

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 832**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2010 E 10794938 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2510001**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra la proteína RGM para su uso en el tratamiento de la degeneración de la capa de fibra nerviosa de la retina**

30 Prioridad:

08.12.2009 US 267446 P

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

08.03.2016

73 Titular/es:

**ABBVIE DEUTSCHLAND GMBH & CO KG
(100.0%)
Max-Planck-Ring 2a
65205 Wiesbaden, DE**

72 Inventor/es:

MÜLLER, BERNHARD K.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 562 832 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales contra la proteína RGM para su uso en el tratamiento de la degeneración de la capa de fibra nerviosa de la retina.

5

Campo de la invención

La presente solicitud describe proteínas de unión a RGM, concretamente anticuerpos monoclonales, y, en particular versiones humanizadas, injertadas con CDR, de las mismas, que tienen la capacidad de unirse a RGM A y evitar la unión de las proteínas RGM al receptor de RGM A y otras proteínas de unión a RGM, y por lo tanto, neutralizar la función de RGM A, para su uso en el tratamiento de la degeneración de la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR), así como métodos para tratar terapéutica o profilácticamente un mamífero contra la degeneración de la CFNR.

15 **Antecedentes de la invención**

La regeneración axonal después de la lesión, los ataques inflamatorios, o las enfermedades neurodegenerativas dentro del sistema nervioso central de los mamíferos (SNC) es casi siempre imposible; el resultado depende del equilibrio entre la capacidad intrínseca de las fibras nerviosas del SNC para volver a crecer, y los factores inhibidores en el SNC, localizados en el microentorno de la zona de la lesión o daño, que impiden activamente el re-crecimiento, y por lo tanto, la regeneración de los tractos de fibras lesionadas.

Se ha establecido que la mielina del SNC, generada por los oligodendrocitos, y la cicatriz lesional son las estructuras no permisivas más relevantes para el crecimiento axonal en la fase temprana de una lesión, al causar el colapso del cono de crecimiento y la inhibición del crecimiento de neuritas *in vitro*, así como *in vivo*, lo que da como resultado la inhibición directa de la regeneración del axón. Se han identificado las proteínas RGM, los principales factores inhibitorios de la mielina del SNC y el tejido de la cicatriz (Monnier et al., *Nature* 419: 392-395, 2002; Schwab et al., *Arch. Neurol.* 62: 1561-8, 2005a; Schwab et al. *Eur. J. Neurosci.* 21: 1569-1576, 2005 b; Hata et al. *J. Cell Biol.* 173: 47-58, 2006; para las revisiones véanse: Mueller et al., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361: 1513-1529, 2006; Yamashita et al. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17: 29-34, 2007). Las proteínas RGM son reguladas al alza en los sitios de daño o lesión en los seres humanos que mueren por trauma cerebral o ataque isquémico, (Schwab et al., *Arch. Neurol.* 62: 1561-8, 2005a) y están reguladas al alza en los sitios de lesión en ratas con lesión de la médula espinal (Schwab et al. *Eur. J. Neurosci.* 21: 1569-76, 2005 b; Hata et al. *J. Cell Biol.* 173: 47-58, 2006 para una revisión véanse: Mueller et al., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361: 1513-1529, 2006; Yamashita et al. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17: 29-34, 2007). Además, los primeros datos utilizando muestras clínicas de pacientes con esclerosis múltiple y de personas sanas sugirieron que la RGM A humana está regulada al alza en el líquido cefalorraquídeo de pacientes que padecen ES (datos no mostrados).

Para evaluar el potencial de promoción de la regeneración de un anticuerpo policlonal específico de RGM A, los anticuerpos se administraron en un modelo de lesión moderada a grave de la médula espinal, donde se secciona aproximadamente 60% de la médula espinal a nivel torácico 9/10. El examen histológico reveló que tal lesión cortaba todas las fibras dorsales y laterales del tracto corticoespinal. El anticuerpo específico de RGM A administrado a nivel local a través de una bomba durante dos semanas induce la regeneración a larga distancia de las fibras nerviosas dañadas (Hata et al., *J. Cell Biol.* 173: 47-58, 2006).

Cientos de fibras nerviosas se extendían más allá del sitio de la lesión y las fibras más largas se regeneraban más de 10 mm más allá de la lesión, mientras que no se encontraron fibras en regeneración lejos de la lesión en los animales tratados con anticuerpo de control. La recuperación funcional de las ratas tratadas con anti-RGM mejoró significativamente en comparación con las ratas con la médula espinal dañada, tratadas con anticuerpo de control, demostrando con ello que RGM A es un potente inhibidor de la neuroregeneración y un objetivo valioso para estimular la recuperación en indicaciones que se caracterizan por daño axonal o lesión de fibras nerviosas (Hata et al., *J. Cell Biol.* 173: 47-58, 2006; Kyoto et al. *Brain Res.* 1186: 74-86, 2007). Además la neutralización de la proteína RGM A con un anticuerpo policlonal de bloqueo de función estimuló no sólo el nuevo crecimiento de las fibras nerviosas dañadas en las ratas con lesión de la médula espinal si no que mejoró su formación de sinapsis permitiendo de este modo la nueva formación o la restauración de los circuitos neuronales dañados (Kyoto et al. *Brain Res.* 1186: 74-86, 2007).

La familia de genes *rgm* abarca tres genes diferentes, dos de ellos, *rgm a* y *b*, se expresan en el SNC de mamíferos originando las proteínas RGM A y RGM B, mientras que el tercer miembro, *rgm c*, se expresa en la periferia (Mueller et al., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361:1513-1529, 2006), donde RGM C juega un papel importante en el metabolismo del hierro. *In vitro*, RGM A inhibe el crecimiento de neuritas mediante la unión a Neogenina, que ha sido identificada como un receptor de RGM (Rajagopalan et al. *Nat Cell Biol.*: 6(8), 756-62, 2004). La neogenina había sido descrita por primera vez como una proteína de unión a netrina (Keino-Masu et al. *Cell*, 87(2): 175-85, 1996). Este es un hallazgo importante ya que se ha referido que la unión de Netrina-1 a Neogenina o a su receptor

60

estrechamente relacionado DCC (suprimido en el cáncer colorrectal) estimula en lugar de inhibir el crecimiento de las neuritas (Braisted et al. *J. Neurosci.* 20: 5792-801, 2.000). Por lo tanto, el bloqueo de RGM A libera la inhibición del crecimiento mediada por RGM permitiendo que la Neogenina se una a su ligando estimulador del crecimiento de neuritas Netrina. Basándose en estas observaciones, se puede suponer que la neutralización de RGM A es superior a la neutralización de Neogenina en modelos de lesión de la médula espinal humana. Además de la unión de RGM A a Neogenina y de la inducción de la inhibición del crecimiento de neuritas, la unión de RGM A o B a las proteínas morfogenéticas del hueso BMP-2 y BMP-4 podría representar otro obstáculo para la neuroregeneración satisfactoria y la recuperación funcional (Mueller et al., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361:1513-1529, 2006).

La CFNR es la capa más interna de la retina y se compone principalmente de los axones de las neuronas de las células ganglionares que componen el nervio óptico. Los axones dentro de la CFNR no están mielinizados hasta que pasan a través de la lámina cribosa del ojo. Esta característica estructural de la CFNR hace que sea un tejido ideal para examinar los procesos neurodegenerativos en el SNC debido a que el espesor de la CFNR refleja la contribución de los axones sin potenciales efectos estructurales de la degeneración de la mielina (Frohman et al., *Arch. Neurol.* 65(1): 26-35, 2008) (Véase, también la Figura 19).

Frisén, L. y Hoyl, W.F. informaron por primera vez del adelgazamiento de la CFNR en pacientes con Esclerosis Múltiple (EM) (Frisén, L. y Hoyl, W. F., *Arch. Ophthalmol.* 92:91-97, 1974).

En individuos sanos, la CFNR tiene sólo aproximadamente de 110 a 120 m de espesor a la edad de 15 años y la mayoría de los individuos normales perderán aproximadamente 0,017% por año en el espesor de la retina lo que equivale a aproximadamente 10 a 20 micras a lo largo de 60 años (Kanamori. A. et al., *Ophthalmologica* 217: 273-278, 2003). Contrariamente a esto aproximadamente 75% de los pacientes con EM que habían experimentado la neuritis óptica aguda (NOA) mostraron una pérdida de espesor de 10 a 40 micras en la CFNR en un plazo de sólo aproximadamente 3-6 meses después del evento inflamatorio inicial. También se informa de que el adelgazamiento de la CFNR por debajo de un nivel de aproximadamente 75 micras causa un deterioro de la función visual (Costello, et al., *Ann. Neurol.* 59: 963-969, 2006). La utilidad potencial de la CFNR con el propósito de modelar la neuroprotección en respuesta a las terapias de la EM fue sugerida por Frohman et al., que también describen la tomografía de coherencia óptica (TCO) como una técnica de formación de imágenes reproducible que permite mediciones de espesor de la CFNR (Frohman et al., véase más arriba; y Frohman et al; *Nature Clinical Practice Neurology* 4: 12, 664-675, 2008).

La degeneración de la CFNR se observa también durante el transcurso de muchas otras enfermedades como; retinopatía diabética, neuropatía óptica isquémica, retinosquiasis ligada al cromosoma X, neuropatía óptica inducida por fármacos, distrofia retiniana, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedades oculares caracterizadas drusen en la cabeza del nervio óptico, enfermedades oculares caracterizadas por determinantes genéticos de la degeneración de los fotorreceptores, distrofia de conos-varillas autosómica recesiva, trastornos mitocondriales con neuropatía óptica, ataxia de Friedreich i.p., enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve (DCL) por enfermedad Parkinson, y enfermedades Priónicas, Creutzfeld-Jacob i.p. Scrapie, Encefalopatía Espongiforme Bovina (véase también Sakata LM, et al. *Clin. Experiment Ophthalmol.* 2009, 37: 90-99; Morris RW et al. *Optometry* 2009, 80, 83-100; Kallenbach K. y Frederiksen J. *Eur. J. Neurol.* 2007, 14: 841-849; Trick et al. *J. Neuroophthalmol.* 2006, 26: 284-295; Tantri A. et al. *Surv. Ophthalmol.* 49: 214-230).

Gheith Moataz E et al: "Managing refractory glaucoma with a fixed combination of bimatoprost (0,03%) y timolol (0,5%).", *CLINICAL OPHTHALMOLOGY* (Auckland, N.Z.) Mar 2008 LNKD-PUBMED: 19668385, vol. 2, núm. 1, Marzo de 2008 (2008-03), páginas 15-20, describen el tratamiento del glaucoma, una neuropatía progresiva crónica que se caracteriza por la pérdida progresiva de las células ganglionares de la retina que se manifiesta clínicamente con pérdida del tejido de la papila neuroretiniana del disco óptico, defectos en la capa de fibras nerviosas de la retina y déficits en las pruebas de campo visual funcional. Los medicamentos disponibles incluyen antagonistas beta-adrenérgicos, agonistas alfa-adrenérgicos, inhibidores de anhidrasa carbónica, análogos de prostaglandina y mióticos.

El documento WO 2009/106356 A1 (ABBOTT GMBH & CO KG [DE]; ABBOTT LAB [US]; MUELLER BERNHARD K [DE]; SC) 3 de Septiembre de 2009 (3-9-2009) describe anticuerpos monoclonales que se unen a la proteína RGM A. Los anticuerpos inhiben la unión de RGM A a su receptor y/o a co-receptores y se utilizan para la detección de RGM A y para la inhibición de la actividad de RGM A en los trastornos humanos tales como la esclerosis múltiple, el trauma cerebral en mamíferos, la lesión de la médula espinal, el accidente cerebrovascular, las enfermedades neurodegenerativas y la esquizofrenia y la inducción de la remielinización de axones de los nervios ópticos dañados, aplastados en un modelo de rata de lesión del nervio óptico.

Existe la necesidad en la técnica de un enfoque terapéutico que permite el tratamiento directo de la degeneración de CFNR. El problema a resolver por la presente invención era, por lo tanto, proporcionar medios que permitieran el tratamiento directa, en particular, el tratamiento neuroprotector de la degeneración de CFNR como se observa en una multiplicidad de estados de enfermedad.

Compendio de la invención

Una realización de la invención se refiere al tratamiento neuroprotector de la degeneración de CFNR como se observa en una multiplicidad de estados de enfermedad utilizando anticuerpos capaces de unirse a RGM A.

5 Otra realización se refiere al uso de un anticuerpo monoclonal que bloquea RGM A y evita la interacción entre RGM A y su receptor y/o proteínas de unión, es decir, Neogenina y BMP-2, BMP-4, para el tratamiento de la degeneración de RNFL.

10 Otra realización consiste en un método de tratamiento de la degeneración de CFNR, que comprende la etapa de administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad eficaz de una composición que comprende anticuerpos capaces de unirse a RGM A.

Breve descripción de las figuras

15 La **Figura 1A** muestra los anticuerpos monoclonales que se unen a hRGM A en el ensayo ELISA.

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

20 La **Figura 1C** representa los anticuerpos monoclonales que se unen a RGM A de rata expresada en células HEK 293.

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

La **Figura 3** representa la unión de RGM A completa a BMP-4. El MAB 5F9 inhibe la unión del fragmento de hRGM A completo acoplado a Fc (47- 422) a BMP-4.

30 La **Figura 4** representa la unión de un fragmento 0 de RGM A a BMP-4. El MAB 5F9 inhibe la unión del fragmento 0 de hRGM A completo acoplado a fc (47-168) a BMP-4.

35 La **Figura 5** muestra la unión de RGM A completa a BMP-2. El MAB 5F9 inhibe la unión del fragmento hRGM A completo acoplado a fc (47- 422) a BMP-2.

