61
<211> 420
5 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 61

Met Leu Pro Gly Leu Arg Arg Leu Leu Gln Gly Pro Ala Ser Ala Cys
1 5 10 15

Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala Leu Pro Ser Val Thr Pro Ser Cys Pro
20 25 30

Met Leu Cys Thr Cys Tyr Ser Ser Pro Pro Thr Val Ser Cys Gln Ala
35 40 45

Asn Asn Phe Ser Ser Val Pro Leu Ser Leu Pro Pro Ser Thr Gln Arg
50 55 60

Leu Phe Leu Gln Asn Asn Leu Ile Arg Ser Leu Arg Pro Gly Thr Phe
65 70 75 80

Gly Pro Asn Leu Leu Thr Leu Trp Leu Phe Ser Asn Asn Leu Ser Thr
85 90 95

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

Leu Gly Asp Asn Arg His Leu Arg Ser Leu Glu Pro Asp Thr Phe Gln
115 120 125

Gly Leu Glu Arg Leu Gln Ser Leu His Leu Tyr Arg Cys Gln Leu Ser
130 135 140

Ser Leu Pro Gly Asn Ile Phe Arg Gly Leu Val Ser Leu Gln Tyr Leu
145 150 155 160

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

Leu Ser Ala Gly Leu Arg Thr Pro Leu Leu Cys Leu Leu Pro Leu Ala
405 410 415

Leu His His Leu
420

<210> 62

<211> 441

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Met Leu Arg Lys Gly Cys Cys Val Glu Leu Leu Leu Leu Leu Val Ala
1 5 10 15

Ala Glu Leu Pro Leu Gly Gly Gly Cys Pro Arg Asp Cys Val Cys Tyr
20 25 30

Pro Ala Pro Met Thr Val Ser Cys Gln Ala His Asn Phe Ala Ala Ile
35 40 45

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

Arg Ile Gly Leu Leu Gln Pro Gly His Phe Ser Pro Ala Met Val Thr
65 70 75 80

Leu Trp Ile Tyr Ser Asn Asn Ile Thr Tyr Ile His Pro Ser Thr Phe
85 90 95

Glu Gly Phe Val His Leu Glu Glu Leu Asp Leu Gly Asp Asn Arg Gln
100 105 110

Leu Arg Thr Leu Ala Pro Glu Thr Phe Gln Gly Leu Val Lys Leu His
115 120 125

Ala Leu Tyr Leu Tyr Lys Cys Gly Leu Ser Ala Leu Pro Ala Gly Val
130 135 140

Phe Gly Gly Leu His Ser Leu Gln Tyr Leu Tyr Leu Gln Asp Asn His
145 150 155 160

Ile Glu Tyr Leu Gln Asp Asp Ile Phe Val Asp Leu Val Asn Leu Ser
165 170 175

His Leu Phe Leu His Gly Asn Lys Leu Trp Ser Leu Gly Pro Gly Thr
180 185 190

Phe Arg Gly Leu Val Asn Leu Asp Arg Leu Leu Leu His Glu Asn Gln
 195 200 205
 Leu Gln Trp Val His His Lys Ala Phe His Asp Leu Arg Arg Leu Thr
 210 215 220
 Thr Leu Phe Leu Phe Asn Asn Ser Leu Ser Glu Leu Gln Gly Glu Cys
 225 230 235 240
 Leu Ala Pro Leu Gly Ala Leu Glu Phe Leu Arg Leu Asn Gly Asn Pro
 245 250 255
 Trp Asp Cys Gly Cys Arg Ala Arg Ser Leu Trp Glu Trp Leu Gln Arg
 260 265 270
 Phe Arg Gly Ser Ser Ser Ala Val Pro Cys Val Ser Pro Gly Leu Arg
 275 280 285
 His Gly Gln Asp Leu Lys Leu Leu Arg Ala Glu Asp Phe Arg Asn Cys
 290 295 300
 Thr Gly Pro Ala Ser Pro His Gln Ile Lys Ser His Thr Leu Thr Thr
 305 310 315 320
 Thr Asp Arg Ala Ala Arg Lys Glu His His Ser Pro His Gly Pro Thr
 325 330 335
 Arg Ser Lys Gly His Pro His Gly Pro Arg Pro Gly His Arg Lys Pro
 340 345 350
 Gly Lys Asn Cys Thr Asn Pro Arg Asn Arg Asn Gln Ile Ser Lys Ala
 355 360 365
 Gly Ala Gly Lys Gln Ala Pro Glu Leu Pro Asp Tyr Ala Pro Asp Tyr
 370 375 380
 Gln His Lys Phe Ser Phe Asp Ile Met Pro Thr Ala Arg Pro Lys Arg
 385 390 395 400
 Lys Gly Lys Cys Ala Arg Arg Thr Pro Ile Arg Ala Pro Ser Gly Val
 405 410 415
 Gln Gln Ala Ser Ser Ala Ser Ser Leu Gly Ala Ser Leu Leu Ala Trp
 420 425 430
 Thr Leu Gly Leu Ala Val Thr Leu Arg
 435 440

<210> 63
 <211> 445
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus

<400> 63

```

Met Leu Arg Lys Gly Cys Cys Val Glu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala
 1          5          10          15

Gly Glu Leu Pro Leu Gly Gly Gly Cys Pro Arg Asp Cys Val Cys Tyr
          20          25          30

Pro Ala Pro Met Thr Val Ser Cys Gln Ala His Asn Phe Ala Ala Ile
      35          40          45

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

Arg Ile Thr Phe Leu Gln Gln Gly His Phe Ser Pro Ala Met Val Thr
65          70          75          80

Leu Trp Ile Tyr Ser Asn Asn Ile Thr Phe Ile Ala Pro Asn Thr Phe
          85          90          95

Glu Gly Phe Val His Leu Glu Glu Leu Asp Leu Gly Asp Asn Arg Gln
          100          105          110

Leu Arg Thr Leu Ala Pro Glu Thr Phe Gln Gly Leu Val Lys Leu His
      115          120          125

Ala Leu Tyr Leu Tyr Lys Cys Gly Leu Ser Ala Leu Pro Ala Gly Ile
      130          135          140

Phe Gly Gly Leu His Ser Leu Gln Tyr Leu Tyr Leu Gln Asp Asn His
145          150          155          160

Ile Glu Tyr Leu Gln Asp Asp Ile Phe Val Asp Leu Val Asn Leu Ser
          165          170          175

His Leu Phe Leu His Gly Asn Lys Leu Trp Ser Leu Gly Gln Gly Ile
          180          185          190

Phe Arg Gly Leu Val Asn Leu Asp Arg Leu Leu Leu His Glu Asn Gln

```

195					200					205					
Leu	Gln	Trp	Val	His	His	Lys	Ala	Phe	His	Asp	Leu	His	Arg	Leu	Thr
210						215					220				
Thr	Leu	Phe	Leu	Phe	Asn	Asn	Ser	Leu	Thr	Glu	Leu	Gln	Gly	Asp	Cys
225					230					235					240
Leu	Ala	Pro	Leu	Val	Ala	Leu	Glu	Phe	Leu	Arg	Leu	Asn	Gly	Asn	Ala
				245					250					255	
Trp	Asp	Cys	Gly	Cys	Arg	Ala	Arg	Ser	Leu	Trp	Glu	Trp	Leu	Arg	Arg
			260					265					270		
Phe	Arg	Gly	Ser	Ser	Ser	Ala	Val	Pro	Cys	Ala	Thr	Pro	Glu	Leu	Arg
		275					280					285			
Gln	Gly	Gln	Asp	Leu	Lys	Leu	Leu	Arg	Val	Glu	Asp	Phe	Arg	Asn	Cys
290						295					300				
Thr	Gly	Pro	Val	Ser	Pro	His	Gln	Ile	Lys	Ser	His	Thr	Leu	Thr	Thr
305					310					315					320
Ser	Asp	Arg	Ala	Ala	Arg	Lys	Glu	His	His	Pro	Ser	His	Gly	Ala	Ser
				325					330					335	
Arg	Asp	Lys	Gly	His	Pro	His	Gly	His	Pro	Pro	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly
			340					345					350		
Tyr	Lys	Lys	Ala	Gly	Lys	Asn	Cys	Thr	Ser	His	Arg	Asn	Arg	Asn	Gln
		355					360					365			
Ile	Ser	Lys	Val	Ser	Ser	Gly	Lys	Glu	Leu	Thr	Glu	Leu	Gln	Asp	Tyr
	370					375					380				
Ala	Pro	Asp	Tyr	Gln	His	Lys	Phe	Ser	Phe	Asp	Ile	Met	Pro	Thr	Ala
385					390					395					400
Arg	Pro	Lys	Arg	Lys	Gly	Lys	Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Pro	Ile	Arg	Ala
				405					410					415	
Pro	Ser	Gly	Val	Gln	Gln	Ala	Ser	Ser	Gly	Thr	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro
			420					425					430		
Leu	Leu	Ala	Trp	Ile	Leu	Gly	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Arg			
		435					440					445			

<210> 64

<211> 344

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> NgR1 humano mutante

10 <400> 64

Met Lys Arg Ala Ser Ala Gly Gly Ser Arg Leu Leu Ala Trp Val Leu
 1 5 10 15

Trp Leu Gln Ala Trp Gln Val Ala Ala Pro Cys Pro Gly Ala Cys Val
 20 25 30

Cys Tyr Asn Glu Pro Lys Val Thr Thr Ser Cys Pro Gln Gln Gly Leu
 35 40 45

Gln Ala Val Pro Val Gly Ile Pro Ala Ala Ser Gln Arg Ile Phe Leu
 50 55 60

His Gly Asn Arg Ile Ser His Val Pro Ala Ala Ser Phe Arg Ala Cys
 65 70 75 80

Arg Asn Leu Thr Ile Leu Trp Leu His Ser Asn Val Leu Ala Arg Ile
 85 90 95

Asp Ala Ala Ala Phe Thr Gly Leu Ala Leu Leu Glu Gln Leu Asp Leu
 100 105 110

Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg Ser Val Asp Pro Ala Thr Phe His Gly
 115 120 125

Leu Gly Arg Leu His Thr Leu His Leu Asp Arg Cys Gly Leu Gln Glu
 130 135 140

Leu Gly Pro Gly Leu Phe Arg Gly Leu Ala Ala Leu Gln Tyr Leu Tyr
 145 150 155 160

Leu Gln Asp Asn Ala Leu Gln Ala Leu Pro Asp Asp Thr Phe Arg Asp
 165 170 175

Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Phe Leu His Gly Asn Arg Ile Ser Ser
 180 185 190

Val Pro Glu Arg Ala Phe Arg Gly Leu His Ser Leu Asp Arg Leu Leu

195					200					205					
Leu	His	Gln	Asn	Arg	Val	Ala	His	Val	His	Pro	His	Ala	Phe	Arg	Asp
210						215					220				
Leu	Gly	Arg	Leu	Met	Thr	Leu	Tyr	Leu	Phe	Ala	Asn	Asn	Leu	Ser	Ala
225					230					235					240
Leu	Pro	Thr	Glu	Ala	Leu	Ala	Pro	Leu	Arg	Ala	Leu	Gln	Tyr	Leu	Arg
				245					250					255	
Leu	Asn	Asp	Asn	Pro	Trp	Val	Cys	Asp	Ala	Arg	Ala	Arg	Pro	Leu	Trp
			260					265					270		
Ala	Trp	Leu	Gln	Lys	Phe	Arg	Gly	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Pro	Cys	Ser
	275						280					285			
Leu	Pro	Gln	Arg	Leu	Ala	Gly	Arg	Asp	Leu	Lys	Arg	Leu	Ala	Ala	Asn
	290					295					300				
Asp	Leu	Gln	Gly	Ala	Ala	Val	Ala	Thr	Gly	Pro	Tyr	His	Pro	Ile	Trp
305					310					315					320
Thr	Gly	Arg	Ala	Thr	Asp	Glu	Glu	Pro	Leu	Gly	Leu	Pro	Lys	Cys	Cys
				325					330					335	
Gln	Pro	Asp	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala								
			340												

<210> 65

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Conector sintético

<400> 65

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5					10					15

15

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Conector sintético

<400> 66

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

5

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Conector sintético

<400> 67

15

Glu Ser Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 68

<211> 14

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Conector sintético

25

<400> 68

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr
1 5 10

30 <210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Conector sintético

<400> 69

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr Gln
1 5 10 15

40

<210> 70

<211> 14

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Conector sintético

50 <400> 70

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp
1 5 10

<210> 71

<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Conector sintético

<400> 71

10 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

```
<210> 72
<211> 18
<212> PRT
```

15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Conector sintético

20 <400> 72

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser
1 5 10 15

Leu Asp

<210> 73

25 <211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Cebador sintético

<400> 73

Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Glu Leu Ala Phe Arg Ser Leu Asp
1 5 10 15

35

<210> 74
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40

<223> Epítipo FLAG sintético

<400> 74

45 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 75
<211> 8

50 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Epítipo FLAG sintético

5 <400> 75

Asp Tyr Lys Asp Glu Asp Asp Lys
1 5

<210> 76

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Epítipo Strep sintético

<400> 76

Ala Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly
1 5

20

<210> 77

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Epítipo VSV-G sintético

<400> 77

30

Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
1 5 10

<210> 78

<211> 6

35 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Epítipo poli-His sintético

40

<400> 78

His His His His His His
1 5

45 <210> 79

<211> 13

<212> PRT

<213> Hemaglutinina del virus de la gripe

50 <400> 79

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ile Glu Gly Arg
1 5 10

<210> 80
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 80

Glu Gln Lys Leu Leu Ser Glu Glu Asp Leu Asn
 1 5 10

10 <210> 81
 <211> 1719
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 81

agcccagcca	gagccggg	gagcggagcg	cgccgagcct	cgtcccgcgg	ccgggcccggg	60
gccgggcccgt	agcggcggcg	cctggatg	gacccggccg	cggggagacg	ggcgcccgc	120
ccgaaacgac	tttcagtccc	cgacgcgccc	cgcccaaccc	ctacgatgaa	gagggcgctcc	180
gctggagggga	gccggctgct	ggcatgggtg	ctgtggctgc	aggcctggca	ggcggcagcc	240
ccatgcccag	gtgcctgcgt	atgctacaat	gagcccaagg	tgacgacaag	ctgccccag	300
cagggcctgc	aggctgtgcc	cgtgggcatc	cctgctgcca	gccagcgcat	cttcctgcac	360
ggcaaccgca	tctcgcatgt	gccagctgcc	agcttccgtg	cctgccgcaa	cctcaccatc	420
ctgtggctgc	actcgaatgt	gctggccccga	attgatgcgg	ctgccttcac	tggcctggcc	480
ctcctggagc	agctggacct	cagcgataat	gcacagctcc	ggctctgtgga	ccctgccaca	540
ttccacggcc	tgggcccgcct	acacacgctg	cacctggacc	gctgcggcct	gcaggagctg	600
ggcccggggc	tgttccgcgg	cctggctgcc	ctgcagtacc	tctacctgca	ggacaacgcg	660
ctgcaggcac	tgctgatga	caocttcgcg	gacctgggca	acctcacaca	cctcttcctg	720
cacggcaacc	gcatctccag	cgtgcccag	cgcgccctcc	gtgggctgca	cagcctcgac	780
cgtctctctac	tgaccagaa	ccgcgtggcc	catgtgcacc	cgcctgcctt	ccgtgacctt	840
ggcgcctca	tgacactcta	tctgtttgcc	aacaatctat	cagcgctgcc	cactgaggcc	900
ctggcccccc	tgcgtgccct	gcagtacctg	aggctcaacg	acaacccctg	ggtgtgtgac	960
tgccggggcac	gccactctg	ggcctggctg	cagaagttcc	gcggctcctc	ctccgagggtg	1020
ccctgcagcc	tcccgcacg	cctggctggc	cgtgacctca	aacgcctagc	tgccaatgac	1080
ctgcagggct	gcgctgtggc	caccggccct	taccatccca	tctggaccgg	cagggccacc	1140

gatgaggagc	cgctggggct	tcccaagtgc	tgccagecag	atgccgctga	caaggcctca	1200
gtactggagc	ctggaagacc	agcttcggca	ggcaatgcgc	tgaagggacg	cgtgccgccc	1260
ggtgacagcc	cgccgggcaa	cggctctggc	ccacggcaca	tcaatgactc	accctttggg	1320
actctgcctg	gctctgctga	gcccccgctc	actgcagtgc	ggcccgaggg	ctccgagcca	1380
ccagggttcc	ccacctcggy	ccctcgccgg	aggccaggct	gttcacgcaa	gaaccgcacc	1440
cgcagccact	gccgtctggg	ccaggcaggc	agcgggggtg	gcgggactgg	tgactcagaa	1500
ggctcaggtg	ccctaccag	cctcacctgc	agcctcacc	ccctgggcct	ggcgtcgggtg	1560
ctgtggacag	tgcttggggc	ctgctgaccc	ccagcggaca	caagagcgtg	ctcagcagcc	1620
aggtgtgtgt	acatacgggg	tctctctcca	cgcgcgcaag	ccagccgggc	ggccgacccg	1680
tggggcaggc	caggccaggt	cctccctgat	ggacgcctg			1719