40 La **Figura 6** es una combinación de microfotografías que muestran la neutralización por mAb5F9 de un fragmento de RGM A en un ensayo de crecimiento de neuritas de células Ntera. El MAB 5F9 neutraliza la actividad inhibitoria del crecimiento de un fragmento inhibitor de hRGM A potente, conjugado con fc en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados Ntera humanos. A. Cultivo de control, crecimiento de neuronas Ntera sobre laminina, B. sobre un sustrato de laminina-fragmento de hRGM A (47 - 168), C. - E. sobre un sustrato de laminina-fragmento de hRGM A (47 - 168) en presencia de 0,1 µg/ml de MAB 5F9 (C.), 1 µg/ml de MAB 5F9 (D.), 10 µg/ml de MAB 5F9 (E).

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

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

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

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

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

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

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

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

La **Figura 15** muestra la actividad de remielinización in vivo de la aplicación sistémica de 5F9 en un modelo animal de lesión del nervio óptico. Los animales fueron tratados con 5F9 el día 0 y d21 con 2 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. El anticuerpo o el vehículo se administraron por vía intraperitoneal o intravenosa. Imágenes compuestas de nervios ópticos de rata. La mielinización se visualiza usando un anticuerpo dirigido contra el marcador de mielina proteína básica de mielina MBP. Los sitios de aplastamiento se encuentran en medio de los nervios compuestos y el área está libre en los animales de control tratados con vehículo (A y B). En los animales tratados con 5F9 (C y D), se observan muchas estructuras positivas para MBP en la zona media (centro de aplastamiento) de los nervios ópticos.

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

La **Figura 17** ilustra el efecto protector superior del anticuerpo 5F9 sobre CFNR de ojos de animales con aplastamiento del nervio óptico. Se observa una densidad significativamente mayor de haces de fibras nerviosas en las retinas de los animales tratados sistémicamente con 5F9.

La **Figura 18** ilustra la influencia del anticuerpo 5F9 sobre las neuronas intrarretinianas de ojos de animales con aplastamiento del nervio óptico. Se observa un número significativamente mayor de brotación de neuronas intrarretinianas en retinas de animales tratados sistémicamente con el anticuerpo 5F9.

La **Figura 19** ilustra la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR), que es la capa directamente adyacente al bulbo vítreo. Está formado por los axones de las células ganglionares de la retina. Las otras capas son la capa plexiforme interna (IPL), donde las neuronas amacrinas y bipolares forman contactos sinápticos con las células ganglionares de la retina. Los fotorreceptores, las neuronas horizontales y las neuronas bipolares hacen sinapsis en la capa plexiforme externa (OPL). Los fotorreceptores (conos y bastones) se encuentran en la capa de fotorreceptores (PRL). El RPE es el epitelio pigmentario de la retina (el esquema es de Frohman et al. Arch. Neurol. 65, 26-35, 2008).

Descripción detallada de la invención

1. Definición de términos

A menos que se definan de otro modo en la presente memoria, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que son comúnmente entendidos por los expertos normales en la técnica. El significado y el alcance de los términos deben ser claros, sin embargo, en el caso de

cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en la presente memoria tienen prioridad sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. Adicionalmente, a menos que sea requerido por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" y "incluido", no es limitante. Asimismo, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto los elementos como los componentes que constituyen una unidad y los elementos y los componentes que comprenden más de una subunidad a menos que se especifique lo contrario.

Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritos en la presente memoria son aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se discuten a lo largo de la presente memoria a menos que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y los mecanismos de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes, comúnmente realizadas en la técnica o como se describe en la presente memoria. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio, la química analítica, la química orgánica sintética, y la química medicinal y farmacéutica descritas en la presente memoria son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se utilizan técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, y suministro, y tratamiento de los pacientes.

Según se utiliza en toda esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

Los términos "aceptor" y "anticuerpo aceptor" se refieren al anticuerpo o secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones marco. En algunas realizaciones, el término "aceptor" se refiere a la secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico del anticuerpo que proporciona o que codifica las regiones constantes. En otra realización más, el término "aceptor" se refiere a la secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico del anticuerpo que proporciona o codifica una o más de las regiones marco y las regiones constantes. En una realización específica, el término "aceptor" se refiere a una secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico del anticuerpo humano que proporciona o codifica al menos 80%, particularmente, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98 %, o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones marco. De acuerdo con esta forma de realización, un aceptor puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, por lo menos 4, al menos 5, o al menos 10 residuos de aminoácidos que no existen en una o más posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una región marco aceptora y/o una o varias regiones constantesceptoras pueden, p. ej., derivar u obtenerse de un gen de anticuerpo de la línea germinal, un gen de anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (p. ej., anticuerpos bien conocidos en la técnica, anticuerpos en desarrollo, o anticuerpos disponibles comercialmente).

El término "anticuerpo", según se utiliza en la presente memoria, se refiere en términos generales a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento, mutante, variante, o derivación funcional del mismo, que conserva las características de unión a epitopos esenciales de una molécula de Ig. Semejantes formatos de anticuerpos mutantes, variantes, o derivados son conocidos en la técnica. Las realizaciones no limitantes de los cuales se discuten a continuación. Se dice que un anticuerpo es "capaz de unirse" una molécula si es capaz de reaccionar específicamente con la molécula para unir de ese modo la molécula al anticuerpo.

El término "producto conjugado de anticuerpo" se refiere a una proteína de unión, tal como un anticuerpo, químicamente ligado a un segundo radical químico, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término "agente" se refiere a un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto hecho de materiales biológicos. Concretamente los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, la toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracino diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

El término "constructo de anticuerpo" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un polipéptido que comprende una o más porciones de unión a antígeno de la invención unida a un polipéptido conector o un dominio constante de inmunoglobulina. Los polipéptidos conectores comprenden dos o más residuos de aminoácido unidos por enlaces peptídicos y se utilizan para conectar una o más porciones de unión a antígeno. Tales polipéptidos conectores son bien conocidos en la técnica (véase p. ej., Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2: 1121/23). Un dominio constante de inmunoglobulina se refiere a un dominio constante de la cadena pesada o ligera. Las secuencias de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada y la cadena ligera de IgG humana se conocen en la técnica y se representan en la Tabla 1.

TABLA 1: SECUENCIA DE DOMINIO CONSTANTE DE CADENA PESADA Y DOMINIO CONSTANTE DE CADENA LIGERA DE IgG HUMANA

Proteína	Identificador de secuencia	Secuencia
		123456789012345678901234567890
Región constante Ig gamma-1	SEQ ID NO:11	ASTKGFPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTRKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGK
Mutante región constante Ig gamma-1	SEQ ID NO:12	ASTKGFPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTRKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVERESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGK
Región constante Ig Kappa	SEQ ID NO:13	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSITYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
Región constante Ig Lambda	SEQ ID NO:14	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYFGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSQCQVTH EGSTVEKTVAPTECS

5 Aún más, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadherencia de mayor tamaño, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos. Los ejemplos de tales moléculas de inmunoadherencia incluyen el uso de la región del núcleo de estreptavidina para elaborar una molécula tetramérica de scFv (Kipriyanov, S. M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6: 93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para elaborar moléculas de scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31: 1047 a 1058). Las porciones de anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, se pueden preparar a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, los anticuerpos, porciones de anticuerpo y moléculas de inmunoadherencia pueden ser obtenidos utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales, como se describe en la presente memoria.

15 El término "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo") según se utiliza en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (p. ej., hRGM A). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo completo. Tales realizaciones de anticuerpos también pueden ser formatos biespecíficos, específicos duales, o multi-específicos; que se unen específicamente a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de los fragmentos de unión incluidos dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546, Winter et al., Publicación PCT WO 90/05144 A1 incorporada a la presente memoria como referencia), que comprende un único dominio variable; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por medio de un conector sintético que permite que se puedan elaborar en forma de una sola cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase p. ej., Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla también están destinados a estar

- comprendidos en el término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero utilizando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, obligando de esta manera a que los dominios se emparejen con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase p. ej., Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123). Tales porciones de unión a anticuerpo son conocidas en la técnica (Kontermann y Dubel Eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 págs. (ISBN 3-540-41354-5).
- El término "determinante antigénico" o "epítipo" incluye cualquier determinante polipeptídico susceptible de unión específica a una inmunoglobulina o receptor de células T. En ciertas realizaciones, los determinantes epitópicos incluyen agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilo o sulfonilo, y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que está unida a un anticuerpo. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce de manera preferente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.
- El término "actividad biológica" se refiere a todas las propiedades biológicas inherentes de RGM A como se define en la presente memoria.
- El término "residuo canónico" se refiere a un residuo de una CDR o marco que define una estructura de CDR canónica particular, tal como la definen Chothia et al. (J. Mol. Biol. 196: 901-907 (1987); Chothia et al., J. Mol. Biol. 227: 799 (1992), incorporados ambos a la presente memoria como referencia). De acuerdo con Chothia et al., las porciones críticas de las CDR de muchos anticuerpos tienen conformaciones de la cadena principal peptídica casi idénticas a pesar de la gran diversidad a nivel de la secuencia de aminoácidos. Cada estructura canónica específica principalmente un conjunto de ángulos de torsión de la cadena principal del péptido para un segmento contiguo de residuos de aminoácido que forman un bucle.
- El término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una especie y las secuencias de la región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de las cadenas pesada y ligera murinas ligadas a regiones constantes humanas. El anticuerpo quimérico puede ser producido a través de técnicas de biología molecular recombinante, o puede conjugarse físicamente entre sí.
- El término "CDR" se refiere a la región determinante de complementariedad dentro de las secuencias variables de los anticuerpos. Existen tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se denominan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. El término "conjunto de CDR" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un grupo de tres CDR que se producen en una sola región variable capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDR se han definido de manera diferente de acuerdo con diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no sólo proporciona un sistema de numeración de residuos inequívoco aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites de residuos precisos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden ser referidas como CDR de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987) y Chothia et al., Nature 342: 877-883 (1989)) encontraron que ciertas sub-porciones dentro de las CDR de Kabat adoptan conformaciones de la cadena principal del péptido casi idénticas, a pesar de tener una gran diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Estas sub-porciones fueron denominadas L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3, donde la "L" y la "H" indican las regiones de la cadena ligera y de la cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden ser referidas como CDR de Chothia, que tienen límites que se solapan con las CDR de Kabat. Otros límites que definen las CDR que se solapan con las CDR de Kabat han sido descritos por Padlan (FASEB J. 9: 133-139 (1995)) y MacCallum (J Mol Biol 262(5): 732-45 (1996)). Sin embargo, otras definiciones de los límites de las CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas anteriores, permitiendo en cambio el solapamiento con las CDR de Kabat, a pesar de que se pueden acortar o prolongar a la luz de la predicción o de hallazgos experimentales de que residuos o grupos de residuos concretos o incluso CDR completas no afectar significativamente a la unión al antígeno. Los métodos utilizados en la presente memoria pueden utilizar las CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque las realizaciones concretas utilizan las CDR definidas por Kabat o Chothia.
- El término "anticuerpo injertado con CDR" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una especie pero en la que las secuencias de una o más de las regiones CDR de VH y/o VL se sustituyen por secuencias CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de las cadenas pesada y ligera murinas en las que una o más de las CDR murinas (p. ej., CDR3) han sido sustituidas por secuencias CDR humanas.

5 Los términos "cristal", y "cristalizado" se refieren a un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que existe en la forma de un cristal. Los cristales son una forma de estado sólido de la materia, que es distinto de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales están compuestos por matrices tri-dimensionales repetitivas, regulares, de átomos, iones, moléculas (p. ej., proteínas tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (p. ej., complejos antígeno/anticuerpo). Estas matrices tridimensionales están dispuestas de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que son bien comprendidas en el campo. La unidad fundamental, o el elemento esencial, que se repite en un cristal se denomina unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que se ajusta a una simetría cristalográfica dada, bien definida proporciona la "celda unitaria" del cristal. La repetición de la celda unitaria por traslaciones regulares en las tres dimensiones proporciona el cristal. Véase Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, *Cristalization of Nucleic Acids and Proteins, A Practical Approach*, 2ª ed., págs. 20, 1-16, Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, (1999)."

15 Los términos "donador" y "anticuerpo donador" se refieren a un anticuerpo que proporciona una o más CDR. En una realización particular, el anticuerpo donador es un anticuerpo de una especie diferente del anticuerpo del que se obtienen o derivan las regiones de marco. En el contexto de un anticuerpo humanizado, el término "anticuerpo donador" se refiere a un anticuerpo no humano que proporciona una o más CDR.

20 El término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la gravedad y/o duración de un trastorno o uno o más de sus síntomas, evitar el avance de un trastorno, causar la regresión de un trastorno, prevenir la recurrencia, el desarrollo, el inicio o el progreso de uno o más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno, o aumentar o mejorar el efecto o los efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (p. ej., un agente profiláctico o terapéutico).

25 El término "marco" o "secuencia marco" se refiere a las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Debido a que la definición exacta de una secuencia de CDR puede estar determinada por diferentes sistemas, el significado de una secuencia marco está sujeto por otra parte a diferentes interpretaciones. Las seis CDR (CDR-L1, -L2 y -L3 de la cadena ligera y CDR-H1, -H2 y -H3 de la cadena pesada) también dividir las regiones marco de la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en la que CDR1 se coloca entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin precisar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región marco, a la que se refieren las otras, representa las FR combinadas dentro de la región variable de una sola cadena de inmunoglobulina de origen natural. Según se utiliza en la presente memoria, una FR representa una de las cuatro subregiones, y la FR representa dos o más de las cuatro sub-regiones que constituyen una región marco.

35 Las secuencias aceptoras de la cadena pesada y la cadena ligera humanas son conocidas en la técnica. En una realización de la invención, las secuencias aceptoras de la cadena pesada y la cadena ligera humanas se seleccionan entre las secuencias descritas en la Tabla 2 y la Tabla 3. En dichas tablas se expresan diferentes combinaciones de secuencias marco humanas FR1 a FR4.

40

TABLA 2: SECUENCIAS ACEPTORAS DE LA CADENA PESADA HUMANA

SEQ ID No.	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
15	VH3-48/JH3 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
16	VH3-48/JH3 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
17	VH3-48/JH3 FR3	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
18	VH3-48/JH3 FR4	WGQGTMTVSS
15	VH3-48/JH4 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
16	VH3-48/JH4 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
17	VH3-48/JH4 FR3	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
19	VH3-48/JH4 FR4	WGQGTMTVSS
15	VH3-48/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
16	VH3-48/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
17	VH3-48/JH6 FR3	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
20	VH3-48/JH6 FR4	WGQGTMTVSS
21	VH3-33/JH3 FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
22	VH3-33/JH3 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
23	VH3-33/JH3 FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
18	VH3-33/JH3 FR4	WGQGTMTVSS
21	VH3-33/JH4 FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
22	VH3-33/JH4 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
23	VH3-33/JH4 FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
19	VH3-33/JH4 FR4	WGQGTMTVSS
21	VH3-33/JH6 FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
22	VH3-33/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
23	VH3-33/JH6 FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
20	VH3-33/JH6 FR4	WGQGTMTVSS
24	VH3-23/JH3 FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
25	VH3-23/JH3 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
26	VH3-23/JH3 FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
18	VH3-23/JH3 FR4	WGQGTMTVSS
24	VH3-23/JH4 FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
25	VH3-23/JH4 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
26	VH3-23/JH4 FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
19	VH3-23/JH4 FR4	WGQGTMTVSS
24	VH3-23/JH6 FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
25	VH3-23/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
26	VH3-23/JH6 FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
20	VH3-23/JH6 FR4	WGQGTMTVSS

TABLA 3: SECUENCIAS ACEPTORAS DE LA CADENA LIGERA HUMANA

SEQ ID No.	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
27	A18/JK2 FR1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC
28	A18/JK2 FR2	WYLQKPGQSPQLLIY
29	A18/JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
30	A18/JK2 FR4	FGQGTKLEIKR
31	A17/JK2 FR1	DVVMTQSPSLPVTTLGQPASISC
32	A17/JK2 FR2	WFQQRPGQSPRRLIY

SEQ ID No.	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
33	A17/JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
30	A17/JK2 FR4	FGQGTKLEIKR

5

El término "gen de anticuerpo de la línea germinal" o "fragmento génico" se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han sufrido el proceso de maduración que conduce a la reorganización genética y la mutación para la expresión de una inmunoglobulina concreta. (Véase, p. ej., Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484: 13-30 (2001)). Una de las

10

5 ventajas proporcionadas por diversas realizaciones de la presente invención parte del reconocimiento de que los genes de anticuerpo de la línea germinal son más propensos que los genes de anticuerpos maduros a conservar estructuras de secuencias de aminoácidos esenciales características de los individuos en las especies, por lo tanto menos probables de ser reconocidos como procedentes de una fuente foránea cuando se utilizan terapéuticamente en esa especie.

10 Se pretende que el término "anticuerpo humano", según se utiliza en la presente memoria, incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio in vitro o mediante mutación somática in vivo), por ejemplo en las CDR y en particular, CDR3. Sin embargo, no se pretende que el término "anticuerpo humano", según se utiliza en la presente memoria, incluya anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, hayan sido injertadas en secuencias marco humanas.

15 El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una especie no humana (p. ej., un ratón) pero en el que al menos una parte de la secuencia de VH y/o VL ha sido alterada para que sea más "similar a la humana", es decir, más similar a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado con CDR, en el que las secuencias de CDR humanas se introducen en secuencias VH y VL no humanas para reemplazar las correspondientes secuencias de CDR no humanas. Un anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región marco (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Según se utiliza en la presente memoria, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75 o 80%, particularmente al menos 85%, al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donador), y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. En particular, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera, como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado sólo contiene una cadena ligera humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado sólo contiene una cadena pesada humanizada. En realizaciones específicas, un anticuerpo humanizado sólo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o cadena pesada humanizada.

40 El anticuerpo humanizado se puede seleccionar entre cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgY, IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo sin limitación IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y en particular se pueden seleccionar los dominios constantes para optimizar las funciones efectoras deseadas utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica.

45 Las regiones marco y CDR de un anticuerpo humanizado no tienen que corresponder exactamente a las secuencias parentales, p. ej., la CDR del anticuerpo donador o el marco de consenso pueden mutagenizarse por sustitución, inserción y/o deleción de al menos un residuo de aminoácido de manera que el residuo de la CDR o del marco en ese sitio no se corresponda con el anticuerpo donante o el marco consenso. En una realización particular, dichas mutaciones, sin embargo, no serán extensas. Por lo general, al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75 o 80%, particularmente al menos 85%, más particularmente al menos 90%, y más particularmente al menos 95% de los residuos del anticuerpo humanizado se corresponderán con los de las secuencias de FR y CDR parentales. Según se utiliza en la presente memoria, el término "marco consenso" se refiere a la región marco en la secuencia consenso de inmunoglobulina. Según se utiliza en la presente memoria, el término "secuencia consenso de inmunoglobulina" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que aparecen con más frecuencia en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (Véase, p. ej., Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que aparece con más frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos aparecen con igual frecuencia, se puede incluir cualquiera de ellos en la secuencia consenso.

60 El término " RGM A humana" (abreviado en la presente memoria como hRGM A) se refiere a una glicoproteína de 450 aminoácidos anclada a glicosilfosfatidil-inositol (gpi), que fue descrita primero como un repelente del crecimiento de las neuritas o un inhibidor del crecimiento de las neuritas durante el desarrollo de proyecciones topográficas

(Stahl et al. Neuron 5: 735-43, 1990; Mueller, en Molecular Basis of Axon Growth and Nerve Pattern Formation, Editado por H. Fujisawa, Japan Scientific Societies Press, 215-229, 1997). La familia del gen *rgm* abarca tres genes diferentes, dos de ellos, *rgm a* y *rgm b*, se expresan en el SNC de mamíferos, mientras que el tercer miembro, *rgm c*, se expresa en el periférico (Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-1529, 2006), donde juega un papel importante en el metabolismo del hierro. Las proteínas RGM humanas tienen una identidad de secuencia de 43%-50%; la homología de aminoácidos de la TGM A humana y de rata es de 89%. Las proteínas RGM humanas no comparten ninguna homología de secuencia significativa con ninguna otra proteína conocida. Son proteínas ricas en prolina que contienen una región RGD y tienen homología estructural con el dominio del Factor de Von Willebrand y son escindidas en el aminoácido N-terminal 168 por una proteasa desconocida para producir la proteína funcionalmente activa (Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-1529, 2006).

In vitro, la RGM A inhibe el crecimiento de neuritas a concentraciones picomolares mediante la unión a Neogenina, que ha sido identificado como un receptor de RGM (Rajagopalan et al. Nat Cell Biol.: 6 (8), 756-62, 2004). La neogenina había sido descrita primero como una proteína de unión a netrina (Keino-Masu et al. Cell, 87 (2): 175-85, 1996), pero su afinidad por la Netrina (K_d 2 nM) es un orden de magnitud inferior al de RGM (K_d 0,2 nM) (Rajagopalan et al. Nat Cell Biol.: 6(8), 756-62, 2004). Este es un hallazgo importante ya que se ha informado de que la unión de Netrina-1 a Neogenina o a su receptor estrechamente relacionado DCC (suprimido en el cáncer colorrectal) estimula en lugar de inhibe el crecimiento de las neuritas (Braisted et al. J. Neurosci. 20: 5792-801, 2000).

Además de la unión de RGM A a Neogenina y la inducción de la inhibición del crecimiento de neuritas, la unión de RGM A o B a las proteínas morfogenéticas del hueso BMP-2 y BMP-4 podría representar otro obstáculo para la neuroregeneración y la recuperación funcional satisfactorias (Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-1529, 2006). Se ha informado de que ambas clases de proteínas (Neogenina y BMP) transducen la señal inhibitoria del crecimiento de neuritas de RGM A través de dos vías de transducción de señales completamente diferentes e independientes. Por lo general, la expresión de estas proteínas BMP es relativamente baja en la mayoría de regiones del SNC adulto, pero se ha informado de rápidos incrementos en la expresión y la acumulación de algunas BMP (p. ej., BMP-2, BMP-6, BMP-7) en respuesta a la lesión y la agresión (Lai et al., Neuroreport 8: 2691 - 94, 1997; Martínez et al. Brain Res. 894: 1-11, 2001; Hall y Miller, J. Neurosci. Res. 76: 1-8, 2004; Setoguchi et al., Exp. Neurol. 189: 33-44, 2004). Además, en un modelo de esclerosis múltiple, el modelo de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), BMP-4, BMP-6 y BMP-7 estuvieron reguladas al alza en médula espinal de ratón (Ara et al., J. Neurosci. Res. 86: 125-35, 2008). Se ha informado de que BMP-2 inhibe el crecimiento de las neuritas mediante la unión a la RGM A de la superficie celular, receptores de BMP-I y II y mediante la activación directa de LIM-quinasa (Matsuura et al. Biochem Biophys Res Commun, 360: 868-73, 2007) y por lo tanto se espera que el bloqueo de la interacción de RGM A-BMP-2 aumente aún más la recuperación funcional después de una lesión del SNC.

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

Basándose en la acumulación de RGM A en los sitios de lesión en el cerebro y de lesión de la médula espinal y debido a su actividad inhibitoria del crecimiento de neuritas celulares, se espera que la proteína ejerza una actividad inhibitoria del crecimiento de neuritas y que su neutralización por anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a al menos un epítipo de la RGM humana A pueda dar como resultado un mejor crecimiento de las fibras nerviosas lesionadas y una mejora de la recuperación funcional en indicaciones caracterizadas por una lesión en las fibras nerviosas y por la acumulación de RGM.

El término "RGM A" también abarca moléculas de RGM A aisladas u obtenidas a partir de otras especies, por ejemplo, roedores, tales como ratones o ratas; específicamente, la molécula derivada de rata se denomina en la presente memoria "RGM A de rata".

TABLA 4: LISTA DE SECUENCIAS DE MOLÉCULAS RELACIONADAS CON RGM A

Proteína	Identificador de secuencia	Descripción
hRGM A	SEQ ID NO: 2	Secuencia de la proteína RGM A humana
	SEQ ID NO: 1	Secuencia de nucleótidos de RGM A humana
hRGM A	SEQ ID NO: 4	Secuencia de la proteína RGM A-fc humana
	SEQ ID NO: 3	Secuencia de nucleótidos de RGM A-fc humana
hRGM A	SEQ ID NO: 6	Secuencia la proteína cadena ligera de RGM A-fc humana
	SEQ ID NO: 5	Secuencia de nucleótidos de cadena ligera de RGM A-fc humana
RGM A de rata	SEQ ID NO: 8	Secuencia de nucleótidos de RGM A de rata
	SEQ ID NO: 7	Secuencia de nucleótidos de RGM A de rata

El término "inhibición de la unión de RGM a uno de sus receptores" abarca la reducción parcial (como por ejemplo aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95% o más) o completa de dicha actividad de unión al receptor. Dicha "inhibición de la unión" se puede determinar por cualquier método adecuado disponible en la técnica, particularmente por cualquier método ilustrado en la presente memoria, por ejemplo ensayos de unión basados en ELISA.

Se pretende que un "anticuerpo aislado", según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a hRGM A está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos hRGM A). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a hRGM A puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de RGM A de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

El término "polinucleótido aislado" se referirá a un polinucleótido (p. ej., de origen genómico, ADNc, o sintético, o alguna combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, no está asociado con todo o una parte de un polinucleótido con el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza; está unido operablemente a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza; o no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

El término "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o polipéptido que en virtud de su origen o fuente de derivación no está asociado con los componentes asociados de forma natural que lo acompañan en su estado nativo; está sustancialmente libre de otras proteínas de la misma especie; es expresado por una célula de una especie diferente; o no se produce en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula a partir de la cual se origina naturalmente estará "aislado" de sus componentes asociados de forma natural. Una proteína también puede volverse sustancialmente libre de componentes asociados de forma natural por medio de aislamiento, utilizando mecanismos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

Los términos "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "marcaje de Kabat" se utilizan indistintamente en la presente memoria. Estos términos, que son reconocidos en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos que son más variables (*es decir* hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391 y Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication Núm. 91-3242). Para la región variable de cadena pesada, la región hipervariable oscila de las posiciones de los aminoácidos 31 a 35 para la CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 65 para CDR2, y las posiciones de aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de la cadena ligera, la región hipervariable oscila de las posiciones de aminoácidos 24 a 34 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 56 para CDR2, y las posiciones de aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

El término " K_d " se refiere a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta tal como se conoce en la técnica.

El término "residuos clave" se refiere a ciertos residuos dentro de la región variable que tienen un mayor impacto sobre la especificidad y/o la afinidad de unión de un anticuerpo, en particular, un anticuerpo humanizado. Un residuo clave incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes: un residuo que es adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (puede ser un sitio de glicosilación ligado a N o a O), un residuo raro, un residuo capaz de

interaccionar con el antígeno, un residuo capaz de interaccionar con una CDR, un residuo canónico, un residuo de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera, un residuo dentro de la zona de Vernier, y un residuo en la región que se solapa entre la definición de Chothia definición de una CDR1 de una cadena pesada variable y la definición de Kabat del primer marco de la cadena pesada.

5 El término " k_{on} " se refiere a la constante de la velocidad de asociación de un anticuerpo al antígeno para formar el complejo anticuerpo/antígeno tal como se conoce en la técnica.

10 El término " k_{off} " se refiere a la constante de la velocidad de disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno tal como se conoce en la técnica.

15 El término "proteína de unión marcada" se refiere a una proteína con una marca incorporada que proporciona la identificación de la proteína de unión. En particular, la marca es un marcador detectable, p. ej., la incorporación de un aminoácido radiomarcado o el anclaje a un polipéptido de radicales biotinilados que se puede detectar mediante avidina marcada (p. ej., estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede ser detectada por métodos ópticos o colorimétricos). Los ejemplos de las marcas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (p. ej., ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , o ^{153}Sm); marcas fluorescentes (p. ej., FITC, rodamina, fósforos que contienen lantánidos), marcas enzimáticas (p. ej., peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcas quimioluminiscentes; grupos biotinilados; epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informador secundario (p. ej., secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopos); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio.