<210> 82
 <211> 1422
 5 <212> ADN
 <213> Rattus

<400> 82

atgaagaggg	cgtcctccgg	aggaagccgg	ctgccgacat	gggtgttatg	gctacaggcc	60
tggagggtag	caacgccctg	ccctggtgcc	tgtgtgtgct	acaatgagcc	caaggtcaca	120
acaagccgcc	cccagcaggg	cctgcaggct	gtaccgcgtg	gcatcccagc	ctccagccag	180
agaatcttcc	tgacaggcaa	ccgaatctct	tacgtgccag	ccgccagctt	ccagtcatgc	240
cggaaatctca	ccatcctgtg	gctgcactca	aatgcgctgg	cgggattga	tgccgcggcc	300
ttcactggtc	tgacctctct	ggagcaacta	gatcttagtg	acaatgcaca	gctccgtgtc	360
gtggacceca	ccacgttccg	tggcctgggc	cacctgcaca	cgtgcacct	agaccgatgc	420
ggcctgcagg	agctggggcc	tggcctattc	cgtgggctgg	cagctctgca	gtacctctac	480
ctacaagaca	acaacctgca	ggcacttccc	gacaacacct	tccgagacct	gggcaacctc	540
acgcattctct	ttctgcatgg	caaccgtatc	cccagtgttc	ctgagcacgc	tttccgtggc	600
ttgcacagtc	ttgaccgtct	cctcttgca	cagaaccatg	tggctcgtgt	gcacccacat	660
gccttccggg	accttggccg	actcatgacc	ctctacctgt	ttgccaacaa	cctctccatg	720
ctccccgcag	aggtcctagt	gcccctgagg	tctctgcagt	acctgcgact	caatgacaac	780
ccctgggtgt	gtgactgcag	ggcacgtccg	ctctgggcct	ggctgcagaa	gttccgaggt	840
tctcatccg	gggtgccag	caacctaccc	caacgcctgg	caggccgtga	tctgaagcgc	900
ctggctacca	gtgacttaga	gggttgtgct	gtggcttcgg	ggcccttccg	tcccttccag	960
accaatcagc	tcactgatga	ggagctgctg	ggcctcccca	agtgtgtcca	gccggatgct	1020

10

gcagacaagg	cctcagtact	ggaacccggg	aggecggcgt	ctgttgga	tgcaactcaag	1080
ggacgtgtgc	ctcccgggtga	cactccacca	ggcaatggct	caggcccacg	gcacatcaat	1140
gactctccat	ttgggacttt	gcccggctct	gcagagcccc	cactgactgc	cctgcggcct	1200
gggggttccg	agcccccg	actgcccacc	acgggcccc	gcaggaggcc	aggttgttcc	1260
agaaagaacc	gcacccgtag	ccactgccgt	ctggggccagg	caggaagtgg	gagcagtggga	1320
actggggatg	cagaaggttc	gggggcccctg	cctgcacctgg	cctgcagcct	tgctcctctg	1380
ggccttgac	tggtactttg	gacagtgtct	gggcctgtct	ga		1422

<210> 83

<211> 1892

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 83

agccgcagcc	cgcgagccca	gcccggcccc	gtagagcggga	gcgcgggagc	ctcgtccccg	60
ggccggggccg	ggaccggggcc	ggagcagcgg	cgcttgatg	cggaccgggc	cgcgcgcaga	120
cgggcgcccc	ccccgaagcc	gcttccagt	cccagcgcgc	cccgtctgac	cccgaagatg	180
aagagggcgt	cctccggagg	aagcaggctg	ctggcatggg	tgttatggct	acaggcctgg	240
agggtagcaa	caccatgccc	tggtgcttgt	gtgtgtctaca	atgagcccaa	ggtaacaaca	300
agctgcccc	agcagggtct	gcaggctgtg	ccactggca	tcccagcctc	tagccagcga	360
atcttctctg	atggcaaccg	aatctctcac	gtgccagctg	cgagcttcca	gtcatgccga	420
aatctcacta	tcctgtggct	gcactcta	gcgtggctc	ggatcgatgc	tgctgccttc	480
actggtctga	ccctcctgga	gcaactagat	cttagtgata	atgcacagct	tcatgtctgtg	540
gaccctacca	cgttccacgg	cctggggccac	ctgcacacac	tgacacctaga	ccgatgtggc	600
ctgcgggagc	tgggtcccgg	cctattccgt	ggactagcag	ctctgcagta	cctctaccta	660
caagacaaca	atctgcaggc	actccctgac	aacacctttc	gagacctggg	caacctcacg	720
catctctttc	tgcatggcaa	cgttatcccc	agtgtgcctg	agcacgcttt	ccgtggcctg	780
cacagtcttg	accgcctcct	cttgaccag	aacctgtgtg	ctcgtgtgca	cccacatgcc	840
ttccggggacc	ttggccgcct	catgaccctc	tacctgtttg	ccaacaacct	ctccatgctg	900
cctgcagagg	tcctaattgc	cctgagggtct	ctgcagtacc	tgcgactcaa	tgacaacccc	960
tgggtgtgtg	actgccgggc	acgtccactc	tgggcctggc	tgagaagtt	ccgagggttcc	1020
tcacagagg	tgccctgcaa	cctgccccaa	cgctggcag	accgtgatct	taagcgcctc	1080
gctgccagt	acctagagg	ctgtgctgtg	gcttcaggac	ccttccgtcc	catccagacc	1140
agtcagctca	ctgatgagga	gctgctgagc	ctccccaagt	gctgccagcc	agatgctgca	1200

10

gacaaagcct cagtactgga acccgaggag ccagcttctg ccggaaacgc cctcaaggga 1260
 cgtgtgcctc ccggtgacac tccaccaggc aatggctcag gccctcggca catcaatgac 1320
 tctccatttg gaactttgcc cagctctgca gagccccac tgactgccct gcggcctggg 1380
 ggttccgagc caccaggact tcccaccact ggtccccgca ggaggccagg ttgttcccg 1440
 aagaatcgca ccgcgagcca ctgccgtctg ggccaggcgg gaagtggggc cagtggaaca 1500
 ggggacgcag agggttcagg ggtctctgct gctctggcct gcagccttgc tcctctgggc 1560
 cttgcactgg tactttggac agtgcttggg ccctgctgac cagccaccag ccaccaggtg 1620
 tgtgtacata tgggggtctc ctccacgccg ccagccagag ccaggggacag gctctgaggg 1680
 gcaggccagg ccctccctga cagatgcctc cccaccagcc cacccccac tccaccccat 1740
 catgtttaca ggggttccggg ggtggcggtt gtccagaac gccacctccc acccgatcg 1800
 cggtatatag agatatgaat tttattttac ttgtgtaaaa tatcggatga cgtggaataa 1860
 agagctcttt tcttaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1892

<210> 84

<211> 1263

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 84

atgctgcccg ggctcaggcg cctgctgcaa gctccgcct cggcctgcct cctgctgatg 60
 ctctggccc tgcccctggc ggcccccagc tgcccatgc tctgcacctg ctactcatcc 120
 ccgcccaccg tgagctgcca ggccaacaac ttctctcttg tgccgctgtc cctgccaccc 180
 agcactcagc gactcttctc gcagaacaac ctcatccgca cgctgcggcc aggcaccttt 240
 gggccaacc tgctcacct gtggctcttc tccaacaacc tctccaccat ctaccgggc 300
 actttccgcc acttgcaagc cctggaggag ctggacctcg gtgacaaccg gcacctgcgc 360
 tcgctggagc ccgacacct ccagggcctg gagcggctgc agtcgctgca tttgtaccgc 420
 tgccagctca gcagcctgcc cggcaacatc ttccgaggcc tggtcagcct gcagtacctc 480
 tacctccagg agaacagcct gctccacctc caggatgact tggttcgcca cctggccaac 540
 ctgagccacc tcttctcca cgggaaccgc ctgcggtgct tcacagagca cgtgtttcgc 600
 ggcctgggca gcctggaccg gctgctgctg cacgggaacc ggctgcaggg cgtgcaccgc 660
 gcggccttcc ggggcctcag ccgcctcacc atcctctacc tgttcaacaa cagcctggcc 720
 tcgctgcccg gcgaggcgct cgccgacctg ccctcgctcg agttcctgcg gctcaacgct 780
 aaccctggg cgtgcgactg ccgcgcgcgg ccgctctggg cctgggtcca gcgcgcgcgc 840
 gtgtccagct ccgacgtgac ctgcgccacc ccccggagc gccagggccg agacctgcgc 900

10

gcgctccgcg	aggccgactt	ccaggcgtgt	ccgcccgcgg	caccacgcg	gccgggacgc	960
cgcgcccgcg	gcaacagctc	ctccaaccac	ctgtacgggg	tggccgaggg	cggggcgccc	1020
ccagccgac	cctccaccct	ctaccgagat	ctgcctgcg	aagactcgcg	ggggcgccag	1080
ggcggggacg	cgctactga	ggacgactac	tgggggggct	acgggggtga	ggaccagcga	1140
ggggagcaga	tgtgccccgg	cgctgcctgc	caggcgcccc	cggactcccc	aggccctgcg	1200
ctctcgggcg	ggctccccag	ccctctgctt	tgctcctgc	tcctggtgcc	ccaccacctc	1260
tga						1263

<210> 85

<211> 1263

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 85

atgctgccc	ggctccggcg	cctgctgcaa	ggtcctgcct	cagcctgcct	actgctgaca	60
ctcctggccc	ttccttccgt	gacccccagc	tgtcctatgc	tctgcacctg	ctactcctcc	120
ccgcccaccg	tgagctgcca	ggccaacaac	ttctcctcag	tgccgctgtc	cttgccaccc	180
agtacacaga	gactcttctt	gcagaacaac	ctcctccgct	cactgcggcc	aggcaccttt	240
gggcccaccc	tgctcaccct	gtggctcttc	tccaacaacc	tctccaccat	ccaccctggc	300
accttccgcc	acctgcaggg	cctagaagaa	ctggacctcg	gtgacaaccg	gcacctgcgc	360
tccttgagc	ccgacacctt	ccagggtctg	gagaggctgc	agtcactaca	cctgtatcgt	420
tgccagctca	gcagcctgcc	tggcaacatt	ttccgaggct	tggtcagcct	acagtacctc	480
tacctccagg	agaacagcct	gctccatcta	caggatgact	tgttcgcgga	cctggccaac	540
ctgagccacc	tcttctctca	cggaaccgc	ctgcggctgc	tcacggagca	cgtgttccgc	600
ggcttgggca	gcctggaccg	gctgttgctg	cacgggaacc	ggctgcaggg	cgtgcaccgc	660
gcggctttcc	acggcctcag	ccgcctcacc	atcctctacc	tgttcaacaa	cagcctggcc	720
tcgtgcccgg	gagaggcgct	ggccgacctg	ccggcgctcg	agttcctgcg	gctcaacgcc	780
aacctctggg	cgtgcgactg	ccgcgctcgg	ccgctctggg	cttggttcca	gcgcgcgcgg	840
gtgtccagct	ccgacgtgac	ctgcgccacc	ccgcccagac	gccagggccg	ggacctgcgc	900
gcgctgcgcg	actccgattt	ccaagcgtgc	ccgcgcgcca	cgccacgcg	gocgggacgc	960
cgcgcccgcg	gcaacagctc	ttccaaccac	ctgtacggcg	tggccgaggg	tggcgctccc	1020
cccgcagacc	cgtccacgct	ctaccgagat	ctgcccgcgg	aggactcgcg	ggggcgccag	1080
ggcggggacg	cgccacccga	ggacgactac	tgggggggct	acggcggcga	ggatcagcgg	1140
ggcgagcaga	cgtgtccccg	ggccgcgtgc	caggcgcccc	cagactcgcg	tggccccgcg	1200

10

ctctcgggccc ggctgcccac cccctctgctc tgcctcttgc cccctggcgct ccatcacctc 1260
tga 1263

<210> 86
<211> 1326
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 86

atgcttcgca aaggggtgctg tgtggagttg ctgctgctgt tggtagctgc ggagctgccc 60
ctgggtggtg gctgcccacg ggactgtgtg tgctaccggg cggccatgac ggtcagctgc 120
caggcgcaca actttgcagc catcccggag ggcatccccg tggacagcga gcgcgtcttc 180
ctgcagaaca accgcatcgg cctcctccag cccggccact tcagccccgc catggtcacc 240
ctgtggatct actcgaacaa catcacctac atccacccca gcaccttcga gggcttcgtg 300
cacctggagg agctggacct cggcgacaac cggcagctgc ggacgctggc acccgagacc 360
ttccagggcc tgggtgaagct tcacgccctc tacctctaca agtgtgggct cagcgccttg 420
ccggccggcg tctttggcgg cctgcacagc ctgcagtacc tctacctgca ggacaaccac 480
atcgagtacc tccaggacga catcttcgtg gacctggtea acctcagcca cctgtttctc 540
cacggcaaca agctgtggag tctgggcccc ggacaccttc ggggcctggg gaacctggac 600
cgtcttttgc tgcacgagaa ccagctgcag tgggtccacc acaaggcatt ccacgacctc 660
cgcaggctga ccacctctt cctcttcaac aacagcctct cggagctgca ggggtgagtgc 720
ctggccccgc tggggggcct ggagttctc cgcctcaatg gcaacctctg ggactgtggt 780
tgtcgcgcgc gctccctgtg ggaatggctg cagaggttcc ggggctccag ctccgctgtc 840
ccctgtgtgt cccctgggct gcggcacggc caggacctga agctgctgag ggccgaggac 900
ttccggaact gcacgggacc agcgtccccg caccagatca agtcacacac gctcaccacc 960
accgacaggg ccgcccgcaa ggaacaccac tcacccacg gccccaccag gagcaagggc 1020
caccgcacg gccccggcc cggccacagg aagccgggga agaactgcac caacccagc 1080
aaccgcaatc agatctctaa ggcgggcgcc gggaaacagg cccccgagct gccagactat 1140
gccccagact accagcacia gttcagtttt gacatcatgc ctacggcccc gcccaagagg 1200
aagggcaagt gtgcccgcag gacccccatc cgtgccccca gcggggtgca gcaggcctcc 1260
tcggccagtt cccctggggg ctcctctctg gcctggacac tggggctggc ggtcactctc 1320
cgctga 1326

10
<210> 87
<211> 1338
<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 87

```

atgcttcgca aagggtgctg tgtggaattg ctgctgttgc tgctcgctgg agagctacct      60
ctgggtggtg gttgtcctcg agaactgtgtg tgetaccctg cgcccatgac tgtcagctgc      120
caggcacaca actttgctgc catcccggag ggcatcccag aggacagtga gcgcatcttc      180
ctgcagaaca atcgcatcac ctctctccag cagggccaact tcagccccgc catggtcacc      240
ctctggatct actccaacaa catcactttc attgctccca acaccttcga gggctttgtg      300
catctggagg agctagacct tggagacaac cgacagctgc gaacgctggc acccgagacc      360
ttccaaggcc tgggtgaagct tcacgccctc tacctctata agtgtggact gagcgccctg      420
cccgcaggca tctttggtgg cctgcacagc ctgcagtatc tctacttgca ggacaaccat      480
atcgagtacc tccaagatga catctttgtg gacctgggtc atctcagtca cttgtttctc      540
catggtaaca agctatggag cctgggccaa ggcatcttcc ggggcctggg gaacctggac      600
cggttgctgc tgcattgaga ccagctacag tgggttcacc acaaggcttt ccatgacctc      660
cacaggctaa ccacctctt tctcttcaac aacagcctca ctgagctgca ggggtgactgt      720
ctggcccccc tgggtggcctt ggagttcctt cgcctcaatg ggaatgcttg ggactgtggc      780
tgccggggcac gttccctgtg ggaatggctg cgaaggttcc gtggctctag ctctgctgtc      840
ccctgcgcga ccccccagct ggggcaaggc caggatctga agctgctgag ggtggaggac      900
ttccggaact gcacaggacc agtgtctcct caccagatca agtctcacac gcttaccacc      960
tctgacaggg ctgcccgcaa ggagcaccat ccgtcccatg gggcctccag ggacaaaggc     1020
caccacatg gccatccgcc tggctccagg tcaggttaca agaaggcagg caagaactgc     1080
accagccaca ggaaccggaa ccagatctct aaggtgagct ctgggaaaga gcttaccgaa     1140
ctgcaggact atgccccga ctatcagcac aagttcagct ttgacatcat gccacccgca     1200
cgaccaaga ggaagggcaa gtgtgctcgc aggaccccca tccgtgcccc cagtgggggtg     1260
cagcaggcat cctcaggcac ggcccttggg gccccactcc tggcctggat actggggctg     1320
gcagtcactc tccgctga                                     1338