20 El término "tratamiento local" se refiere a cualquier forma de administración de la proteína de unión de la invención o de una formulación que contiene la misma directamente en la región previsto del cuerpo de un mamífero que va a ser tratado, donde se pretende inducir la acción neuroprotectora o neuroregeneradora deseada.

25 Los términos "modular" y "regular" se utilizan indistintamente y se refieren a un cambio o una alteración en la actividad de una molécula de interés (p. ej., la actividad biológica de hRGM A). La modulación puede ser un aumento o una disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula de interés. Las actividades y funciones ilustrativas de una molécula incluyen, pero no se limitan a, características de unión, actividad enzimática, activación del receptor celular y transducción de señales.

30 Correspondientemente, el término "modulador" es un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o función de una molécula de interés (p. ej., la actividad biológica de hRGM A). Por ejemplo, un modulador puede causar un aumento o disminución en la magnitud de una determinada actividad o en la función de una molécula en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del modulador. El término "agonista", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca un aumento en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del agonista. Los agonistas particulares de interés pueden incluir, pero no se limitan a, polipéptidos de hRGM A o polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos o cualquier otra molécula que se unen a hRGM A. El término "antagonista", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés provoca una disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del antagonista. Los antagonistas ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, anticuerpos, pepticuerpos, carbohidratos o pequeñas moléculas orgánicas. Los pepticuerpos se describen, p. ej., en el documento WO 01/83525.

35 Los antagonistas particulares de interés incluyen los que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica de hRGM A. Los antagonistas de hRGM A pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, o cualquier otra molécula, que se unen a hRGM A, como los anticuerpos monoclonales que interaccionan con la molécula de RGM A. Cabe señalar que la interacción con RGM A puede dar como resultado la unión y neutralización de otros componentes ligandos/componentes de la membrana celular, y puede ser útil para el funcionamiento aditivo o sinérgico contra múltiples enfermedades.

40 El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo, que comparten una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada común y de la cadena ligera común, en contraste con las preparaciones de anticuerpos "policlonales" que contienen una mezcla de diferentes anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales pueden ser generados por varias tecnologías nuevas como presentación en fagos, bacterias, levaduras o ribosomas, así como métodos clásicos ilustrados por anticuerpos derivados de hibridomas (p. ej., un anticuerpo secretado por un hibridoma preparado mediante tecnología de hibridoma, tal como la metodología de hibridoma de Kohler y Milstein convencional ((1975) Nature 256: 495-497).

En un anticuerpo completo, cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente memoria como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son las regiones más conservadas, denominadas marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase.

El término "neuroprotector" o "neuroprotección" se refiere a un tratamiento que evita que las células neuronales, en particular células que comprenden células de la CFNR se dañen o degeneren, (analizable mediante la observación de la conservación de los axones de CGR (Células Ganglionares de la Retina) en la retina; o inhibe la degeneración "anormal" de CFNR medible a través de las pérdidas de espesor de la CFNR como se definió anteriormente.

El término "neurorregeneradora" o "neurorregeneración" se refiere a un tratamiento de acuerdo con la invención que da como resultado una reparación o re-crecimiento de las células neuronales, en particular células que comprenden células de CFNR dañadas, (analizables mediante, por ejemplo, Tomografía de Coherencia Óptica (TCO) de la retina, formación de imágenes por tensor de difusión de los nervios ópticos; brotación de neuronas de la retina;

El término "neutralizador" se refiere a la neutralización de la actividad biológica de una proteína diana cuando una proteína de unión se une específicamente a la proteína diana. La neutralización puede ser el resultado de diferentes maneras de unión de dicha proteína de unión a la diana. Por ejemplo, la neutralización puede estar causada por la unión de la proteína de unión en una región de la diana que no afecta a la unión del receptor a la molécula diana. Alternativamente la unión de una proteína de unión puede dar como resultado un bloqueo de la unión del receptor a la diana, cuyo bloqueo finalmente neutraliza la actividad de la proteína diana. Una proteína de unión neutralizadora es un anticuerpo neutralizador cuya unión a hRGM A da como resultado la neutralización de una actividad biológica de hRGM A. En particular, la proteína de unión neutralizadora se une a hRGM A y disminuye una actividad biológica de hRGM A en al menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85% o más. La neutralización de una actividad biológica de hRGM A por una proteína de unión neutralizadora se puede evaluar mediante la medición de uno o más indicadores de la actividad biológica de hRGM bien conocidos en la técnica. Por ejemplo la neutralización de hRGM A invierte la inhibición en un ensayo de crecimiento neuronal Ntera (véase el Ejemplo 3, a continuación). El ensayo de crecimiento de neuritas Ntera aborda la inhibición del crecimiento de las neuritas. En ausencia de una proteína inhibidora de RGM o fragmento y en presencia del sustrato estimulador del crecimiento laminina, los agregados Ntera neuronales muestran una red extensa y densa de las neuritas en crecimiento. La RGM A o los fragmentos de RGM A inhiben el crecimiento de neuritas, dando como resultado una reducción de la longitud y el número de neuritas. Los antagonistas que bloquean la función de RGM A o los MAB de tipo mAb 5F9 neutralizan la actividad inhibidora del crecimiento de las neuritas del potente fragmento de la cadena ligera de hRGM A conjugado con fc (aminoácidos 47-168) de la proteína RGM A humana en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados de neuronas Ntera humanas diferenciadas, lo que da como resultado un fuerte aumento en la longitud y el número de las neuritas.

El término "anticuerpo monoclonal neutralizador" se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo, que tras la unión al antígeno específico son capaces de competir y de inhibir la unión del ligando natural a dicho antígeno. En una realización concreta de la presente solicitud, los anticuerpos neutralizadores de la presente invención son capaces de competir con RGM A por la unión a Neogenina y/o BMP-2 y/o BMP-4, y de prevenir la actividad biológica o la función de RGM A. En particular, los anticuerpos neutralizadores de la presente invención son capaces de unirse con RGM A y prevenir la unión a Neogenina y/o BMP-2 y/o BMP-4, y prevenir la actividad biológica o la función de RGM A. El término "actividad" incluye actividades tales como la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-hRGM A que se une a un antígeno RGM A y/o la potencia de neutralización de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-hRGM A cuya unión a hRGM A inhibe la actividad biológica de hRGM A, p. ej., como se determina en un ensayo de unión de hRGM A-Neogenina, un ensayo de unión de hRGM A-BMP-2 o un ensayo de unión de hRGM A-BMP-4 como se describe más abajo en la sección experimental.

La actividad biológica de RGM A se puede describir como la regulación de la migración celular. Un ejemplo especial de la migración celular es el crecimiento de neuritas, que se ve dificultado o inhibido por las proteínas RGM A. Además se ha demostrado que las proteínas RGM modulan la actividad de las proteínas BMP. Los ejemplos publicados en la presente memoria describen una actividad sinergizante, potenciadora de las proteínas de RGM sobre la ruta de BMP a un lado y una actividad inhibidora de las proteínas RGM sobre la ruta de BMP, que es importante para la regulación del metabolismo del hierro, la regeneración de hueso y cartílago y en el SNC para la remielinización y la regeneración.

El término "conectado operablemente" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Una secuencia de control "conectada operablemente" a una secuencia codificante está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias "conectadas operablemente" incluyen tanto las secuencias de control de la expresión que son contiguas al gen de interés como las secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de la expresión" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a secuencias de polinucleótidos, que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que están ligadas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias de inicio de la transcripción, de terminación, promotoras y potenciadoras apropiadas; señales de procesamiento del ARN eficaces tales como señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficacia de traducción (es decir, secuencia consenso Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo anfitrión; en procariotas, tales secuencias de control generalmente incluyen promotor, sitio de unión al ribosoma, y secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de la transcripción. Se pretende que el término "secuencias de control" incluya componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de compañeros de fusión.

El término "polinucleótido" significa una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de hebra sencilla y de doble hebra de ADN, pero particularmente es ADN de doble hebra.

El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se utilizan de forma indistinta con el término polipéptido y también se refieren a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteínas y análogos polipeptídicos de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

Se pretende que el término "célula anfitriona recombinante" (o simplemente "célula anfitriona") haga referencia a una célula en la que se ha introducido ADN exógeno. Se debe entender que tales términos pretenden referirse no sólo a la célula sujeta concreta, si no a la progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aún así estar incluida dentro del alcance del término "célula anfitriona" según se utiliza en la presente memoria. Particularmente las células anfitrionas incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas entre cualquiera de los Reinos de la vida. Las células eucariotas concretas incluyen células de protistas, hongos, plantas y animales. Más particularmente las células anfitrionas incluyen, pero no se limitan a la línea celular procariótica de *E. coli*; líneas celulares de mamíferos CHO, HEK 293 y COS; la línea celular de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Las técnicas convencionales se pueden utilizar para el ADN recombinante, la síntesis de oligonucleótidos, y el cultivo y la transformación de tejidos (p. ej., electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo con las especificaciones del fabricante o comúnmente llevadas a cabo en la técnica o descritas en la presente memoria. Las técnicas y procedimientos anteriores pueden ser realizados generalmente de acuerdo con los métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria. Véase, p. ej., Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), que se incorpora a la presente memoria como referencia para cualquier propósito.

Se pretende que el término "anticuerpo humano recombinante", según se utiliza en la presente memoria, incluya todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado a una célula anfitriona (que se describe más adelante), anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria recombinante (Hoogenboom H.R., (1997) *TIB Tech.* 15: 62-70; Azzazy H., y Highsmith W.E., (2002) *Clin. Biochem.* 35: 425-445; Gavilondo J.V. y Larrick J.W. (2002) *BioTechniques* 29: 128-145; Hoogenboom H. y Chames P. (2000) *Immunology Today* 21: 371-378), anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, p. ej., Taylor, L. D., et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20: 6287-6295; Kellermann S-A, y Green L.L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13: 593-597; Little M. et al. (2000) *Immunology Today* 21: 364-370) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los

anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con las secuencias de VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

5 El término "recuperación" se refiere al procedimiento de volver una especie química tal como un polipéptido sustancialmente libre de componentes asociados de forma natural por medio de aislamiento, p. ej., utilizando mecanismos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

10 El término "CFNR" es la capa más interna de la retina y se compone principalmente de los axones de las neuronas de las células ganglionares que componen el nervio óptico. La estructura de la capas de la retina comprende dicha CFNR más interna seguida de la capa plexiforme interna (CPI), la capa plexiforme externa (CPE), la capa de fotorreceptores (CFR) y el epitelio pigmentario de la retina (EPR). En individuos sanos, la CFNR tiene sólo alrededor de 110-120 µm de espesor a la edad de 15 años y la mayoría de los individuos normales perderán aproximadamente 0,017% al año de espesor de la retina lo que equivale a alrededor de 10-20 µm a lo largo de más de 60 años (los cambios en el espesor de CFNR pueden ser determinados, por ejemplo, por el método TCO como describen Frohman et al., más arriba). Dicha pérdida de espesor podrá designarse también degeneración "normal" de la CFNR.

20 Una degeneración o pérdida de espesor por encima de o mayor que dicha degeneración "normal" también se puede denominar degeneración de la CFNR "anormal" o "relacionada con enfermedad". En particular, dichas pérdidas anormales de espesor pueden estar por encima de 0, 017%, como por ejemplo por encima de 0,02%, o por encima de 0,1%, o por encima de 1%, o por encima de 5%, o por encima de 10% o por encima de 20% por año, como por ejemplo de 1 a 10% o de 2 a 5% por mes.

25 El término "degeneración de CFNR" abarca las pérdidas de espesor de CFNR tanto normales como las anormales relacionadas con la enfermedad.

30 El término "muestra" se utiliza en su sentido más amplio. Una "muestra biológica", según se utiliza en la presente memoria, incluye, pero no se limita a, cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o anteriormente ser vivo. Tales seres vivos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, orina, líquido sinovial, células, órganos, tejidos, médula ósea, ganglios linfáticos y bazo.

35 Los términos "unión específica" o "se une específicamente", según se utiliza en la presente memoria, en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína, o un péptido con una segunda especie química, quieren significar que la interacción depende de la presencia de una estructura concreta (p. ej., un "determinante antigénico" o "epítipo" tal como se define más adelante) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de a las proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A no marcado, libre), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo .

45 El término "resonancia de plasmón superficial" se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de las interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensores, por ejemplo usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para una descripción más detallada, véanse Jönsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26; Jönsson, U., et al. (1991) *Biotechniques* 11: 620-627; Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8: 125-131; y Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268-277.

50 El término "tratamiento sistémico" se refiere a cualquier forma de administración de la proteína de unión de la invención o de una formulación que la contiene al organismo de un mamífero que va a ser tratado de modo que la proteína de unión alcanza el lugar previsto de acción neuroprotectora o neuroregeneradora a través el torrente sanguíneo. Por ejemplo, la administración sistémica abarca la infusión o inyección de la proteína de unión de la invención o una formulación que la contiene.

55 El término "transformación" se refiere a cualquier proceso por el que el ADN exógeno entra en una célula anfitriona. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales utilizando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede basarse en cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico foráneo en una célula anfitriona procarionta o eucariota. El método se selecciona basándose en la célula anfitriona que se está transformando y pueden incluir, pero no se limita a, infección viral, electroporación, lipofección, y bombardeo de partículas. Tales células "transformadas" incluyen células transformadas establemente en las que el ADN insertado es capaz de replicarse, ya sea como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma del anfitrión. También incluyen células que expresan transitoriamente el ADN o ARN insertados durante períodos limitados de tiempo.

El término "organismo transgénico" se refiere a un organismo que tiene células que contienen un transgén, en donde el transgén introducido en el organismo (o un ancestro del organismo) expresa un polipéptido no expresado de forma natural en el organismo. Un "transgén" es un constructo de ADN, el cual está integrado de forma estable y operativa en el genoma de una célula a partir del cual se desarrolla un organismo transgénico, que dirige la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos de células o tejidos del organismo transgénico.

El término "tratamiento de la degeneración de RNFL" se refiere tanto al tratamiento terapéutico (es decir, agudo) como profiláctico, de la degeneración de RNFL. Dicho tratamiento puede ser "neurorregenerador" o "neuroprotector"; dicho tratamiento puede ser en forma de un tratamiento "local" o de uno "sistémico".

El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN de doble hebra circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son susceptibles de replicación autónoma en una célula anfitriona en la que se introducen (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (p. ej., vectores de mamíferos no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula anfitriona tras la introducción en la célula anfitriona, y de ese modo se replican junto con el genoma del anfitrión. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, se pretende que la invención incluya dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (p. ej., retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), que sirven para funciones equivalentes.

El término "zona de vernier" se refiere a un subconjunto de los residuos del marco que pueden ajustar la estructura de CDR y afinar el ajuste al antígeno según lo descrito por Foote y Winter (1992, J. Mol. Biol. 224: 487-499, que se incorpora a la presente memoria como referencia). Los residuos de la zona de Vernier forman una capa que subyace a las CDR y pueden tener un impacto sobre la estructura de las CDR y la afinidad del anticuerpo.

2. Utilización de anticuerpos contra RGM A

El anticuerpo monoclonal neutralizador contra RGM A, inhibe selectivamente la unión de RGM A a su receptor Neogenina y a las proteínas morfogenéticas óseas 2 y 4 (BMP-2, BMP-4). Los anticuerpos monoclonales neutralizadores estimulan el nuevo crecimiento de las fibras nerviosas lesionadas o dañadas y la formación de sinapsis funcionales de fibras nerviosas en regeneración, e inducen la regeneración a larga distancia en un modelo de rata *in vivo* de lesión del nervio óptico y también mejora la remielinización de las fibras nerviosas lesionadas y en regeneración (véase el documento PCT/EP2009/001437).

Sorprendentemente, se observó que los anticuerpos contra RGM A están asociados con un efecto terapéutico directo adicional todavía no reconocido sobre la CFNR. En particular, los pacientes que padecen una enfermedad ocular asociada con la degeneración de la CFNR o que tienen riesgo de degeneración de la CFNR se pueden tratar con una molécula de anticuerpo como se define en la presente memoria. La presente invención también se basa en el sorprendente hallazgo de que los anticuerpos administrados por vía sistémica de la presente invención se localizan en la retina y ejercen su efecto beneficioso directamente en la región enferma del ojo.

Por lo tanto, por primera vez, se proporciona en el presente documento un método de tratamiento dirigido de un grupo específico de pacientes destinado a la protección contra la degeneración de CFNR o destinado a la regeneración de la CFNR ya degenerada utilizando anticuerpos capaces de unirse a RGM A.

Otra realización se refiere al tratamiento neuroprotector de la degeneración de CFNR como se observa en una multiplicidad de estados de enfermedad utilizando anticuerpos capaces de unirse a RGM A.

Otra realización se refiere al uso de un anticuerpo monoclonal que bloquea RGM A y evita la interacción entre RGM A y sus proteínas receptoras y/o de unión, es decir, Neogenina y BMP-2, BMP-4, para el tratamiento de la degeneración de la CFNR.

Otra realización de la invención se refiere a la proteína de unión para RGM A humana para su utilización en el tratamiento de la degeneración de la CFNR.

En otra realización, dicho tratamiento es un tratamiento terapéutico o profiláctico, neurorregenerador o neuroprotector, local o sistémico.

En otra realización "como resultado de dicho tratamiento

1. a. se observa brotación de neuronas retinianas; y/o
2. b. los axones de las CGR (Células Ganglionares de la Retina) en la retina están preservados frente a la degeneración.

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona una proteína de unión que se disocia de la RGM A humana (hRGM A) con una K_D de 1×10^{-7} M o menos y una constante de la velocidad de disociación k_{off} de $1 \times 10^{-2} s^{-1}$ o menos, ambas determinadas por resonancia de plasmón superficial para su uso en el tratamiento de la degeneración de la CFNR:

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a una proteína de unión, como por ejemplo una proteína de unión que muestra las características cinéticas anteriores, que se une a RGM A humana y neutraliza la actividad inhibitoria del crecimiento de neuritas de RGM A humana como se determina en un ensayo convencional in vitro, como por ejemplo el ensayo de crecimiento neuronal Ntera como se ilustra en el Ejemplo 3, a continuación para su uso en el tratamiento de la degeneración de la CFNR.

Otra realización se refiere también a una proteína de unión para su uso como se ha definido anteriormente, que tiene al menos una de las siguientes características funcionales adicionales:

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

En otra realización, la proteína de unión como se define en la presente memoria modula la capacidad de RGM para unirse a al menos uno de sus receptores. Semejante proteína de unión se une a un dominio de unión al receptor de RGM A humana. Para RGM A se han identificado dominios de unión a receptores N y C terminales. Las realizaciones concretas de las proteínas de unión de la invención se unen al dominio de unión del receptor N-terminal de RGM A, como se ilustra por la inhibición de la unión entre un fragmento de hRGM A N-terminal, como por ejemplo 47-168 y las moléculas receptoras, como Neogenina y BMP-4. Dicho fragmento de hRGM A N-terminal puede tener una longitud total de aproximadamente 30 a aproximadamente 150 o de aproximadamente 30 a aproximadamente 122 residuos de aminoácidos. Como ejemplo no limitante se pueden mencionar el Fragmento 0 (correspondiente a los residuos N-terminales 47-168) de hRGM A como se describe en la presente memoria o cualquier fragmento de unión al receptor más corto.

En otra realización dicha proteína de unión modula o inhibe, al menos una de las siguientes interacciones:

- unión de RGM A humana a BMP-4 humana.
- unión de hRGM A a Neogenina humana,
- unión de hRGM C a Neogenina humana,
- unión de RGM A humana a BMP-2 humana.

De acuerdo con una realización concreta, la proteína de unión como se define en la presente memoria es un anticuerpo humanizado.

La proteína de unión como se describió anteriormente puede tener un dominio de unión a antígeno, dicha proteína de unión capaz de unirse a un epítipo de una molécula de RGM, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

GTTPDY	(SEQ ID NO: 59),
FQATHDPLT	(SEQ ID NO: 62),
ARRNEYGGSSFFDY	(SEQ ID NO: 65),
LQGYIPPT	(SEQ ID NO: 68), y

secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50% con una de dichas secuencias. En otra realización, la presente invención se refiere a una proteína de unión, que comprende un dominio de unión a antígeno siendo dicha proteína de unión capaz de unirse a un epítipo de una molécula de RGM, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

GTTPDY	(SEQ ID NO: 59),
FQATHDPLT	(SEQ ID NO: 62),
ARRNEYGGSSFFDY	(SEQ ID NO: 65),
LQGYIPPT	(SEQ ID NO: 68), y

ES 2 562 832 T3

secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50%, como por ejemplo al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% de identidad con una de dichas secuencias.

5 Por ejemplo, dicha proteína de unión puede comprender dos de dichas CDR, como, por ejemplo el SEQ ID NO: 59 y 62; o el SEQ ID NO: 65 y 68; en donde al menos una de dichas CDR puede ser modificada, teniendo una identidad de secuencia de al menos 50%, como por ejemplo al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% de identidad con una de dichas secuencias.

10 Dicha proteína de unión puede comprender adicionalmente al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 57, 58, 60, 61, 63, 64, 66, 67 y las secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50%, como por ejemplo al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% de identidad, con una de dichas secuencias.

15 En otra realización, dicha al menos una CDR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

SEQ ID NO: 57	Residuos 31-35 del SEQ ID NO: 34
SEQ ID NO: 58	Residuos 50 a 66 del SEQ ID NO: 34
SEQ ID NO: 59	Residuos 99-104 del SEQ ID NO: 34
SEQ ID NO: 60	Residuos 24 a 39 del SEQ ID NO: 10
SEQ ID NO: 61	Residuos 55-61 del SEQ ID NO: 10
SEQ ID NO: 62	Residuos 94-102 del SEC ID NO: 10
SEQ ID NO: 63	Residuos 31 a 35 del SEQ ID NO: 55
SEQ ID NO: 64	Residuos 50-66 del SEQ ID NO: 55
SEQ ID NO: 65	Residuos 97 a 110 del SEQ ID NO: 55
SEQ ID NO: 66	Residuos 24-34 del SEQ ID NO: 56
SEQ ID NO: 67	Residuos 50-56 del SEQ ID NO: 56
SEQ ID NO: 68	Residuos 89 a 97 del SEQ ID NO: 56

En otra realización, dicha proteína de unión comprende al menos 3 CDR que se seleccionan entre un conjunto de CDR de dominio variable que consiste en:

Conjunto VH 5F9		
VH 5F9 CDR-H1	Residuos 31-35 del SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 57
5F9 VH CDR-H2	Residuos 50-66 del SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 58
5F9 VH CDR-H3	Residuos 99 a 104 del SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 59
Conjunto VL 5F9		
VL 5F9 CDR-L1	Residuos 24-39 del SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 60
VL 5F9 CDR-L2	Residuos 55-61 del SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 61
VL 5F9 CDR-L3	Residuos 94-102 del SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 62
VH conjunto 8D1		
VH 8D1 CDR-H1	Residuos 31 a 35 de la SEQ ID NO.:55	SEQ ID NO: 63
VH 8D1 CDR-H2	Residuos 50 a 66 de la SEQ ID NO.:55	SEQ ID NO: 64
VH 8D1 CDR-H3	Residuos 97-110 del SEQ ID NO: 55.	SEQ ID NO: 65
VL conjunto 8D1		

VH conjunto 8D1		
VL 8D1 CDR-L1	Residuos 24 a 34 del SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 66
VL CDR-L2 8D1	Residuos 50 a 56 del SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 67
VL 8D1 CDR-L3	Residuos 89-97 del SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 68

o un conjunto de dominios variables en donde al menos una de dichas 3 CDR es una secuencia de aminoácidos CDR modificada que tiene una identidad de secuencia de al menos 50%, como por ejemplo al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% de identidad, con la secuencia parental.

- 5 Cada una de dichas modificaciones anteriormente mencionadas puede ser generada por adición, deleción, o, en particular, sustitución de un único o de múltiples aminoácidos, o combinaciones de las mismas.

En otra realización, la proteína de unión comprende al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable.

- 10 Dichos al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable se seleccionan del grupo que consiste en:
conjunto de VH 5F9 y conjunto de VL 5F9; y
conjunto de VH 8D1 y conjunto de VL 8D1

- 15 La proteína de unión tal como se utiliza de acuerdo con otra realización de la invención comprende, además, un marco aceptor humano.

Dicho marco aceptor humano puede comprender al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 y 33.

- 20 La proteína de unión de la invención puede comprender al menos un conjunto de secuencias marco seleccionado del grupo que consiste en los conjuntos:

- 25 (1) conjunto VH3-48 (SEQ ID NO: 15, 16 y 17)
conjunto VH3-33 (SEQ ID NO: 21, 22 y 23)
conjunto VH3-23 (SEQ ID NO: 24, 25 y 26)
estando combinado cada uno de los conjuntos combinado con una secuencia de marco adicional, seleccionada entre

- 30 JH3 (SEQ ID NO: 18),
JH4 (SEQ ID NO: 19),
JH6 (SEQ ID NO: 20);

o

- (2) seleccionado del grupo que consiste en los conjuntos

- 35 conjunto A18: (SEQ ID NO: 27, 28 y 29)
conjunto A17: (SEQ ID NO: 31, 32 y 33)
estando combinado cada uno de los conjuntos con una secuencia marco adicional, seleccionada entre JK2 (SEQ ID NO: 2)

- 40 La proteína de unión definida anteriormente que comprende al menos un dominio variable de cadena pesada injertado con CDR seleccionado entre los SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, y 43; y/o al menos un dominio variable de cadena ligera injertado con CDR seleccionado entre los SEQ ID NO: 44, 45, y 46.

- 45 La proteína de unión utilizada de acuerdo con otra realización de la invención comprende una combinación de dos dominios variables, en donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácido seleccionadas entre:
los SEQ ID NO: 35 y 44; 36 y 44; 37 y 44; 38 y 44; 39 y 44; 40 y 44; 41 y 44; 42 y 44; 43 y 44;
los SEQ ID NO: 35 y 45; 36 y 45; 37 y 45; 38 y 45; 39 y 45; 40 y 45; 41 y 45; 42 y 45; 43 y 45;
los SEQ ID NO: 35 y 46; 36 y 46; 37 y 46; 38 y 46; 39 y 46; 40 y 46; 41 y 46; 42 y 46; 43 y 46;

- 50 En otra realización de la invención, dicho marco aceptor humano de la proteína de unión utilizado de acuerdo con la invención comprende al menos una sustitución de aminoácido en la región marco en un residuo clave, seleccionándose dicho residuo clave del grupo que consiste en:

- 55 un residuo adyacente a una CDR;
un residuo del sitio de glicosilación;
un residuo raro;
un residuo capaz de interactuar con un epítipo de RGM;
un residuo capaz de interactuar con una CDR;
un residuo canónico;

un residuo de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera;
 un residuo dentro de una zona de Vernier;
 un residuo N-terminal susceptible de formación de paraglutamato y
 un residuo en una región que se solapa entre una cadena pesada variable definida por Chothia CDR1 y un
 5 primer marco de la cadena pesada definido Kabat.
 Dichos residuos clave se seleccionan del grupo que consiste en
 (posición de la secuencia de la cadena pesada): 1, 5, 37, 48, 49, 88, 98
 (posición de la secuencia de la cadena ligera): 2, 4, 41, 51

10 En una realización concreta, la proteína de unión utilizada de acuerdo con otra realización de la invención es o comprende un dominio variable humano consenso.