```

5

<210> 88

<211> 200

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Estructura general sintética de un oligonucleótido usado en la preparación de una molécula de ARNip

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(200)

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

$\langle 220 \rangle$

<221> misc feature

5 $\langle 222 \rangle$ (2)..(200)

<223> puede haber un nucleótido ausente

<400> 88

60

התחתית התחתית התחתית התחתית התחתית התחתית התחתית התחתית התחתית התחתית 120

התחתית התחתית התחתית התחתית התחתית התחתית התחתית התחתית התחתית התחתית 180

10 **tttttttttttt tttttttttttt** **200**

<210> 89

<211> 200

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Estructura general sintética de un oligonucleótido usado en la preparación de una molécula de ARNip

20 <220>

<221> misc feature

$\langle 222 \rangle$ (1).. $\bar{2}00$)

<223> n e s a, c, g, t, o u

25 <220>

<221> misc feature

$\langle 222 \rangle$ (2)..(200)

<223> puede haber un nucleótido ausente

30 <400> 89

תחזקת התורה תחזקת התורה תחזקת התורה תחזקת התורה תחזקת התורה תחזקת התורה 60

תחתית התחתית תחתית התחתית תחתית התחתית תחתית התחתית תחתית התחתית 120

180

200

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende:
 - 5 (a) una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia excepto porque al menos un residuo de cisteína de dicha secuencia de aminoácidos de referencia está sustituido por un aminoácido diferente, en el que dicha secuencia de aminoácidos de referencia se elige de entre el grupo que consiste en:
 - (i) los aminoácidos a hasta 445 del ID. SEC. Nº: 49,
 - 10 (ii) los aminoácidos 27 hasta b del ID. SEC. Nº: 49, y
 - (iii) los aminoácidos a hasta b del ID. SEC. Nº: 49,
 - 15 en los que a es cualquier número entero desde 25 hasta 35 y b es cualquier número entero desde 300 hasta 450; y
 - (b) un polipéptido heterólogo;

en el que dicho polipéptido inhibe la inhibición del crecimiento de la neurita mediada por el receptor nogo

 - 20 en el que el uno o más residuos de cisteína que se van a sustituir se eligen de entre: el residuo de cisteína correspondiente al residuo de cisteína que se encuentra en el aminoácido 266 del ID. SEC. Nº: 49 (C266); el residuo de cisteína correspondiente al residuo de cisteína que se encuentra en el aminoácido 309 del ID. SEC. Nº: 49 (C309); el residuo de cisteína correspondiente al residuo de cisteína que se encuentra en el aminoácido 335 del ID. SEC. Nº: 49 (C335); o combinaciones de los mismos.
 - 25 SEC. Nº: 49 (C335); o combinaciones de los mismos.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que la C266 y la C309 de dicha secuencia de aminoácidos de referencia están sustituidas por aminoácidos diferentes.
 - 30 3. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que la C309 y la C335 de dicha secuencia de aminoácidos de referencia están sustituidas por aminoácidos diferentes.
 4. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que dicho aminoácido diferente es alanina.
 - 35 5. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en el que dicho polipéptido heterólogo se elige de entre el grupo que consiste en:
 - (a) albúmina sérica,
 - 40 (b) una región Fc,
 - (c) un péptido de señalización,
 - 45 (d) una etiqueta polipeptídica, y
 - (e) una combinación de dos o más de dichos polipéptidos heterólogos.
 6. El polipéptido de la reivindicación 5, en el que dicho polipéptido heterólogo es una región Fc.
 - 50 7. El polipéptido de la reivindicación 6, en el que dicha región Fc se elige de entre el grupo que consiste en: una región Fc de la IgA; una región Fc de la IgD; una región Fc de la IgG, una región Fc de la IgE; y una región Fc de la IgM.
 - 55 8. El polipéptido de la reivindicación 7, en el que dicha región Fc es una región Fc de la IgG.
 9. El polipéptido de la reivindicación 5, en el que dicha etiqueta polipeptídica se elige de entre el grupo que consiste en: la etiqueta de FLAG; la etiqueta de Strep; la etiqueta de poli-histidina; la etiqueta de VSV-G; la etiqueta de hemaglutinina del virus de la gripe (HA); y la etiqueta de c-Myc.
 - 60

10. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, en el que dicho polipéptido está unido a una o más fracciones de polialquilenglicol.

11. El polipéptido de la reivindicación 10, en el que dicha una o más fracciones de polialquilenglicol es una fracción de polietilenglicol (PEG).

12. El polipéptido de la reivindicación 11, en el que dicho polipéptido está unido a entre 1 y 5 fracciones de PEG.

10

Estructura esquemática del receptor Nogo

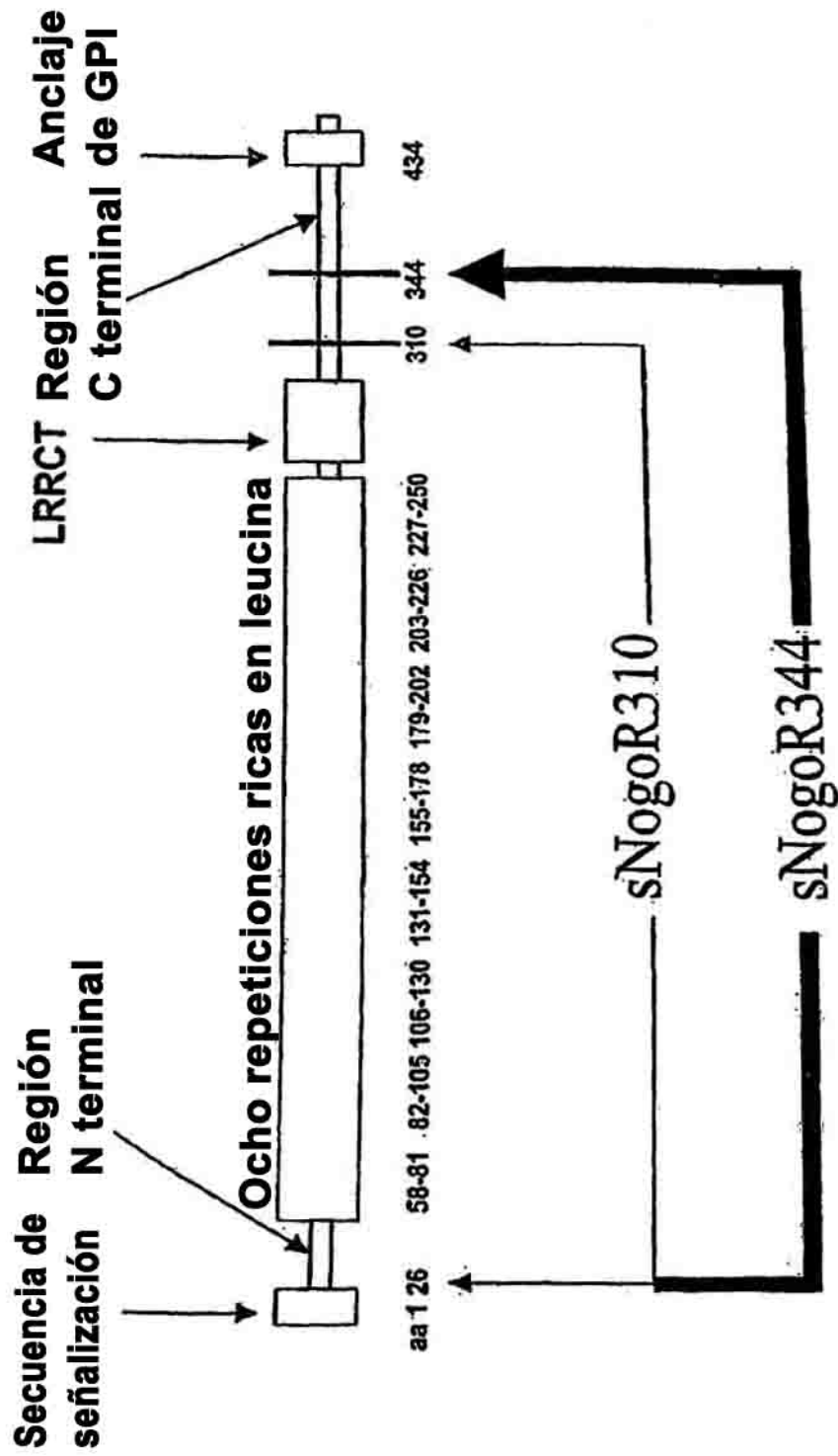
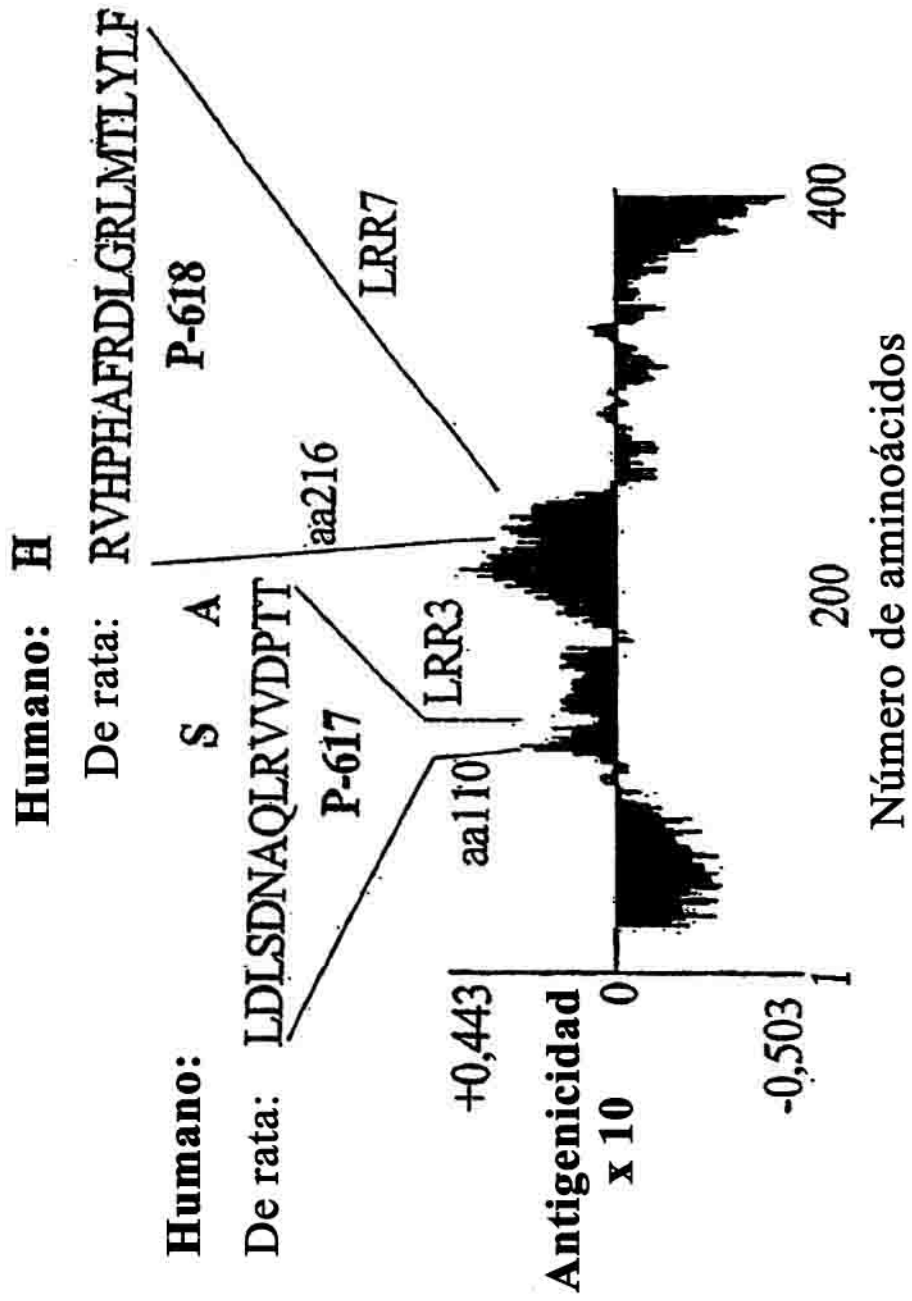


FIG. I



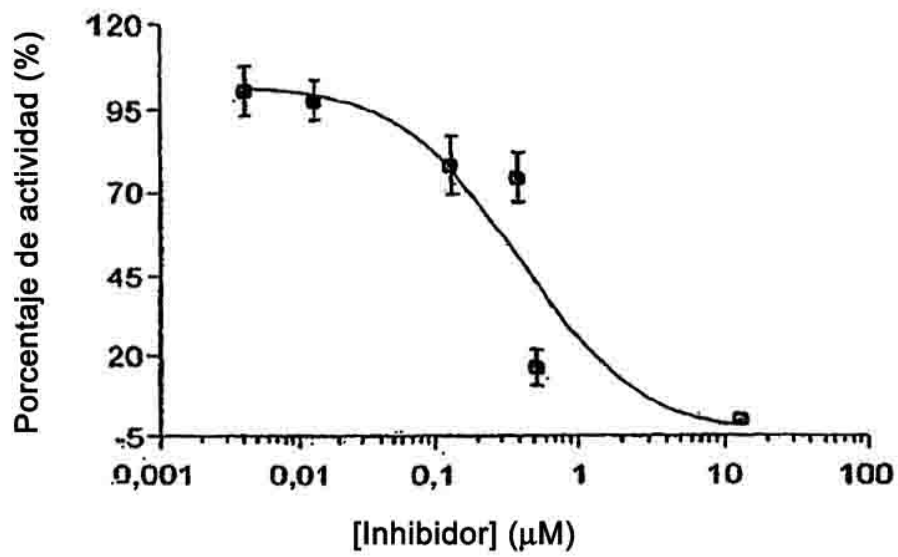


FIG. 3A

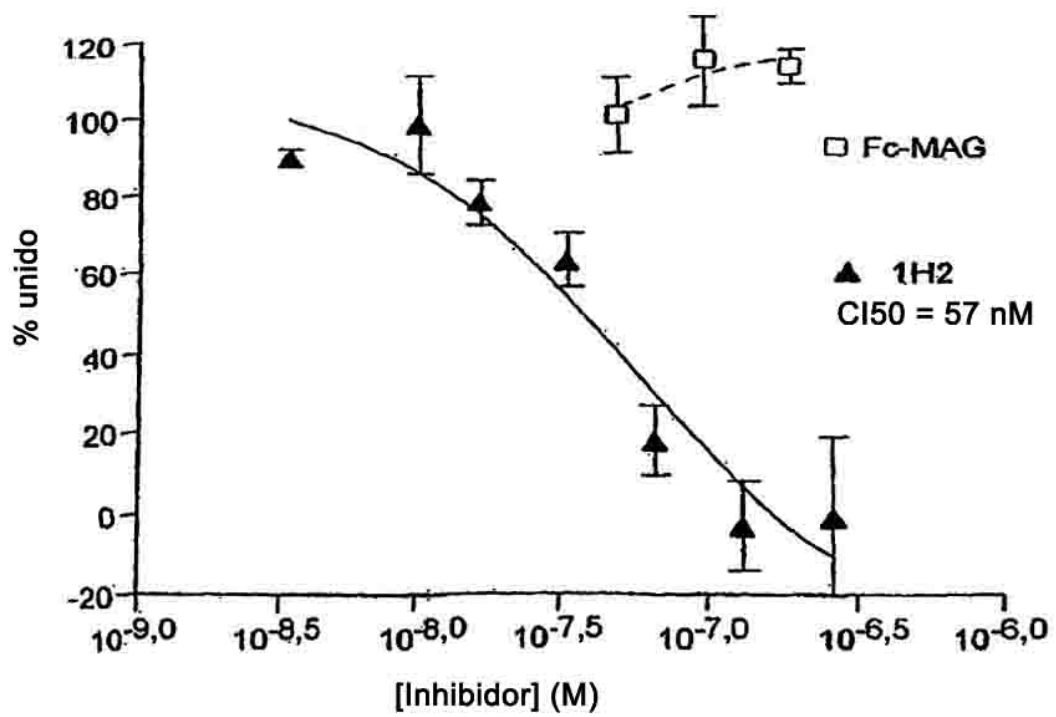


FIG. 3B

ELISA para el anti-R Nogo: 1H2, 3G5, 2F7

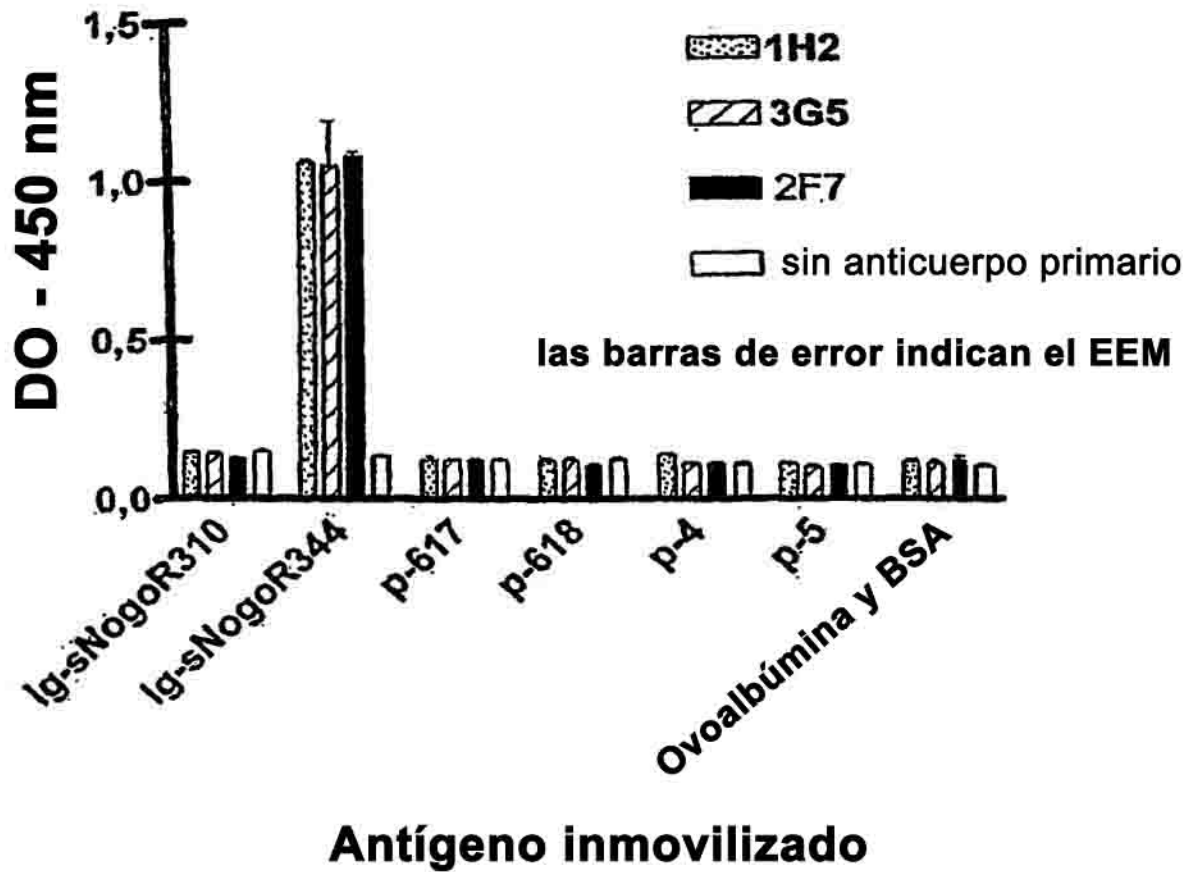


FIG. 4

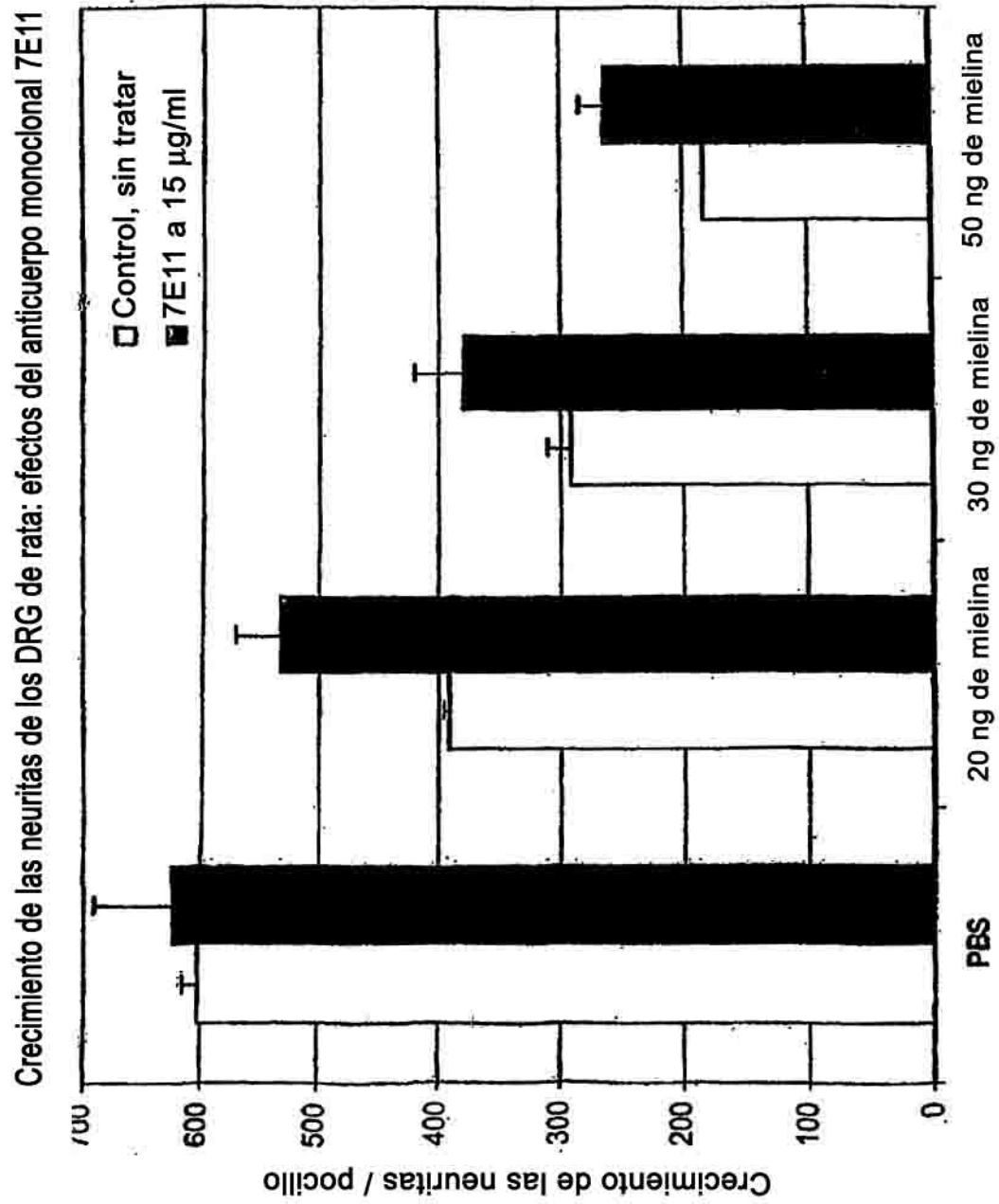


FIG. 5

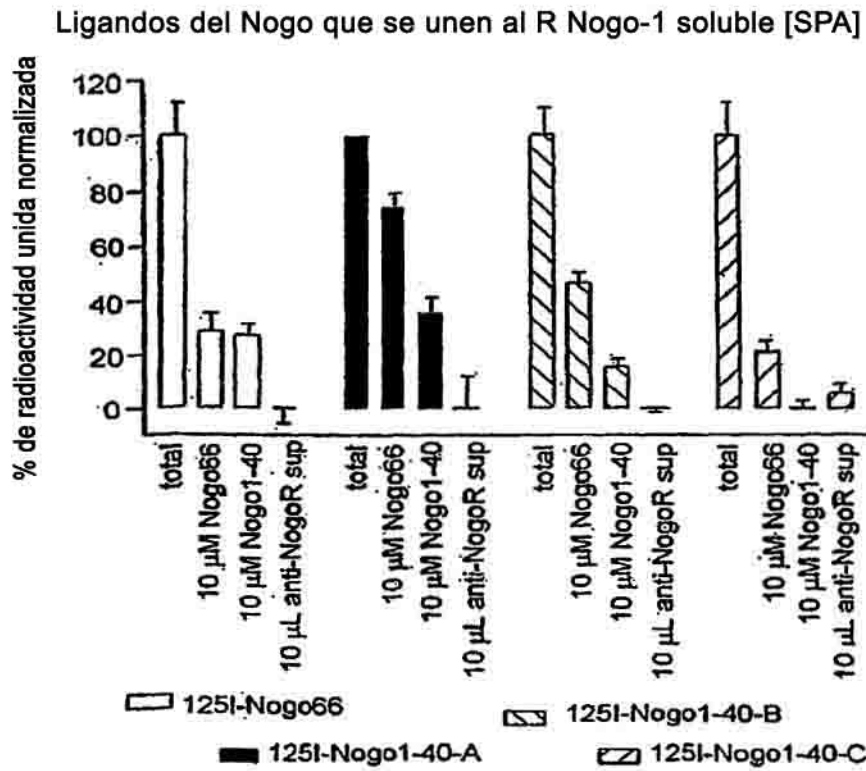


FIG. 6A

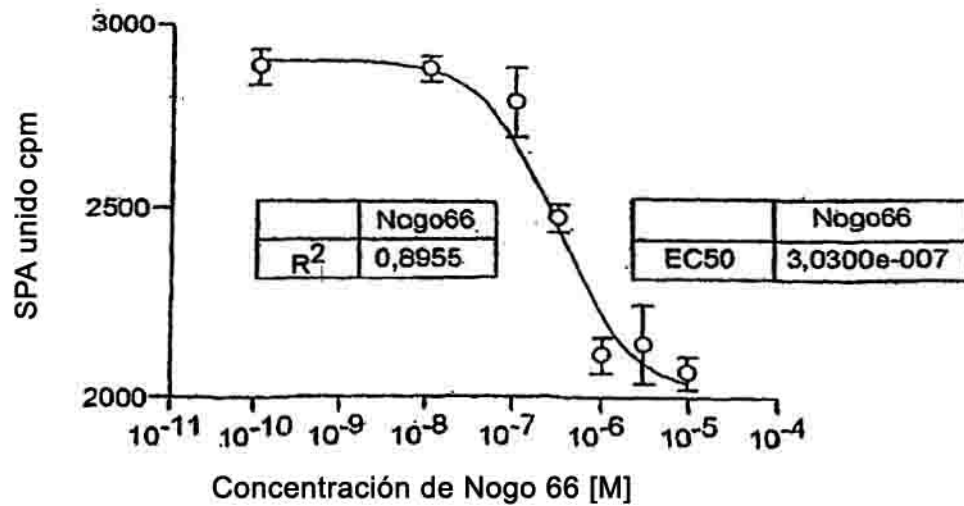


FIG. 6B

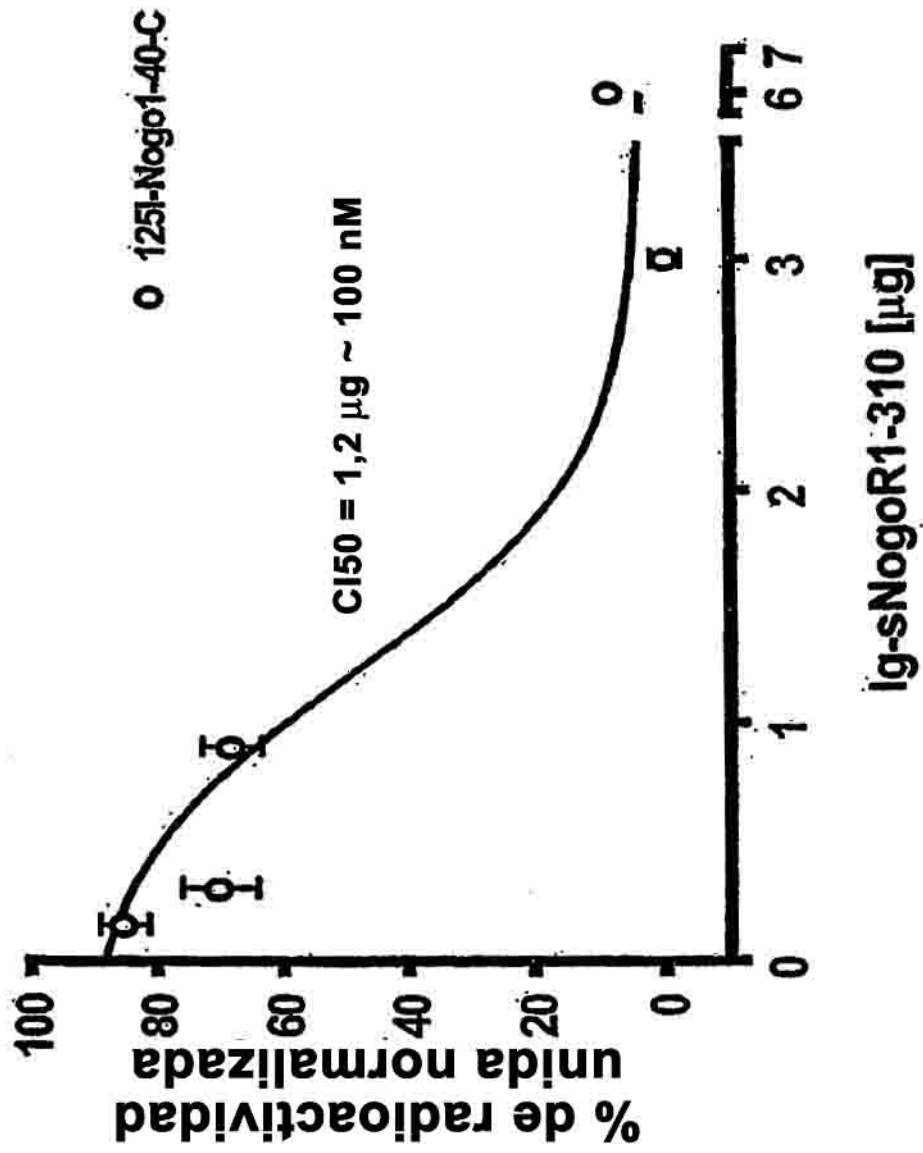


FIG. 7

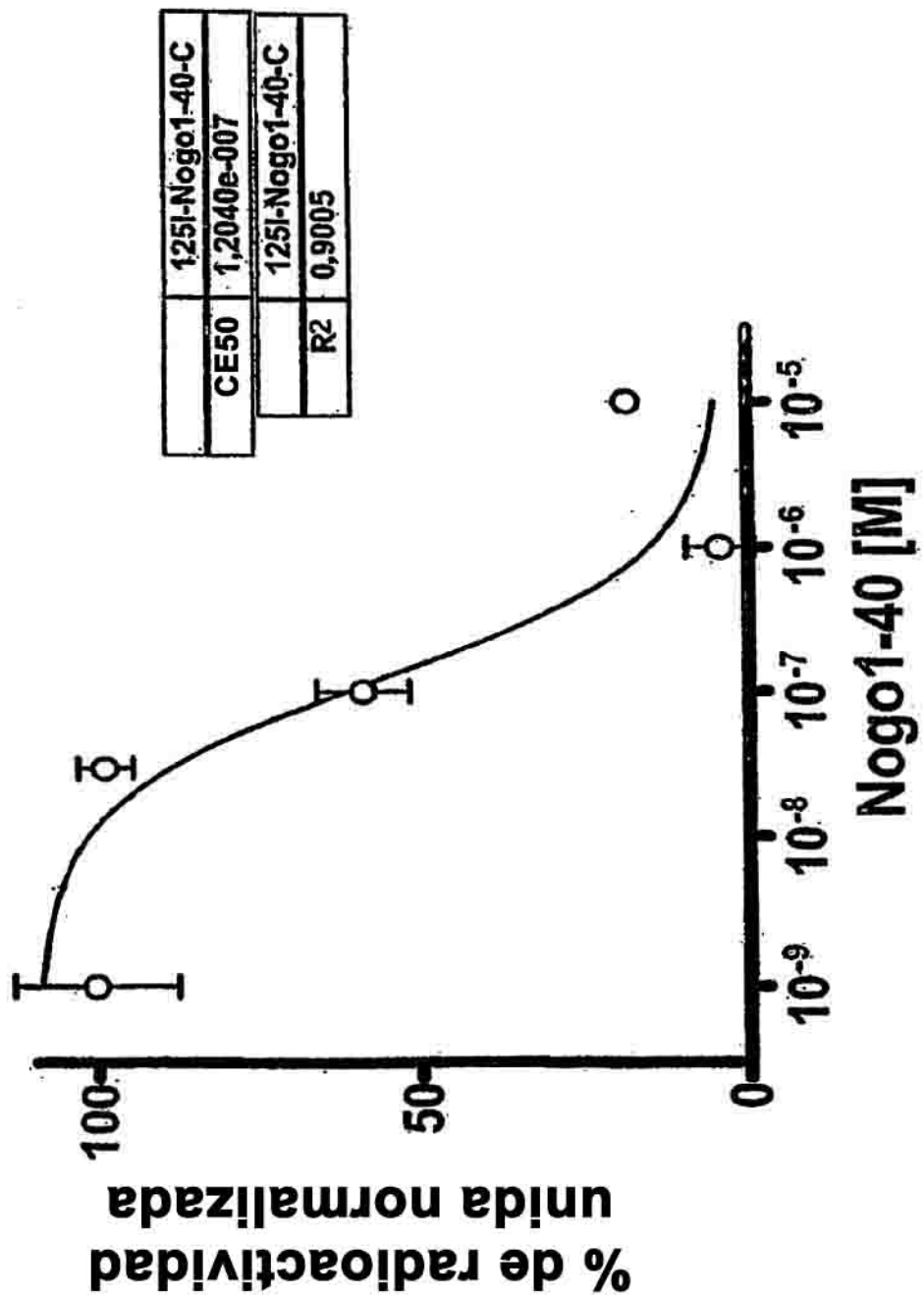


FIG.8

Portas 211: efectos del NgR310 soluble sobre el crecimiento de las neuritas de los DRG, 1,5 μ g