De acuerdo con otra realización de la proteína de unión utilizada de acuerdo con otra realización de la invención, dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácido en la región marco, en donde la
 15 secuencia de aminoácidos del marco es al menos 65%, como por ejemplo al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99%, idéntica a la secuencia de dicho marco aceptor humano y comprende al menos 70 residuos de aminoácidos, como por ejemplo al menos 75, 80, o 85 residuos, idénticos a dicho marco aceptor humano.

De acuerdo con una realización concreta, la proteína de unión utilizada de acuerdo con otra realización de la invención comprende al menos un dominio variable mutado del marco que tiene una secuencia de aminoácidos
 20 seleccionada del grupo que consiste en:
 los SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50; (Dominio VH), y/o
 seleccionada del grupo que consiste en:
 los SEQ ID NO: 51, 52, 53, y 54 (dominio VL)

25 En particular, dicha proteína de unión comprende dos dominios variables opcionalmente mutados del marco, en donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas de los grupos que consisten en:
 los SEQ ID NO: 47 y 44; 47 y 45; 47 y 46; 47 y 51; 47 y 52; 47 y 53; 47 y 54;
 30 los SEQ ID NO: 48 y 44; 48 y 45; 48 y 46; 48 y 51; 48 y 52; 48 y 53; 48 y 54;
 los SEQ ID NO: 49 y 44; 49 y 45; 49 y 46; 49 y 51; 49 y 52; 49 y 53; 49 y 54;
 los SEQ ID NO: 50 y 44; 50 y 45; 50 y 46; 50 y 51; 50 y 52; 50 y 53; 50 y 54;

35 Las proteínas de unión utilizadas de acuerdo con otra realización de la invención descrita en la presente memoria son capaces de unirse al menos a una diana, seleccionada entre moléculas de RGM. Son capaces de unirse a RGM A humana, y opcionalmente al menos otra molécula de RGM de origen humano o procedente de monos, ratas, pollo, rata, pollo, rana, y peces. Por ejemplo se pueden unir además a RGM A de rata, RGM C humana, y/o RGM C de rata.

40 La proteína de unión según se utiliza de acuerdo con otra realización de la invención es capaz de modular, en particular, capaz de neutralizar o inhibir una función biológica de una diana, seleccionada entre moléculas de RGM como se definió anteriormente.

45 En particular, la proteína de unión utilizada de acuerdo con otra realización de la invención modula, en particular inhibe, la capacidad de RGM para unirse a al menos uno de sus receptores, como por ejemplo Neogenina, y BMP, como BMP-2 y BMP- 4. Por ejemplo dicha proteína de unión modula, en particular, disminuye y en particular inhibe al menos una de las siguientes interacciones:
 unión de RGM A humana a BMP-4 humana.
 50 unión de hRGM A a Neogenina humana,
 unión de hRGM C a Neogenina humana,
 unión de RGM A humana a BMP-2 humana.

Las proteínas de unión con diferentes combinaciones de características funcionales, y por consiguiente que muestran diferentes perfiles funcionales, como los descritos en la presente memoria, están también dentro del
 55 alcance de la invención. Los ejemplos no limitantes de tales perfiles se enumeran a continuación:

Característica	Perfiles																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Unión a RGM A humana	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Unión a RGMA de rata	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		+
Unión a RGM C humana	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+

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

Por ejemplo, el perfil 1 lo cumple el anticuerpo 5F9 proporcionado por la presente invención y sus derivados descritos en la presente memoria.

5 Por ejemplo, el perfil 2 lo cumple el anticuerpo 8D1 proporcionado por la presente invención y sus derivados descritos en la presente memoria.

Una proteína de unión utilizada de acuerdo con otra realización de la invención es capaz de inhibir al menos una actividad biológica de RGM, en particular, RGM A, en donde dicha RGM A se selecciona entre la humana, de mono
10 cinomolgo, de rata, de pollo, de rana, y de pescado.

La proteína de unión utilizada de acuerdo con otra realización de la invención tiene una o más de las siguientes características cinéticas:

15 (a) una constante de velocidad de asociación (k_{on}) a dicha diana seleccionada del grupo que consiste en: al menos aproximadamente $10^2 M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3 M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4 M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5 M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^6 M^{-1}s^{-1}$, y al menos aproximadamente $10^7 M^{-1}s^{-1}$, medido por resonancia de plasmón superficial;

20 (b) una constante de velocidad de disociación (k_{off}) a dicha diana seleccionada del grupo que consiste en: a lo sumo aproximadamente $10^{-2}s^{-1}$, a lo sumo aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$, a lo sumo aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$; a lo sumo aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$; y a lo sumo aproximadamente $10^{-6}s^{-1}$, medido por resonancia de plasmón superficial; o

25 (c) una constante de disociación en equilibrio (K_D) a dicha diana seleccionada del grupo que consiste en: a lo sumo aproximadamente $10^{-7} M$; a lo sumo aproximadamente $10^{-8} M$; a lo sumo aproximadamente $10^{-9} M$; a lo sumo aproximadamente $10^{-10} M$; a lo sumo aproximadamente $10^{-11} M$; a lo sumo aproximadamente $10^{-12} M$; y a lo sumo $10^{-13} M$.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención hace uso de un constructo de anticuerpo que comprende una proteína de unión descrita anteriormente, comprendiendo dicho constructo de anticuerpo
30 adicionalmente un polipéptido conector o un dominio constante de inmunoglobulina.

Dichos constructo de anticuerpo o proteína de unión pueden ser seleccionados del grupo que consiste en: una molécula de inmunoglobulina, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR, un anticuerpo humanizado, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, Fv unido a disulfuro, un scFv, un anticuerpo de dominio único, un diacuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de doble especificidad, una
35 inmunoglobulina de dominio variable dual, y un anticuerpo biespecífico.

En un constructo de anticuerpo como el utilizado de acuerdo con otra realización de la invención, dicha proteína de unión comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en;

40 un dominio constante de IgM humana,
un dominio constante de IgG1 humana,
un dominio constante de IgG2 humana,
un dominio constante de IgG3 humana,
45 un dominio constante de IgG4 humana,
un dominio constante de IgE humana,
un dominio constante de IgD humana,
un dominio constante de IgA1 humana
un dominio constante de IgA2 humana
un dominio constante de IgY humana y

los correspondientes dominios constantes mutados

Un constructo de anticuerpo utilizado de acuerdo con otra realización de la invención comprende un dominio constante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: los SEQ ID NO: 11, 12, 13 y 14

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención hace uso de un producto conjugado de anticuerpo que comprende un constructo de anticuerpo descrito en la presente memoria, comprendiendo dicho producto conjugado de anticuerpo adicionalmente un agente seleccionado del grupo que consiste en; una molécula de inmunoaderencia, un agente para la formación de imágenes, un agente terapéutico, y un agente citotóxico, estando conjugado cada uno de los agentes, por ejemplo, unido covalentemente a dicha proteína de unión.

Por ejemplo, dicho agente es un agente para la formación de imágenes seleccionado del grupo que consiste en una radiomarca, una enzima, una marca fluorescente, una marca luminiscente, una marca bioluminiscente, una marca magnética, y biotina. En particular, dicho agente para la formación de imágenes es una radiomarca seleccionada del grupo que consiste en: ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}YO , ^{177}Lu , ^{166}Ho , y ^{153}Sm .

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

De acuerdo con otra realización, dicha proteína de unión utilizada de acuerdo con otra realización de la invención posee un patrón de glicosilación humano.

Además, las proteínas de unión, los constructos de anticuerpos y los productos conjugados de anticuerpos utilizados de acuerdo con otra realización de la invención pueden existir en forma de un cristal (en forma cristalina), conservando concretamente la actividad biológica. Dicho cristal es un cristal de liberación controlada farmacéutico libre de portador. En vista de dicha forma cristalina la proteína de unión, el constructo de anticuerpo o el producto conjugado de anticuerpo pueden tener una mayor vida media in vivo que la correspondiente contraparte soluble.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión, una secuencia de aminoácidos del constructo de anticuerpo, y una secuencia de aminoácidos del producto conjugado de anticuerpo como se describe en la presente memoria.

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

Otra realización de la invención también se refiere a una célula anfitriona que comprende semejante vector. En particular, dicha célula anfitriona es una célula procarionta, como por ejemplo *E. coli*; o es una célula eucariota, y se puede seleccionar del grupo que consiste en una célula protista, una célula animal, una célula de planta y una célula fúngica. En particular, dicha célula eucariota es una célula animal seleccionada del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula aviar, y una célula de insecto. Dicha célula anfitriona se selecciona entre células HEK, células CHO, células COS y células de levadura. La célula de levadura puede ser *Saccharomyces cerevisiae* y dicha célula de insecto puede ser una célula Sf9.

Otra realización de la invención también proporciona un método para producir una proteína capaz de unirse a RGM, que comprende cultivar una célula anfitriona como se define en la presente memoria en un medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir una proteína de unión capaz de unirse a RGM.

Otra realización de la invención también se refiere a una proteína producida de acuerdo con dicho método.

Otra realización proporciona una composición para la liberación de una proteína de unión, comprendiendo dicha composición

- (a) una formulación, en donde dicha formulación comprende una proteína producto cristalizada como se define en la presente memoria, y un ingrediente; y
- (b) al menos un portador polimérico.

Dicho portador polimérico puede ser un polímero seleccionado entre uno o más del grupo que consiste en: poli(ácido acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptidos), poli(ésteres), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(b-hidroxibutiratos), poli(caprolactona), poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli((hidroxipropil)metacrilamida, poli[(organo)fosfaceno], poli(orto-ésteres), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico-alquilviniléter, polioles plurónicos, albúmina, alginato, celulosa

y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, mezclas y copolímeros de los mismos.

5 Dicho ingrediente se puede seleccionar del grupo que consiste en albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil-β-ciclodextrina, metoxipoliethylenglicol y polietilenglicol.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar un mamífero que comprende la etapa de administrar al mamífero una cantidad eficaz de la composición se define en la presente memoria.

10 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el producto (en particular, una proteína de unión, un constructo o un producto conjugado como se describe anteriormente en la presente memoria), y un portador farmacéuticamente aceptable.

15 Dicho portador farmacéuticamente aceptable puede funcionar como coadyuvante útil para aumentar la absorción o la dispersión de dicha proteína de unión.

Por ejemplo, dicho coadyuvante es la hialuronidasa.

20 De acuerdo con otra realización, dicho fármaco comprende además al menos un agente terapéutico adicional para el tratamiento de un trastorno en el que la actividad de RGM es perjudicial. Por ejemplo dicho agente se selecciona del grupo que consiste en: un agente terapéutico, un agente para la formación de imágenes, un agente citotóxico, inhibidores de la angiogénesis; inhibidores de la quinasa; bloqueadores de moléculas de co-estimulación; bloqueadores de moléculas de adherencia; anticuerpos anti-citoquinas o fragmentos funcionales de los mismos; metotrexato; ciclosporina; rapamicina; FK506; marcas o indicadores detectables; un antagonista de TNF; un
25 antirreumático; un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriásico, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de sustitución hormonal, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un agonista beta, un esteroide
30 inhalado, una epinefrina o análogo, una citoquina, y un antagonista de citoquina.

La presente invención también se refiere a un método para el tratamiento de un sujeto por un trastorno asociado con la degeneración de CFNR que comprende la etapa de administrar sólo o combinado con otros agentes terapéuticos un producto de la invención (en particular, una proteína de unión, un constructo o un producto conjugado como se ha
35 descrito anteriormente en la presente memoria).

Dicho trastorno comprende concretamente enfermedades seleccionadas del grupo que comprende retinopatía diabética, neuropatía óptica isquémica, retinosquiasis ligada al cromosoma X, neuropatía óptica inducida por fármacos, distrofia de la retina, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedades oculares
40 caracterizadas por drusen en la cabeza del nervio óptico, enfermedad de los ojos caracterizada por determinantes genéticos de degeneración de los fotorreceptores, distrofia de conos y bastones autosómica recesiva, y trastornos mitocondriales con neuropatía óptica.

45 Cualquier enseñanza o referencia al SEQ ID NO: 34 como se describe en la presente memoria se aplica al SEQ ID NO: 9 por analogía.

3. Usos de polipéptidos que se unen a hRGM A

50 Otra realización de la presente solicitud comprende el uso identificado anteriormente de proteínas aisladas o polipéptidos que se unen específicamente a al menos un epítipo de una proteína RGM A. Las proteínas o polipéptidos aislados que se unen específicamente a al menos un epítipo de una proteína RGM A son capaces de inhibir la unión de RGM A a su receptor Neogenina y/o a las proteínas morfogenéticas óseas 2 y 4 (BMP-2, BMP-4), en particular anticuerpos que se unen a RGM A o a porciones de unión a antígeno o fragmentos de los mismos.

55 Los anticuerpos anti-RGM A de la presente invención presentan una alta capacidad para reducir o neutralizar la actividad de RGM A, p. ej., tal como se evaluó mediante uno cualquiera de varios ensayos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica o descritos a continuación.

60 La presente solicitud, en particular, hace uso de anticuerpos monoclonales neutralizadores contra RGM A, que impiden selectivamente la unión de RGM A a su receptor Neogenina y a las proteínas morfogenéticas del hueso 2 y 4 (BMP-2, BMP-4), y la generación de un anticuerpo monoclonal neutralizador contra RGM A, que evita selectivamente la unión de RGM A a sus proteínas morfogenéticas del hueso 2 y 4 (BMP-2, BMP-4) co-receptoras.

En particular, el anticuerpo monoclonal neutralizador de la presente solicitud es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. El término "anticuerpo humano" se refiere a anticuerpos que tienen regiones variables y constantes correspondientes a, o derivadas de, secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (p. ej., véase Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U. S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH Núm. 91-3242, 1991). Los anticuerpos humanos de la presente solicitud, sin embargo, pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y, en particular, la CDR3.