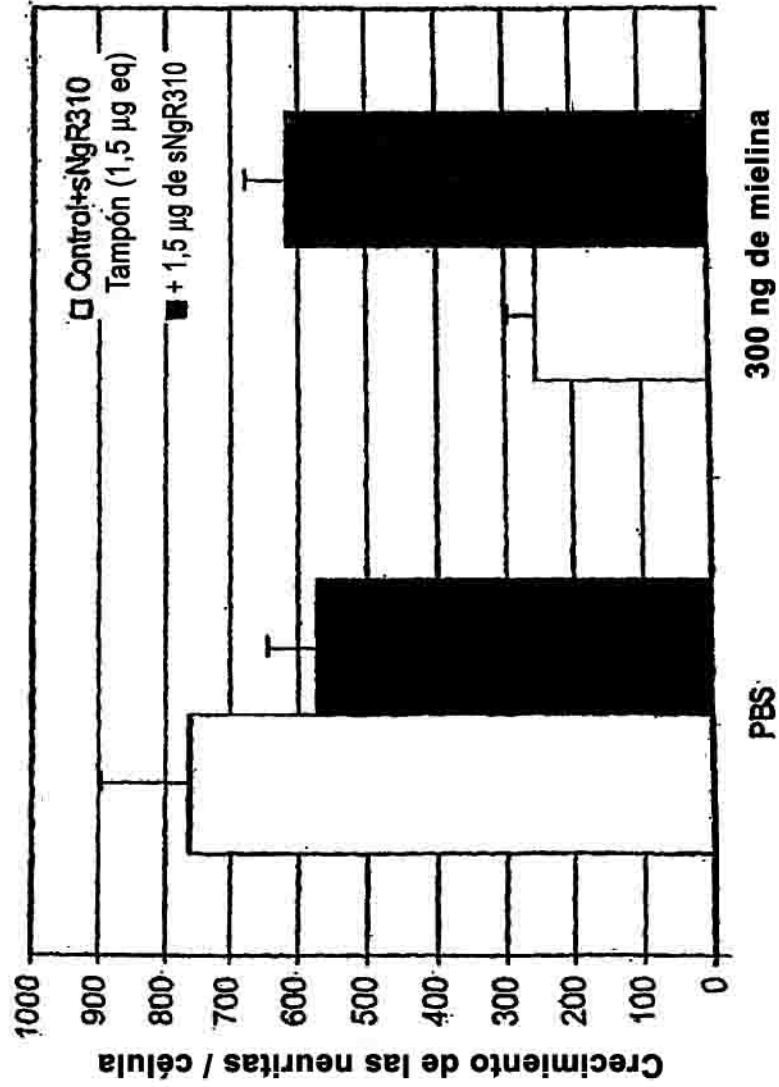


FIG. 9A

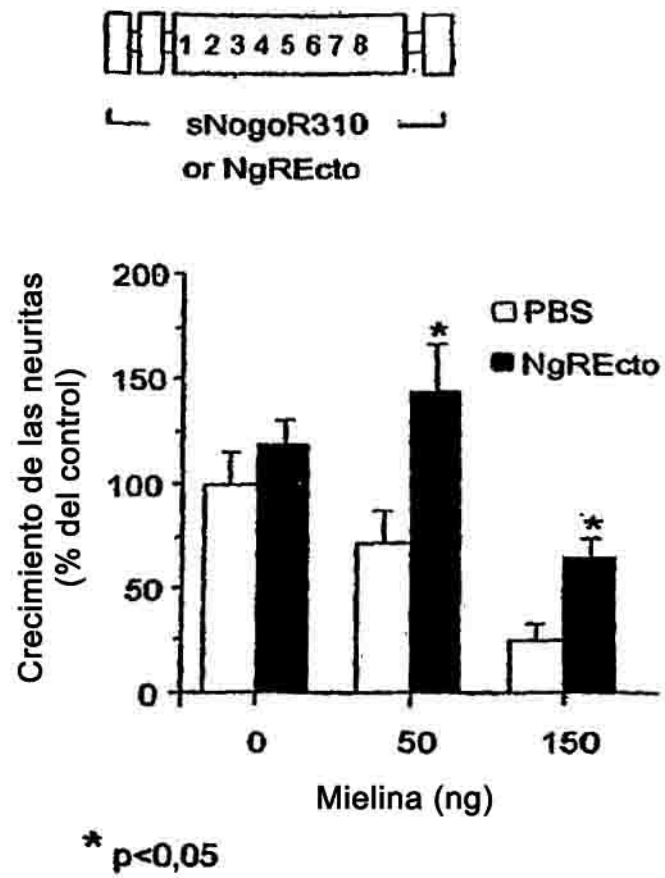


FIG. 9B

Portas 494, efectos del Ig-NgR 1 - 310 soluble sobre el crecimiento de las neuritas de los DRG (n = 6)

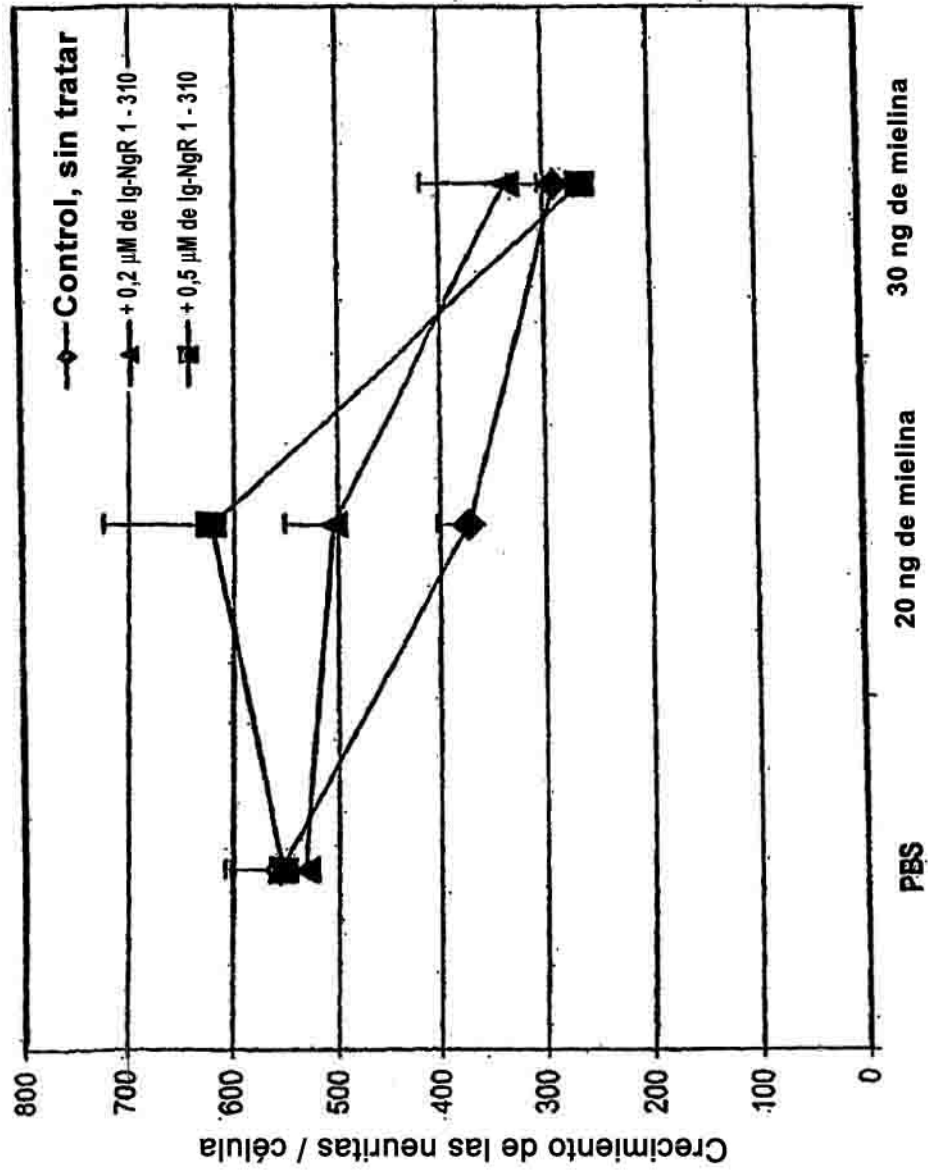


FIG. 10A

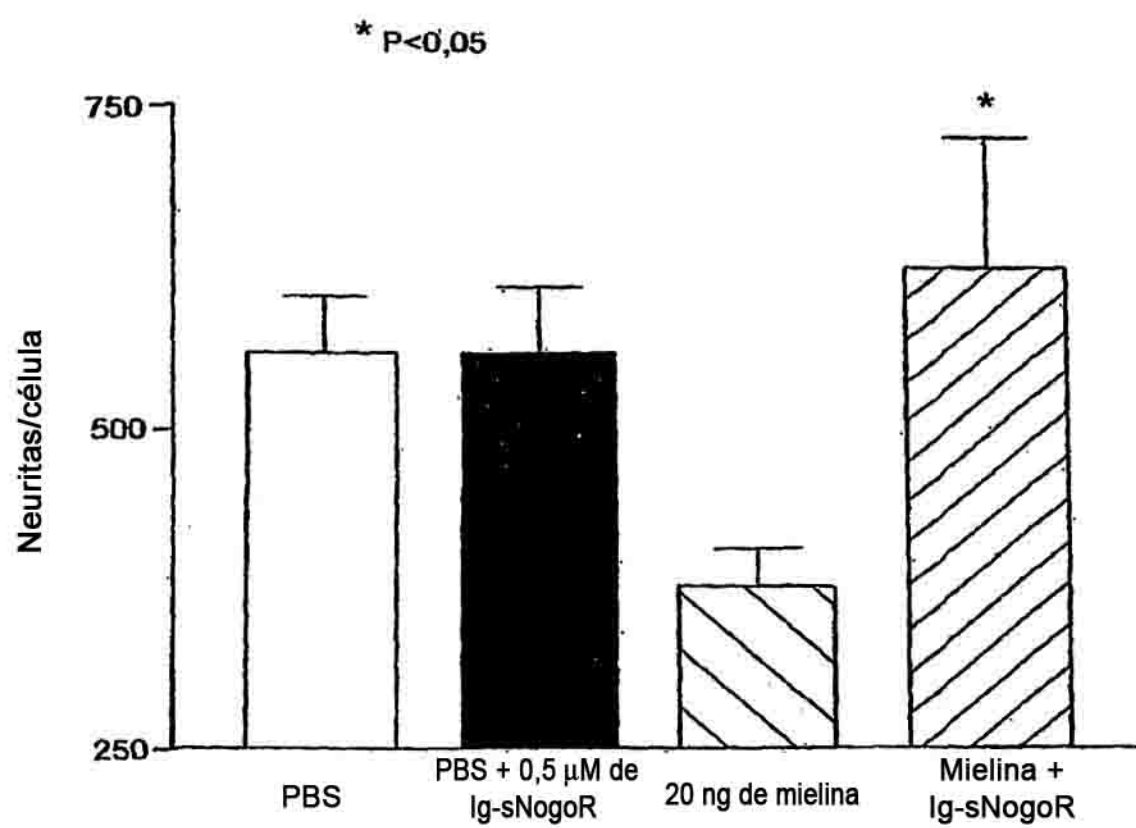


FIG. 10B

El anticuerpo monoclonal anti-R Nogo, el 5B10, protege el crecimiento de las neuritas de los DRG de la inhibición por parte de la mielina

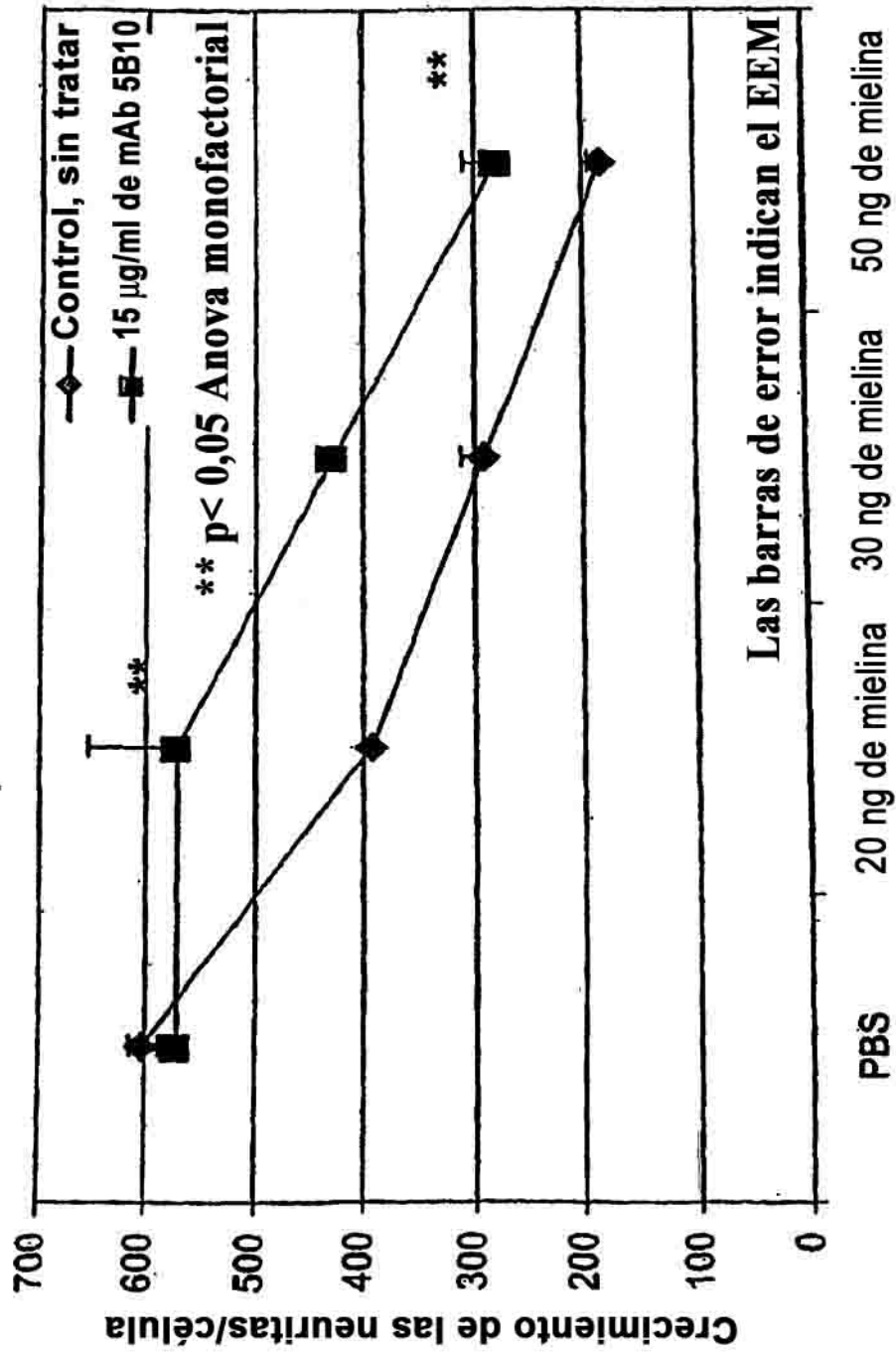


FIG.11

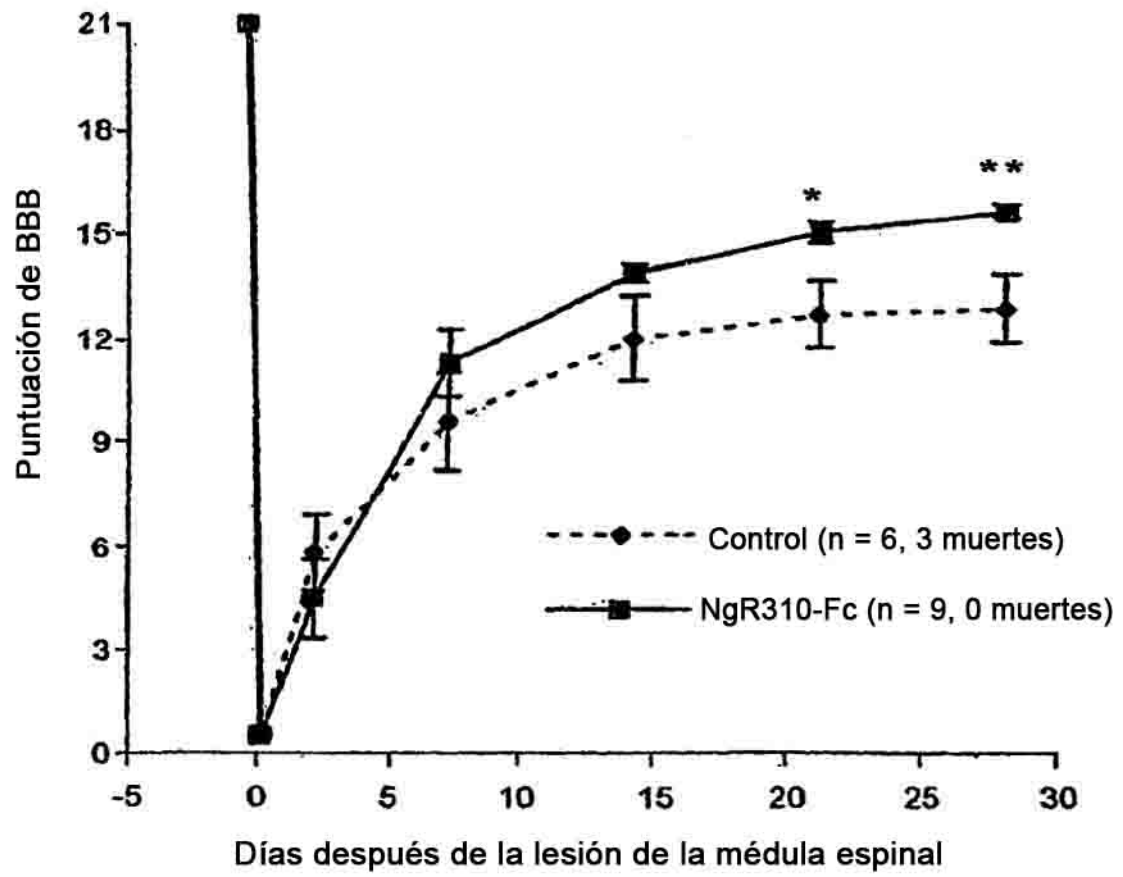


FIG. 12

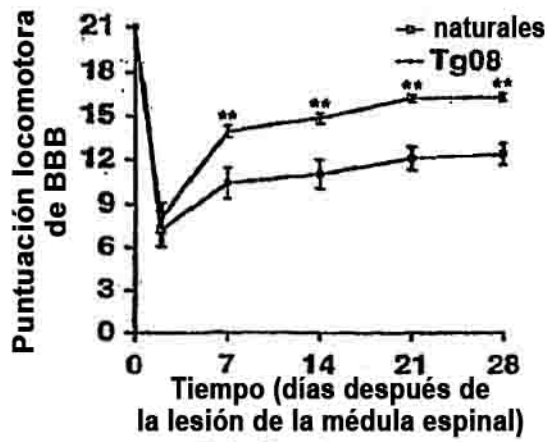


FIG. 13A

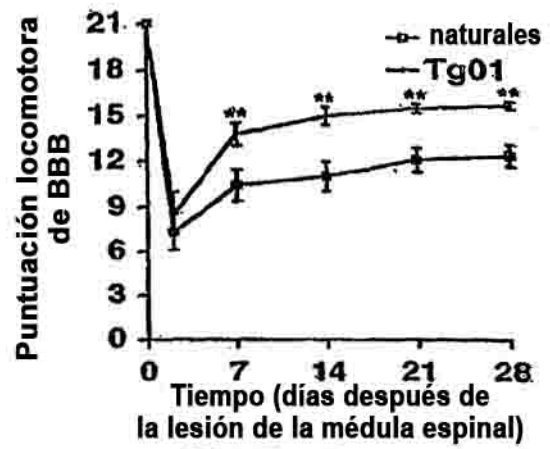


FIG. 13B

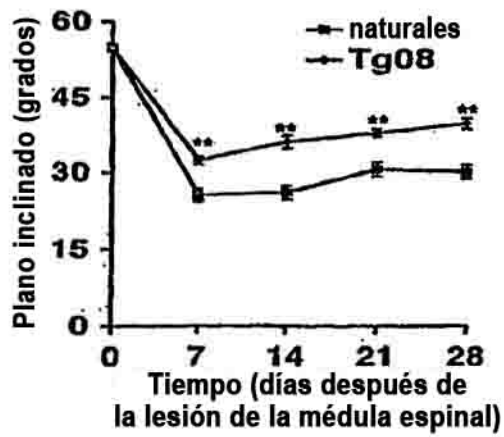


FIG. 13C

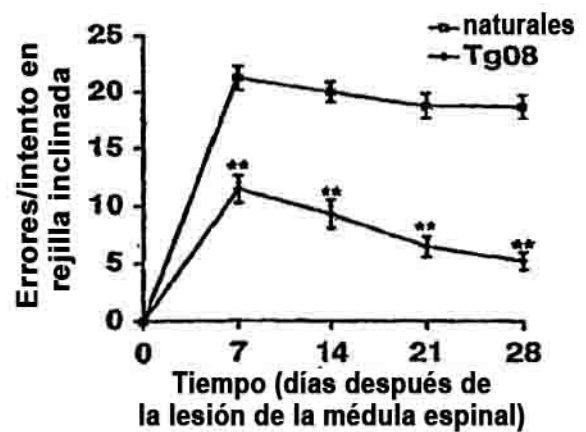


FIG. 13D

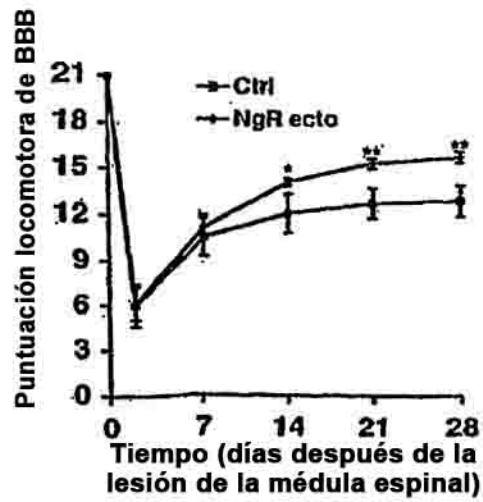


FIG. 14A

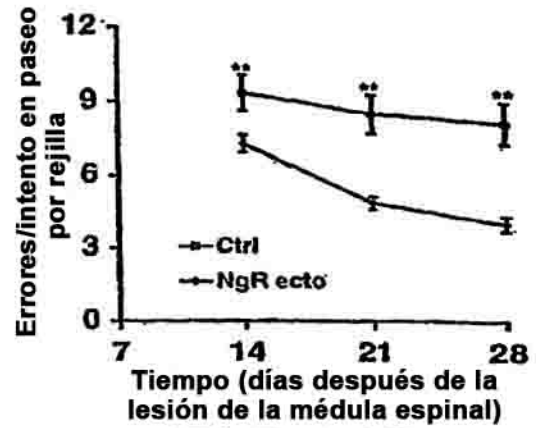


FIG. 14B

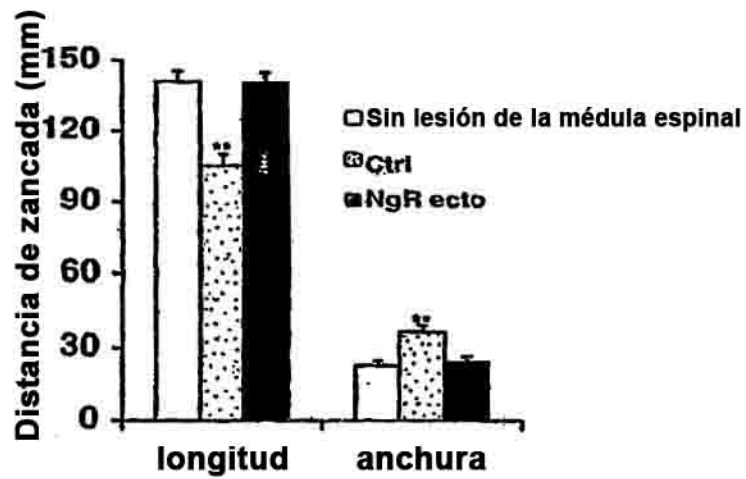


FIG. 14C

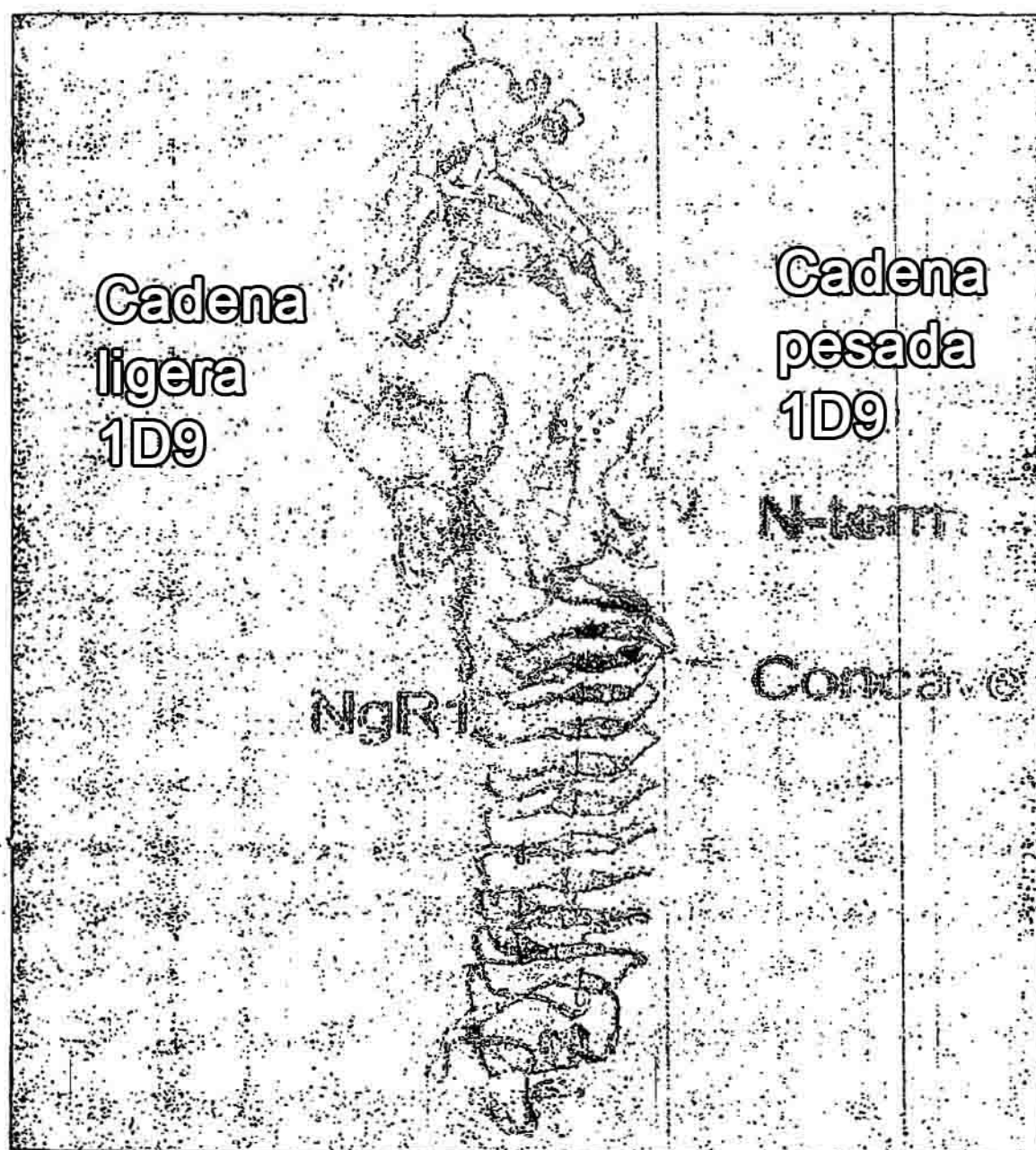


FIG. 15


```

nogo1
top
accgatgaagaggcgccgcttctctagagaagcggacgccctctctcttttg
bot
gatcaaaaaagatgaagaggcgccgcttctctagaaaaagcggacgccctctcat

nogo2
top
accgggcccggctgcagaagtctctctagagaactctgcagccagggcccttttg
bot
gatcaaaaaaggccggctgcagaagtctctctagaaaaactctgcagccagggcc

nogo3
top
accgactgggacitcagaaggctctctagagagccctctgagtcaccagcttttg
bot
gatcaaaaaagactgggactcagaaggctctctctagaaagcctctgagtcaccagt

nogo2m
top
accgggcccggcaccagaagtctctctagagaactctctggcagggcccttttg
bot
gatcaaaaaaggccggcaccagaagtctctctagaaaaactctctggcagggcc

```

Fig. 16B

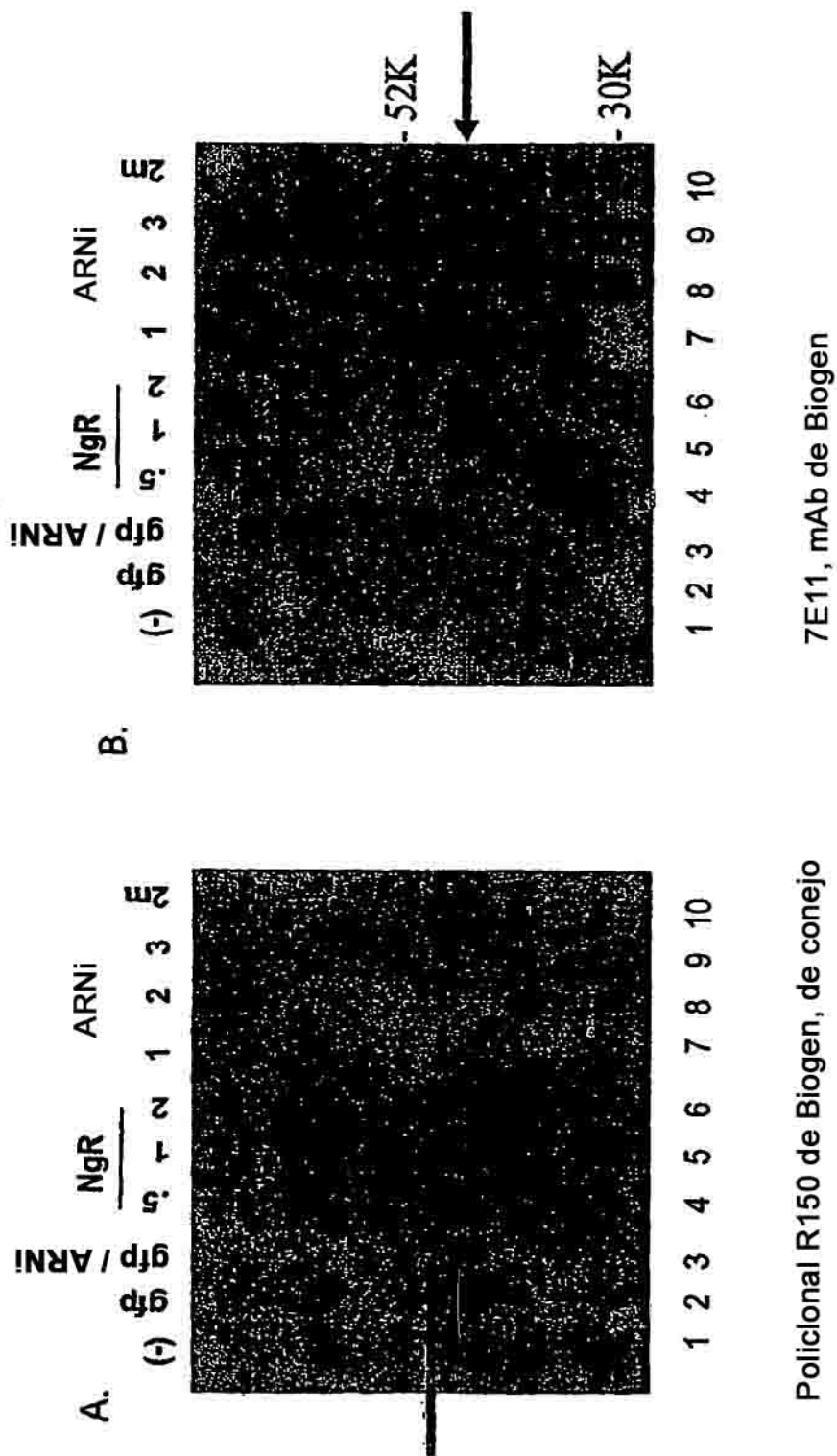


Fig. 17

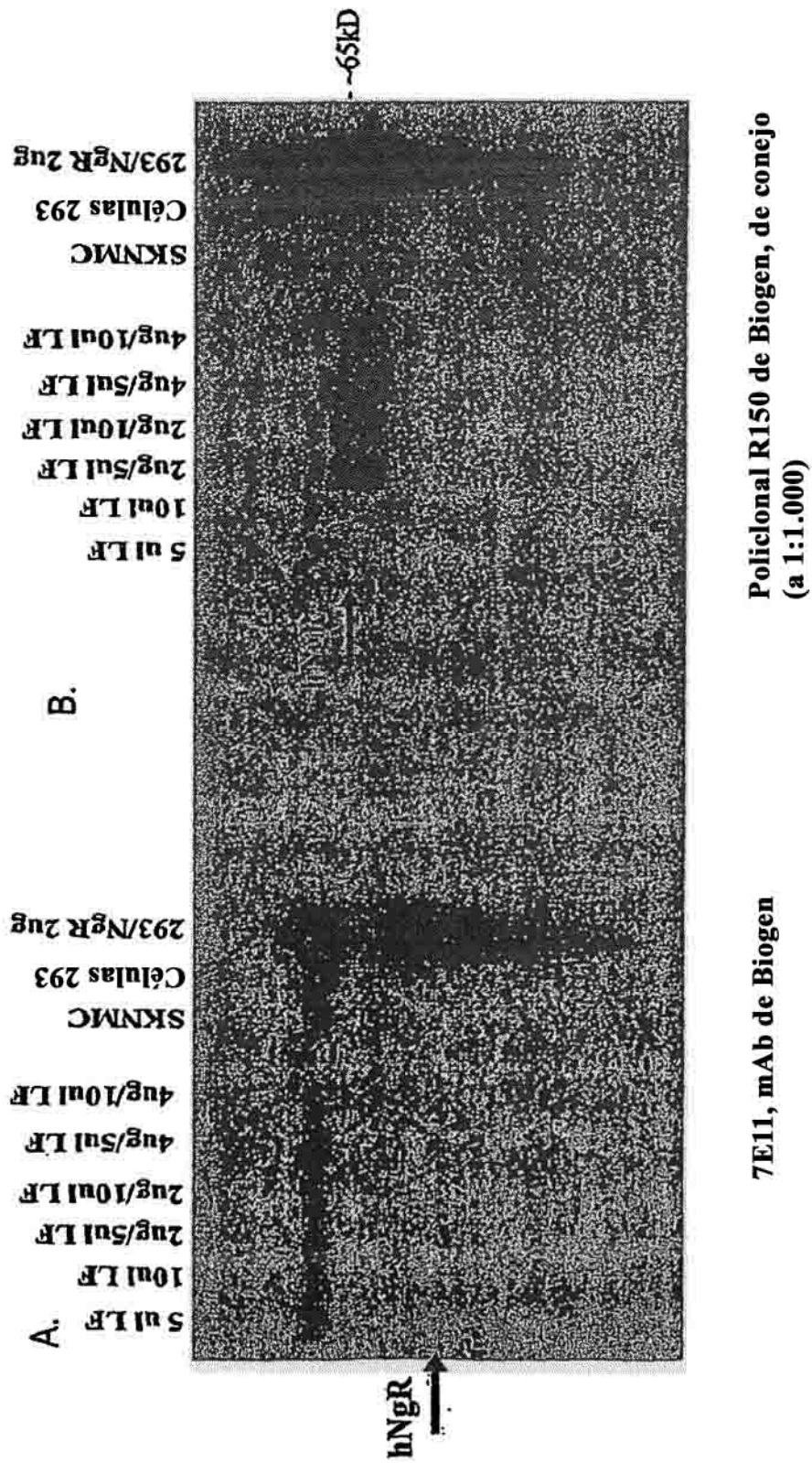


Fig. 18

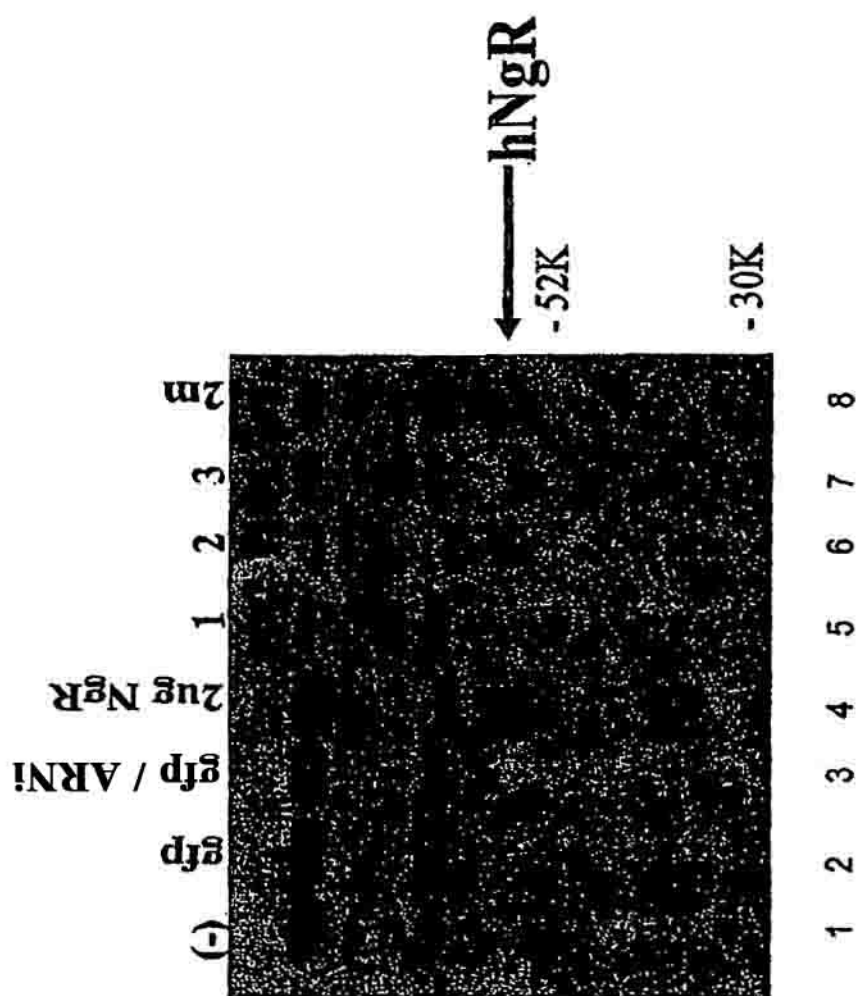


Fig. 19

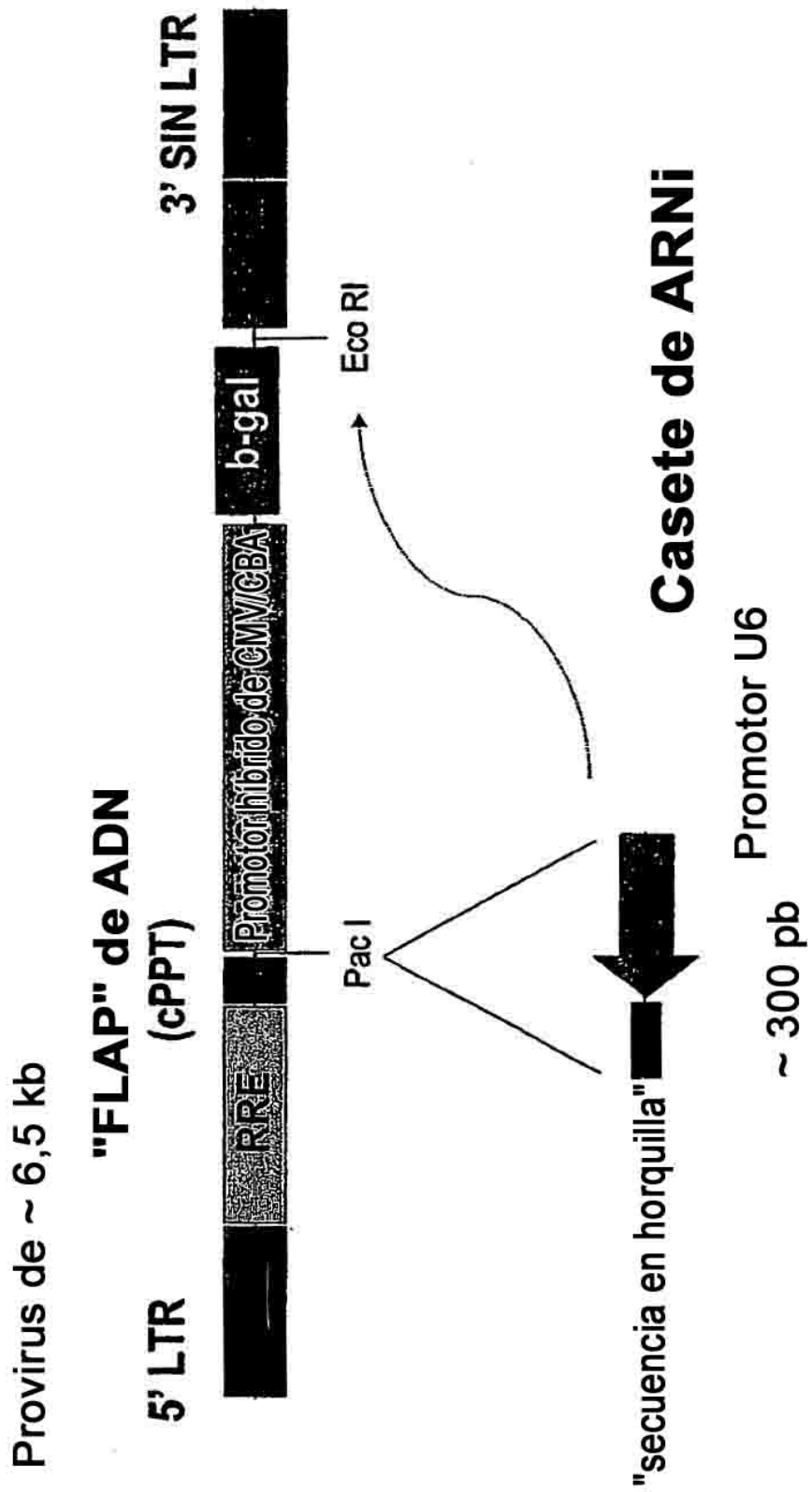


Fig. 20

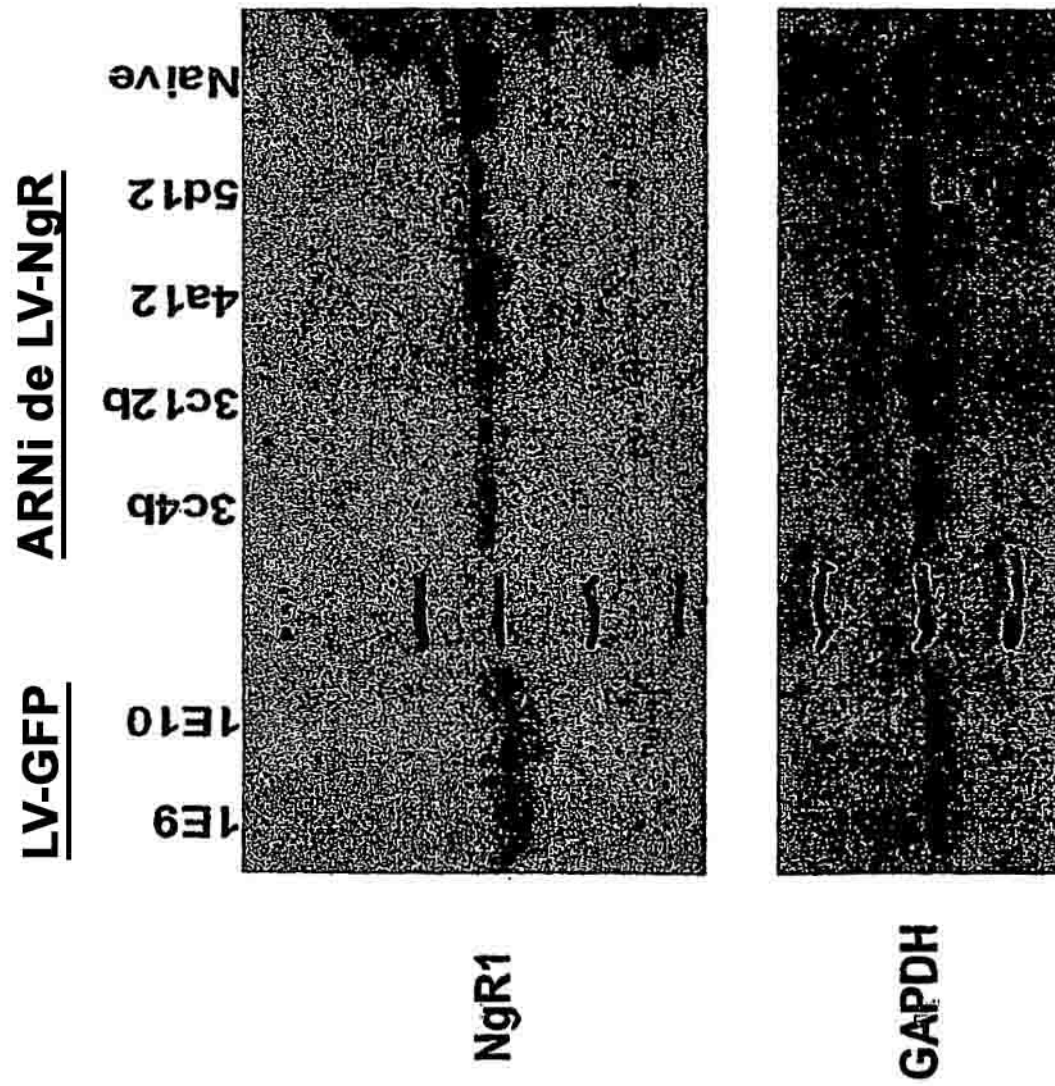


Fig. 21

NogoR1 objetivo

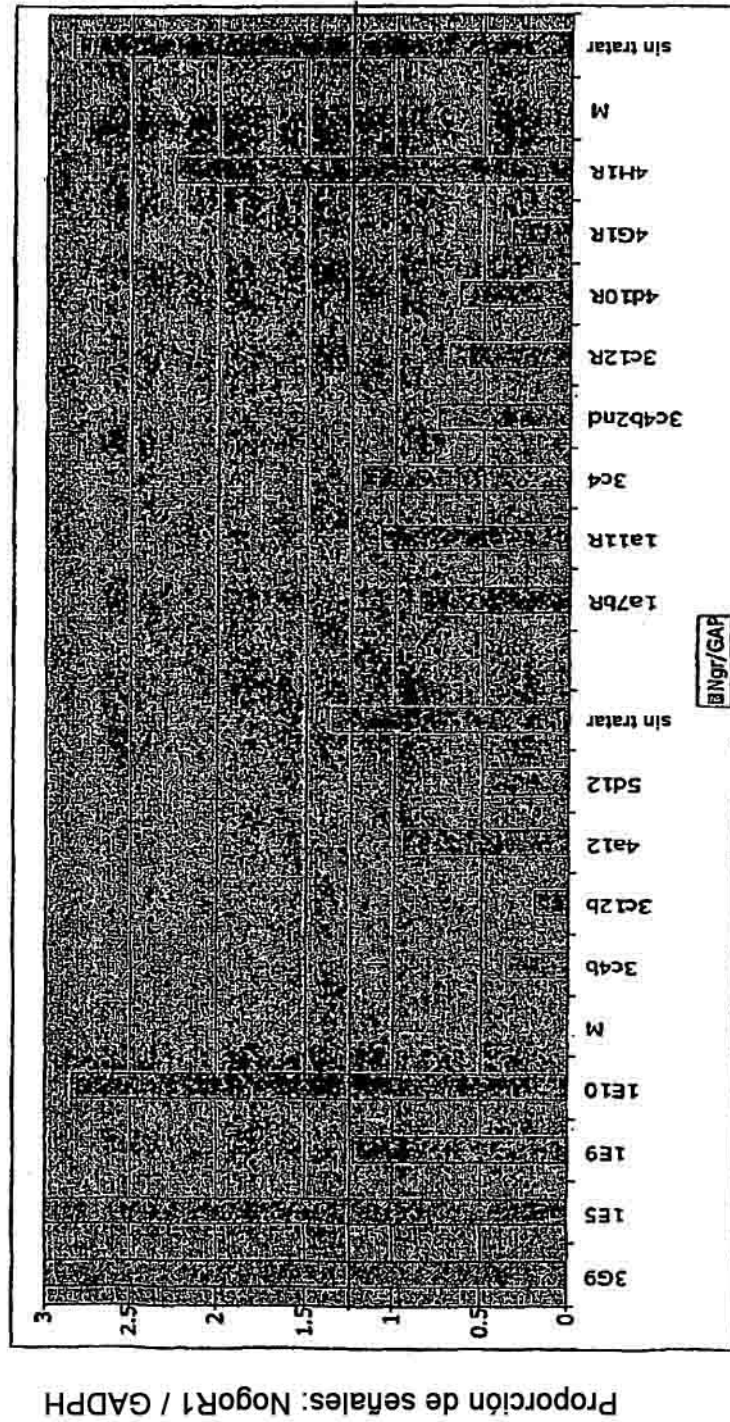
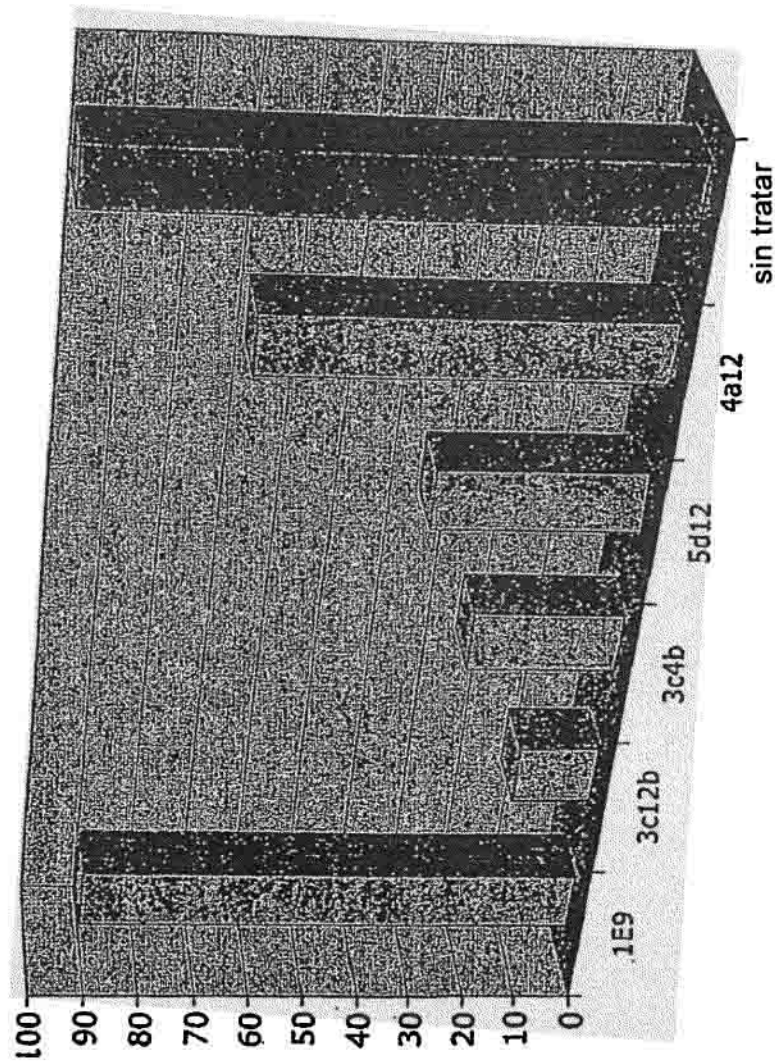


Fig. 22



**Anticuerpo 7E11 contra el receptor Nogo 1 de rata,
% de señal sin tratar en la inmunotransferencia western,
normalizada al GAPDH**

Fig. 23

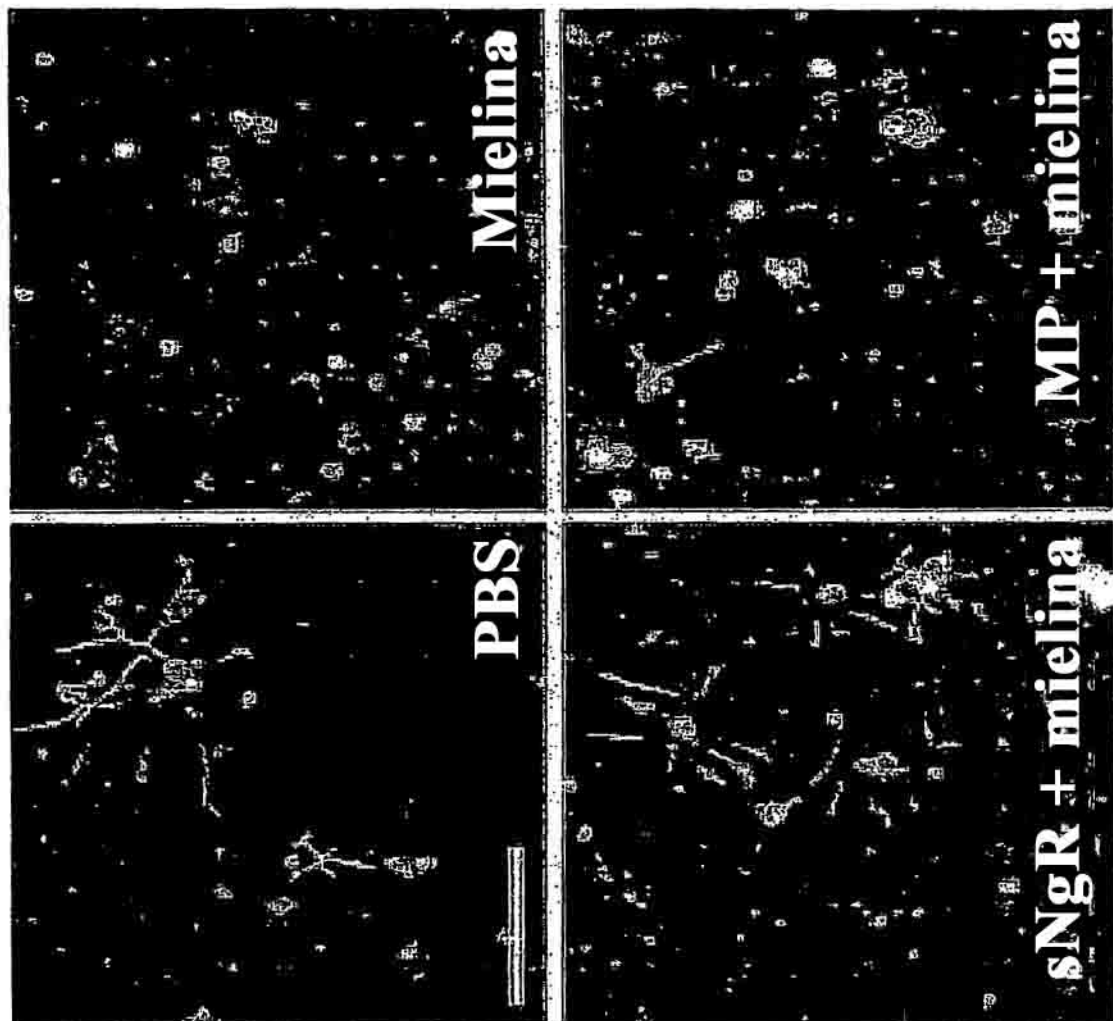


FIG. 24-A

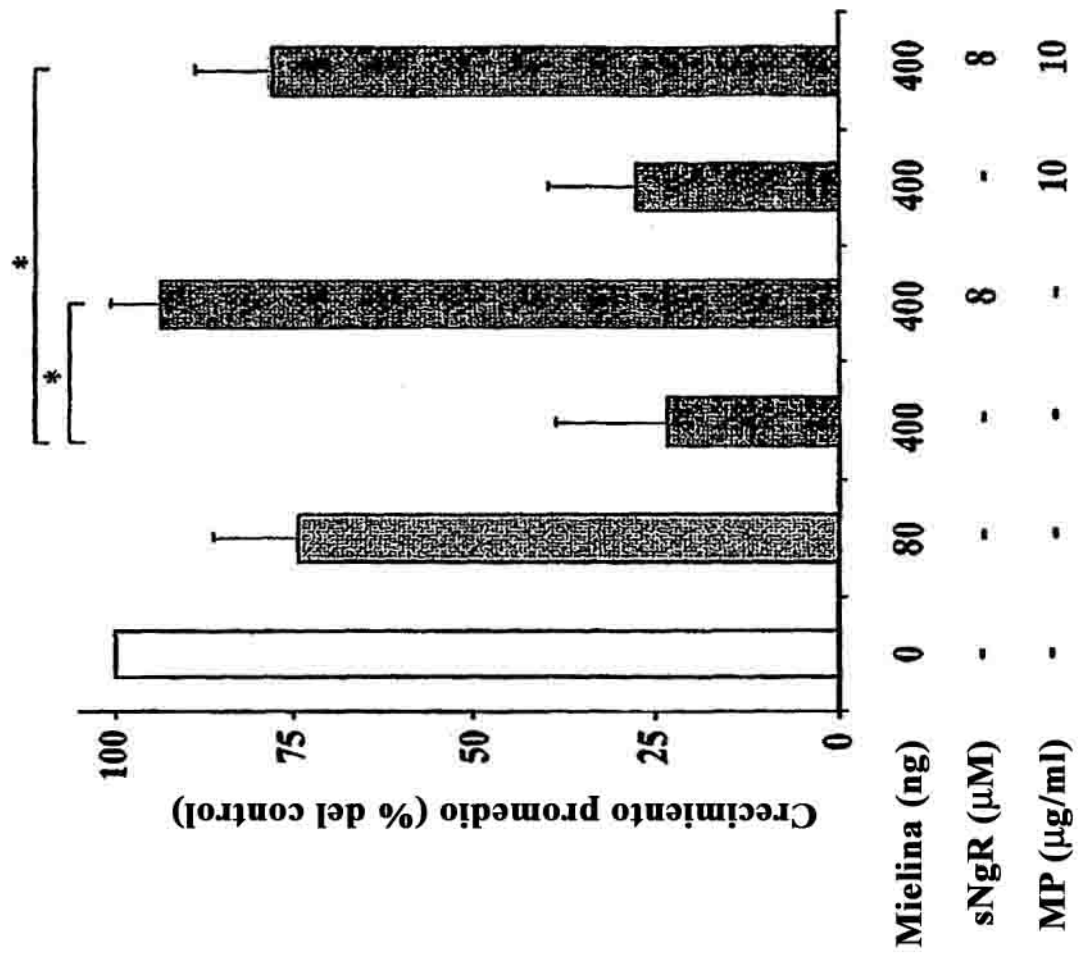
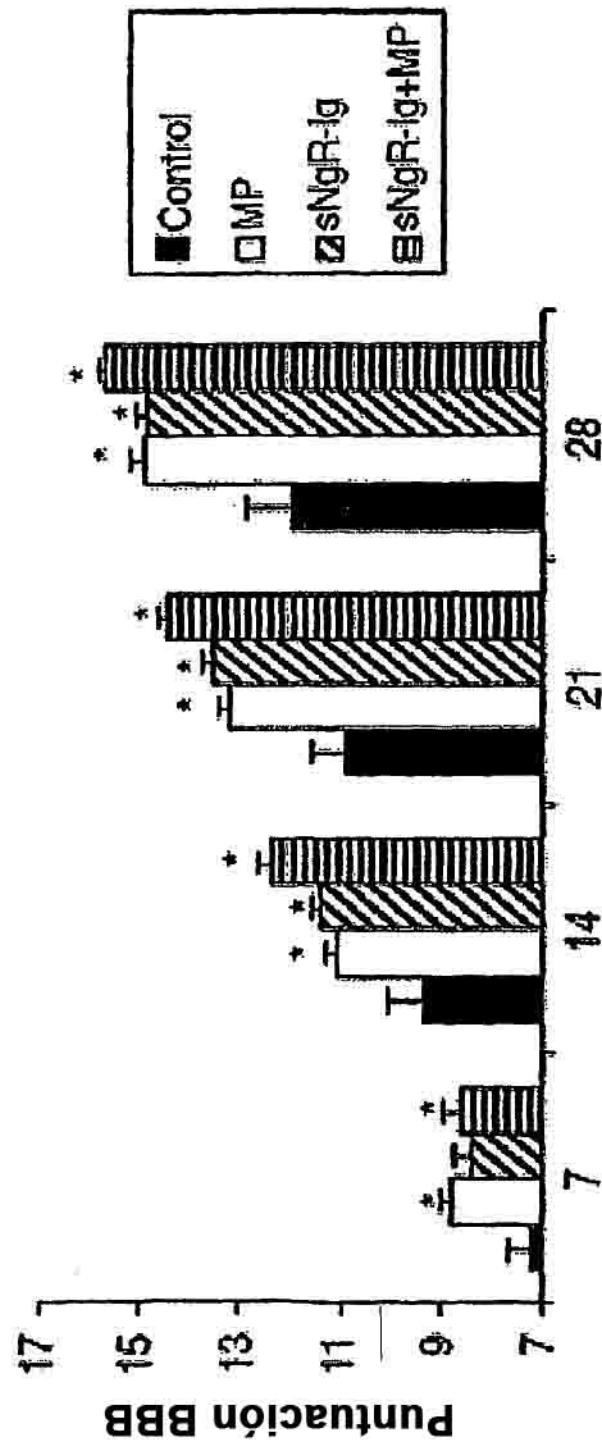


FIG. 24-B



Días después de la lesión de la médula espinal

FIG. 25-A

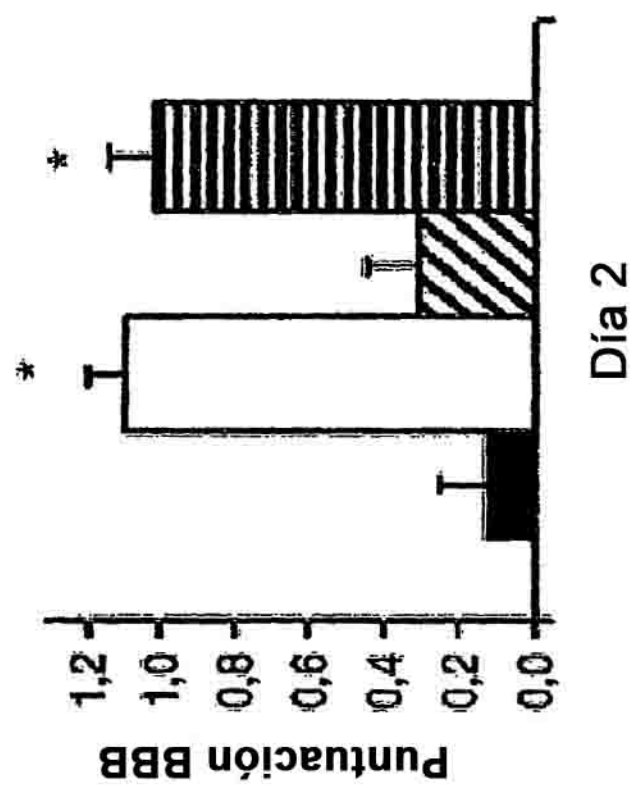
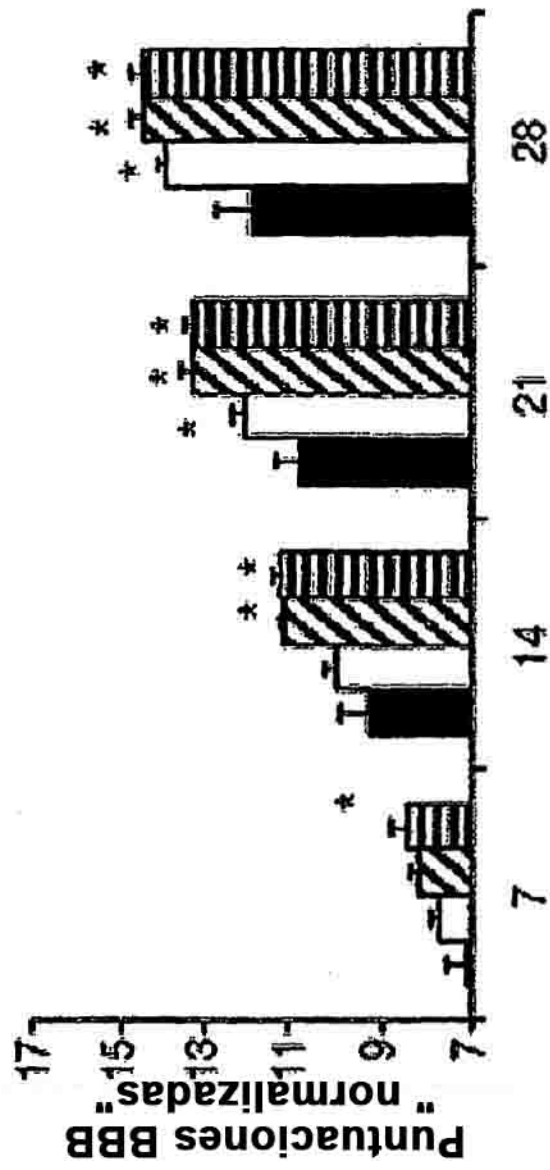


FIG. 25-B



Días después de la lesión de la médula espinal

FIG. 25-C