En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal. Se pretende que los ejemplos de anticuerpos neutralizadores de la presente solicitud referidos en la presente memoria como mAb5F9 y mAb8D1 y los fragmentos de anticuerpos funcionales de los mismos, y otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpos funcionales con propiedades equivalentes a mAb5F9 y mAb8D1, tales como una alta afinidad de unión a RGM A con una cinética disociación baja y una alta capacidad de neutralización, sean parte de la presente invención. La afinidad de unión y la tasa de disociación de un anticuerpo anti-RGM A de la presente solicitud a un polipéptido RGM A inmunogénico o fragmento del mismo, se puede determinar por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la afinidad de unión se puede medir por medio de ELISA competitivos, o tecnología RIA, BIAcore o KinExA. La tasa de disociación también se puede medir mediante tecnología BIAcore o KinExA. La afinidad de unión y la tasa de disociación se miden por medio de resonancia de plasmón superficial utilizando, p. ej., un BIAcore.

Uno de los anticuerpos monoclonales de la presente solicitud, el anticuerpo mAb5F9, tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 90% con una secuencia que comprende una región variable de cadena pesada (región VH) que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 9 o 34 y una región variable de cadena ligera (región VL) que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 10.

También se pretende que los anticuerpos monoclonales aislados que interactúan con RGM A de la presente solicitud puedan ser una proteína de unión glicosilada, en donde el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo comprende uno o más residuos de hidratos de carbono. La producción de proteína naciente *in vivo* se puede someter a un procesamiento adicional, conocido como modificación post-traducciona. En particular, se pueden añadir enzimáticamente residuos de azúcares (glicosilo), un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que llevan cadenas laterales de oligosacáridos unidos covalentemente se conocen como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. La glicosilación de proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como de la célula anfitriona en la que se expresa la proteína. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (p. ej., glicosiltransferasas y glicosidasas), y tener diferentes sustratos (azúcares de nucleótidos) disponibles. Debido a estos factores, el patrón de glicosilación de proteínas, y la composición de los residuos de glicosilo, pueden variar en función del sistema del anfitrión en el que se expresa la proteína en particular. Los residuos de glicosilo útiles en la invención pueden incluir, pero no se limitan a, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico. En particular, la proteína de unión glicosilada comprende los residuos de glicosilo de tal manera que el patrón de glicosilación es humano.

Los anticuerpos utilizados de acuerdo con la invención comprenden una región constante de cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, IgY o IgD. Además, el anticuerpo puede comprender una región constante de cadena ligera, o bien una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda. El anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera kappa. Alternativamente, la porción de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena sencilla. Los reemplazos de residuos de aminoácidos en la porción Fc para alterar la función del efector del anticuerpo son conocidos en la técnica (Winter, et al. *Patentes de los Estados Unidos* Núms. 5.648.260; 5.624.821). La porción Fc de un anticuerpo media varias funciones de efectores importantes, p. ej., la inducción de citoquinas, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y tasa de vida media/eliminación de anticuerpos o complejos de antígeno/anticuerpo. En algunos casos las funciones de estos efectores son deseables para el anticuerpo terapéutico pero en otros casos podrían ser innecesarias o incluso perjudiciales, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos de IgG humana, particularmente IgG1 e IgG3, median la ADCC y la CDC a través de la unión a R de Fc γ y C1q del complemento, respectivamente. Los receptores de Fc neonatales (FcRn) son los componentes críticos que determinan la vida media en circulación de los anticuerpos. En otra realización más, se sustituye al menos un residuo de aminoácido en la región constante del anticuerpo, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo, de manera que las funciones del efector del anticuerpo se alteran.

3. Generación de anticuerpos anti-hRGM A

3.1.General

Los anticuerpos de la invención pueden ser generados por la inmunización de un anfitrión adecuado (p. ej., vertebrados, incluyendo seres humanos, ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, vacas, caballos, reptiles, peces,

anfibios, y en huevos de aves, reptiles y peces). Para generar los anticuerpos de la presente solicitud, el anfitrión es inmunizado con un polipéptido RGM A inmunogénico o un fragmento del mismo de la invención. El término "inmunización" se refiere en la presente memoria al proceso de presentación de un antígeno a un repertorio inmunológico si existe ese repertorio en un organismo genéticamente inalterado natural, o un organismo transgénico, incluyendo aquellos modificados para mostrar un repertorio inmunológico humano artificial. Del mismo modo, una "preparación inmunogénica" es una formulación de antígeno que contiene coadyuvantes u otros aditivos que aumentarían la inmunogenicidad del antígeno.

La inmunización de animales se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica. Véase, p. ej., Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Los métodos para la inmunización de animales no humanos tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, vacas y caballos son bien conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., Harlow y Lane y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.994.619. En una realización concreta, el antígeno RGM A se administra con un coadyuvante para estimular la respuesta inmunitaria. Tales coadyuvantes incluyen el coadyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (muramildipéptidos) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Dichos coadyuvantes pueden proteger al polipéptido de la dispersión rápida secuestrándolo en un depósito local o pueden contener sustancias que estimulan al anfitrión para secretar factores que son quimiotácticos para los macrófagos y otros componentes del sistema inmunitario. En particular, si se está administrando un polipéptido, el programa de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, que se distribuyen a lo largo de varias semanas.

Se contempla que el anfitrión animal sea inmunizado con el antígeno asociado con la membrana celular de una célula intacta o desorganizada y los anticuerpos de la presente solicitud se identifican por su unión a un polipéptido inmunogénico de la invención. Después de la inmunización del anfitrión animal con el antígeno, los anticuerpos pueden ser obtenidos del animal. El suero que contiene los anticuerpos se obtiene del animal por sangrado o sacrificio del animal. El suero se puede utilizar tal como se obtiene del animal, se puede obtener una fracción de inmunoglobulina a partir del suero, o los anticuerpos se pueden purificar a partir del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidos de este modo son policlonales, teniendo así una matriz heterogénea de propiedades.

3.2 Anticuerpos monoclonales anti-RGM A utilizando la tecnología del hibridoma

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando una amplia variedad de mecanismos conocidos en la técnica, incluyendo el uso de tecnologías de hibridomas, recombinantes, y de presentación en fagos, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando tecnologías de hibridoma incluyendo aquellas conocidas en la técnica y se ilustran, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, y, en al., en *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y. 1981) (dichas referencias incorporadas como referencia en su totalidad). El término "anticuerpo monoclonal" según se utiliza en la presente memoria no se limita a 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 procariontario, eucariótico o de fago, y no al método por el cual se produce.

Los métodos para producir y escrutar anticuerpos específicos utilizando tecnología del hibridoma son rutinarios y bien conocidos en la técnica. En una realización, la presente invención proporciona métodos para generar anticuerpos monoclonales así como anticuerpos producidos por el método que comprende cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la invención en donde, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados a partir de un ratón inmunizado con un antígeno de la invención con células de mieloma y después escrutando los hibridomas resultantes de la fusión para determinar los clones del hibridoma que segregan un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la invención. Brevemente, los ratones pueden ser inmunizados con un antígeno RGM A. En otra realización, el antígeno RGM A se administra con un coadyuvante para estimular la respuesta inmunitaria. Dichos coadyuvantes incluyen coadyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (muramildipéptidos) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Dichos coadyuvantes pueden proteger el polipéptido de la dispersión rápida secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al anfitrión para que secrete factores que son quimiotácticos para macrófagos y otros componentes del sistema inmunitario. Si se está administrando un polipéptido, el programa de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, distribuidas a lo largo de varias semanas.

Una vez que se detecta una respuesta inmunitaria, p. ej., se detectan anticuerpos específicos para el antígeno RGM A en el suero de ratón, el bazo del ratón se cosecha y los esplenocitos se aíslan. Los esplenocitos se fusionan a continuación mediante mecanismos bien conocidos a cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo células de la línea celular SP20 disponible en la ATCC. Los hibridomas se seleccionan y se clonan por dilución limitante. Los clones de hibridomas se someten a ensayo después por métodos conocidos en la técnica para determinar las células que segregan anticuerpos capaces de unirse a RGM A. El líquido ascítico, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, se puede generar mediante la inmunización de ratones con clones de hibridoma positivos.

En otra realización, se pueden preparar hibridomas inmortalizados productores de anticuerpos a partir del animal inmunizado. Después de la inmunización, se sacrifica el animal y las células B del bazo se fusionan con células de mieloma inmortalizadas como es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, más arriba. En otra realización, las células de mieloma no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora).

5 Después de la fusión y la selección con antibiótico, los hibridomas se escrutan utilizando RGM A, o una porción de la misma, o una célula que expresa RGM A. En otra realización, el escrutinio inicial se realiza utilizando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), un ELISA. Un ejemplo de escrutinio por ELISA se proporciona en el documento WO 00/37504, incorporada a la presente memoria como referencia.

10 Los hibridomas productores de anticuerpos anti- RGM A se seleccionan, se clonan y, adicionalmente se escrutan para determinar las características deseables, incluyendo el crecimiento robusto del hibridoma, la producción alta de anticuerpos y características deseables de los anticuerpos, como se discute más adelante. Los hibridomas se pueden cultivar y ampliar *in vivo* en animales singénicos, en animales que carecen de un sistema inmunológico, p. ej., ratones carentes de sistema inmunológico, o en cultivo celular *in vitro*. Los métodos de selección, clonación y expansión de hibridomas son bien conocidos para los expertos en la técnica.

15 En una realización concreta, los hibridomas son hibridomas de ratón, como se describió anteriormente. En otra realización concreta, los hibridomas se producen en una especie no humana, no de ratón tal como rata, oveja, cerdo, cabra, vaca o caballo. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos, en los que un mieloma no secretor humano se fusiona con una célula humana que expresa un anticuerpo anti-RGM A.

20 Los fragmentos de anticuerpos que reconocen epítomos específicos se pueden generar por medio de técnicas conocidas. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CHI de la cadena pesada.

3.3 Anticuerpos monoclonales anti-RGM A utilizando SLAM

30 En otro aspecto de la invención, los anticuerpos recombinantes se generan a partir de linfocitos individuales, aislados utilizando un procedimiento denominado en la técnica método de anticuerpos de linfocitos seleccionados (SLAM), como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.627.052, en la Publicación PCT WO 92/02551y en Babcock, J. S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-7848. En este método, las células individuales que secretan anticuerpos de interés, p. ej., linfocitos derivados de cualquiera de los animales

35 inmunizados descritos anteriormente, son escrutadas utilizando un ensayo de placa hemolítica específica del antígeno, en donde el antígeno RGM A, una subunidad de RGM A, o una fragmento del mismo, está acoplado a glóbulos rojos de oveja usando un conector, tal como biotina, y se utiliza para identificar células individuales que secretan anticuerpos con especificidad para RGM A. Después de la identificación de las células que secretan el anticuerpo de interés, se rescatan los ADNc de la región variable de la cadena pesada y ligera de interés de las

40 células por medio de transcriptasa inversa-PCR y estas regiones variables se pueden expresar a continuación, en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (p. ej., regiones constantes humanas), en células anfitrionas de mamífero, tales como células COS o CHO. Las células anfitrionas transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, derivadas de linfocitos seleccionados *in vivo*, pueden someterse a continuación a más análisis y selección *in vitro*, por ejemplo mediante selección de las células transfectadas para aislar células que expresan anticuerpos para RGM A. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas pueden manipularse

45 adicionalmente *in vitro*, tal como métodos de maduración de afinidad *in vitro* tales como los descritos en la Publicación PCT WO 97/29131 y la Publicación PCT WO 00/56772.

3.4 Anticuerpos monoclonales anti-RGM A utilizando animales transgénicos

50 En otra realización de la presente invención, los anticuerpos son producidos por inmunización de un animal no humano que comprende algunos, o todos, los loci de inmunoglobulina humana con un antígeno RGM A. En una realización concreta, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón modificada genéticamente que comprende grandes fragmentos de los loci de inmunoglobulina humana y es deficiente en la

55 producción de anticuerpos de ratón. Véanse, p. ej., Green et al. Nature genetics 7: 13-21 (1994) y las Patentes de los Estados Unidos 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598 y 6.130.364. Véanse también el documento WO 91/10741, publicado el 25 de Julio de 1991, el documento WO 94/02602, publicado el 3 de Febrero de 1994, el documento WO 96/34096 y el documento WO 96/33735, ambos publicados el 31 de Octubre de 1996, el documento WO 98/16654, publicado el 23 de Abril de 1998, el documento WO 98/24893,

60 publicado el 11 de Junio de 1998, el documento WO 98/50433, publicado el 12 de Noviembre de 1998, el documento WO 99/45031, publicado el 10 de Septiembre de 1999, el documento WO 99/53049, publicado el 21 de Octubre de 1999, el documento WO 00 09560, publicado el 24 de Febrero de 2000 y el documento WO 00/037504, publicado el 29 de Junio de 2000. El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos totalmente humanos, y genera Mab humanos específicos de antígenos. El ratón transgénico

XENOMOUSE contiene aproximadamente 80% del repertorio de anticuerpos humanos mediante la introducción de fragmentos YAC con configuración de la línea germinal de tamaño de megabases, de los loci de cadena pesada humana y x loci de la cadena ligera. Véase Mendez et al., Nature Genetic 15: 146-156 (1997), Green y Jakobovits J. Exp. Med. 188: 483-495 (1998), cuyas descripciones se incorporan a la presente como referencia.

3.5 Anticuerpos monoclonales anti-RGM A utilizando bibliotecas de anticuerpos recombinantes

También se pueden utilizar métodos *in vitro* para elaborar los anticuerpos de la invención, en donde una biblioteca de anticuerpos se escruta para identificar un anticuerpo que tiene la especificidad de unión deseada. Los métodos para tal escrutinio de bibliotecas de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica e incluyen los métodos descritos, por ejemplo, por Ladner et al. Patente de los Estados Unidos Núm. 5.223.409; Kang et al. Publicación PCT Núm. WO 92/18619; Dower et al. Publicación PCT Núm. WO 91/17271; Winter et al. Publicación PCT Núm. WO 92/20791; Markland et al. Publicación PCT Núm. WO 92/15679; Breitling et al. Publicación PCT Núm. WO 93/01288; McCafferty et al. Publicación PCT Núm. WO 92/01047; Garrard et al. Publicación PCT Núm. WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) BiolTechnology 9: 1370-1372; Hay et al. (1992) Hum Antibody Hybridomas 3: 81-85; Huse et al. (1989) Science 246: 1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348: 552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12: 725-734; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226: 889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352: 624-628; Gram et al. (1992) PNAS 89: 3576-3580; Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19: 4133-4137; y Barbas et al. (1991) PNAS 88: 7978-7982, Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos 20030186374, y Publicación PCT Núm. WO 97/29131, los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan a la presente memoria como referencia.

La biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto inmunizado con RGM A, o una porción de RGM A. Alternativamente, la biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto no sometido a tratamiento previo, es decir, uno que no ha sido inmunizado con RGM A, tal como una biblioteca de anticuerpos humanos de un sujeto humano que no ha sido inmunizado con RGM A humana. Los anticuerpos de la invención se seleccionan mediante el escrutinio de la biblioteca de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende RGM A humana para seleccionar de ese modo los anticuerpos que reconocen RGM A. Los métodos para la realización de dicho escrutinio y selección son bien conocidos en la técnica, tal como se describe en las referencias del párrafo anterior. Para seleccionar anticuerpos de la invención que tienen afinidades de unión concretas para hRGM A, tales como los que se disocian de una RGM A humana con un constante de velocidad k_{off} concreta, se puede utilizar el método conocido en la técnica de resonancia de plasmón superficial para seleccionar anticuerpos que tienen la constante de velocidad k_{off} deseada. Para seleccionar los anticuerpos de la invención que tienen una actividad neutralizadora concreta para hRGM A, tales como aquellos con una CI_{50} concreta, se pueden utilizar métodos convencionales conocidos en la técnica para evaluar la inhibición de la actividad de hRGM A.

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

Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención también pueden generarse utilizando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se muestran sobre la superficie de partículas de fagos que llevan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, tal fago se puede utilizar para mostrar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (p. ej., humano o murino). El fago que expresa un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés se puede seleccionar o identificar con antígeno, p. ej., utilizando un antígeno marcado o un antígeno unido o capturado en una superficie sólida o cuenta. Los fagos usados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos que incluyen dominios de unión fd y M13 expresados a partir del fago con dominios de anticuerpos Fab, Fv o Fv estabilizado con disulfuro fusionados recombinantemente a la proteína del gen III o del gen VIII del fago. Los ejemplos de los métodos de presentación en fagos que se pueden utilizar para elaborar los anticuerpos de la presente invención incluyen los descritos en Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182: 41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184: 177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24: 952-958 (1994); Persic et al., Gene 187 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57: 191-280 (1994); Solicitud PCT Núm. PCT/GB91/01134; Publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108; cada uno de los cuales se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección de los fagos, las regiones codificantes del anticuerpo del fago se pueden aislar y utilizar para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y se pueden expresar en cualquier anfitrión deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias, p. ej., como se describe con detalle a continuación. Por ejemplo, las técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y

F(ab')₂ también se pueden emplear utilizando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la Publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques* 12(6): 864-869 (1992); y Sawai et al., *AJRI* 34: 26-34 (1.995); y Better et al., *Science* 240: 1041-1043 (1988) (dichas referencias incorporadas como referencia en su totalidad). Los ejemplos de las técnicas que se pueden utilizar para producir Fv de cadena sencilla y anticuerpos incluyen los descritos en las Patentes de los Estados Unidos 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., *Methods in Enzymology* 203: 46-88 (1991); Shu et al., *PNAS* 90: 7995-7999 (1993); y Skerra et al., *Science* 240: 1038-1040 (1988).

Como alternativa al escrutinio de bibliotecas de anticuerpos recombinantes mediante presentación en fagos, se pueden aplicar otras metodologías conocidas en la técnica para el escrutinio de grandes bibliotecas combinatorias a la identificación de anticuerpos de especificidad dual de la invención. Un tipo de sistema de expresión alternativo es uno en el que la biblioteca de anticuerpos recombinantes se expresa como fusiones de ARN-proteína, como se describe en Publicación PCT Núm. WO 98/31700 de Szostak y Roberts, y en Roberts, R. W. y Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12297-12302. En este sistema, se crea una fusión covalente entre un ARNm y el péptido o proteína que codifica por medio de traducción *in vitro* de ARNm sintéticos que llevan puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, en su extremo 3'. Por lo tanto, un ARNm específico se puede enriquecer a partir de una mezcla compleja de ARNm (*p. ej.*, una biblioteca combinatoria) basándose en las propiedades del péptido o proteína codificados, *p. ej.*, anticuerpo, o porción del mismo, tal como la unión del anticuerpo, o porción del mismo, al antígeno de especificidad dual. Las secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos, o porciones de los mismos, recuperadas del escrutinio de tales bibliotecas se pueden expresar por medios recombinantes como se describe anteriormente (*p. ej.*, en células anfitrionas de mamíferos) y, además, se pueden someter a una mayor maduración de afinidad por cualquier rondas adicional de escrutinio de fusiones de ARNm-péptido en las que las mutaciones se han introducido en las secuencias seleccionadas originalmente, o por otros métodos para la maduración de afinidad *in vitro* de anticuerpos recombinantes, como se ha descrito anteriormente.

En otro enfoque los anticuerpos de la presente invención también pueden generarse usando métodos de presentación en levadura conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en levadura, los métodos genéticos se utilizan para fijar dominios de anticuerpos a la pared celular de levadura y presentarlos en la superficie de la levadura. En particular, dicha levadura se puede utilizar para presentar dominios de unión a antígenos expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (*p. ej.*, humana o murina). Los ejemplos de los métodos de presentación en levadura que se pueden utilizar para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen los descritos por Wittrup, et al. en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.699.658 incorporada a la presente memoria como referencia.

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

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser producidos por cualquiera de una serie de mecanismos conocidos en la técnica. Por ejemplo, expresión en células anfitrionas, en donde el vector (o vectores) de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras es (o son) transfectedo a una célula anfitriona mediante técnicas convencionales. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" abarquen una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula anfitriona procariótica o eucariótica, *p. ej.*, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar los anticuerpos de la invención en cualquiera de las células anfitrionas procarióticas o eucarióticas, la expresión de anticuerpos en células eucarióticas es de interés, y de mayor interés en las células anfitrionas de mamífero, debido a que es más probable que tales células eucarióticas (y, en particular las células de mamífero) ensamblen y secreten un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo que las células procarióticas.

Las células anfitrionas de mamífero concretas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas por Urlaub y Chasin, (1980) en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220, utilizadas con un marcador DHFR seleccionable, *p. ej.*, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159: 601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos se introducen en células anfitrionas de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células anfitrionas durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células anfitrionas o, más concretamente, la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se cultivan las células anfitrionas. Los anticuerpos pueden ser recuperados del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteínas convencionales.

Las células anfitrionas también se pueden utilizar para producir fragmentos de anticuerpos funcionales, tales como fragmentos Fab o moléculas de tipo scFv. Se entenderá que las variaciones sobre el procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula anfitriona con fragmentos funcionales que codifican el ADN de la cadena ligera y/o de la cadena pesada de un anticuerpo de esta invención. La tecnología de ADN recombinante también se puede utilizar para eliminar algo o la totalidad del ADN que codifica una o ambas cadenas ligeras y pesadas que no es necesario para la unión a los antígenos de interés.

5 Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncadas también están abarcadas por los anticuerpos de la invención. Además, se pueden producir anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una ligera son un anticuerpo de la invención y la otra cadena pesada y ligera son específicas para un antígeno distinto de los antígenos de interés mediante entrecruzamiento de un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo por medio de métodos de entrecruzamiento químico convencional.

10 En un sistema concreto para la expresión recombinante de un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de la invención, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo se introduce en células CHO dhfr- mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo están cada una conectadas operativamente a elementos reguladores potenciador de CMV/promotor de AdMLP para conducir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células anfitrionas transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Se utilizan técnicas convencionales de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células anfitrionas, seleccionar los transformantes, cultivar las células anfitrionas y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. También adicionalmente la invención proporciona un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la invención cultivando una célula anfitriona de la invención en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetiza un anticuerpo recombinante de la invención. El método puede comprender adicionalmente aislar el anticuerpo recombinante del medio de cultivo.

4.1 Anticuerpos anti RGM A

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

Tabla 5: Lista de secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos anti-hRGM A5F9 y 8D1

SEQ ID No.	Región de la proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
34	VH 5F9		EVQLVESGGGLVQPGSSSLKLSCVASGFTFS NYGMNWIRQAPKKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTTISRDNKNTLYLEMNSLRSED TAIYYCAKGTTPDYWGQGMVTVSS
57	VH 5F9 CDR-H1	Residuos 31-35 del SEQ ID NO.:34	NYGMN
58	VH 5F9 CDR-H2	Residuos 50-66 del SEQ ID NO.:34	MIYYDSSEKHYADSVKG
59	VH 5F9 CDR-H3	Residuos 99-104 del SEQ ID NO.:34	GTTPDY
10	VL 5F9		DVVLVLTQTPVSLSVTLGDAQSMSCRSSQSLE YSDGYTFLEWFLQKPGQSPQLLIYEVSNRFF SGVPPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGV YYCFQATHDPLTFGSGTKLEIKR
60	VL 5F9 CDR-L1	Residuos 24-39 del SEQ ID NO.:10	RSSQSLEYSYSDGYTFLE
61	VL 5F9 CDR-L2	Residuos 55-61 del SEQ ID NO.:10	EVSNRFFS
62	VL 5F9 CDR-L3	Residuos 94-102 del SEQ ID NO.:10	FQATHDPLT
55	VH 8D1		EVQLQQSGPELVKPGTQSVKMSCKTSGYTF SYVMHWVKQKPGGLEWIGYIIPYNDNTKY NEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSED SAVYYCARRNEYYGSSFFDYWGQGTTLTVS S
63	VH 8D1 CDR-H1	Residuos 31-35 del SEQ ID NO.:55	SYVMH
64	VH 8D1 CDR-H2	Residuos 50-66 del SEQ ID NO.:55	YIIPYNDNTKYNEKFKG
65	VH 8D1 CDR-H3	Residuos 97-110 del SEQ ID NO.:55	ARRNEYYGSSFFDY
56	VL 8D1		DIQMTQSPASLSASLEETVITITCQASQDID NYLAWYHQKPGKSPRLLIYGATNLADGVPS RFGSGRSQTQFSLKINRLQIEDLGIYYCLO GYIPPRTFGGGKLELKR
66	VL 8D1 CDR-L1	Residuos 24-34 del SEQ ID NO.:56	QASQDIDNYLA
67	VL 8D1 CDR-L2	Residuos 50-56 del SEQ ID NO.:56	GATNLAD
68	VL 8D1 CDR-L3	Residuos 89-97 del SEQ ID NO.:56	LQGYIPPRT

Las secuencias de CDR del anticuerpo anti-RGM aislado anterior establecen una nueva familia de proteínas de unión a RGM A, aisladas de acuerdo con esta invención. Para generar y seleccionar las CDR de la invención que tienen una actividad de unión y/o neutralización a RGM A concreta con respecto a hRGM A, se pueden utilizar métodos convencionales conocidos en la técnica para generar proteínas de unión de la presente invención y evaluar

las características de unión y/o neutralización de RGM A de esas proteínas de unión, incluyendo pero no limitadas a las descritos específicamente en la presente memoria.

4.2 Anticuerpos anti-RGM A quiméricos

5 Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo derivan de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., Morrison, Science 229: 1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4: 214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125: 191-202; Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.807.715; 4,816,567; y 4.816.397, que se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad. Además, se pueden utilizar las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312: 604 hasta 608; Takeda et al., 1985, Nature 314: 452-454 que se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad) mediante corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad antigénica apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada.

En una realización, los anticuerpos quiméricos de la invención se producen mediante la sustitución de la región constante de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales murinos anti-RGM A humana descritos en la presente memoria por una región constante de IgG1 humana.

4.3 Anticuerpos injertados con CDR anti RGM A

25 Los anticuerpos injertados con CDR de la invención comprenden secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano en donde una o más de las regiones CDR de V_H y/o V_L se sustituyen por secuencias de CDR de anticuerpos no humanos, como por ejemplo, anticuerpos murinos de la invención. Una secuencia marco de cualquier anticuerpo humano puede servir como molde para el injerto de CDR. Sin embargo, el reemplazo de cadena lineal en uno de tales marcos a menudo conduce a una cierta pérdida de afinidad de unión al antígeno. Cuanto más homólogo es un anticuerpo humano al anticuerpo murino original, menos probable es la posibilidad de que la combinación de las CDR murinas con el marco humano introduzcan distorsiones en las CDR que pudieran reducir la afinidad. Por lo tanto, es de interés particular que el marco variable humano que se elija para reemplazar el marco variable de ratón aparte de las CDR tenga una identidad de secuencia de al menos 65% con el marco de la región variable del anticuerpo murino. Es de mayor interés particular que las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDR tengan al menos una identidad de secuencia de al menos 70%. Es de un interés aún más particular que las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDR tengan una identidad de secuencia de al menos 75%. Es de un mayor interés particular, que las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDR tengan una identidad de secuencia de al menos 80%. Los métodos para producir anticuerpos injertados con CDR son conocidos en la técnica (Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Patente de los Estados Unidos Núm. 5.225.539). En una realización específica, la invención proporciona anticuerpos injertados con CDR con cadenas V_H y/o V_L como se describe en la Tabla 6.

TABLA 6: Anticuerpos injertados con CDR

SEQ ID No.	Región de la proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
35 (15) (16) (17) (18)	VH-GL 5F9.1 (VH3-48 / JH3 FR1) (VH3-48 / JH3 FR2) (VH3-48 / JH3 FR3) (VH3-48 / JH3 FR4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEWV SMIYYDSSEKHY ADSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMN SLRDED TAVYYCARG TPDY WGQGTMTVSS
36 (15) (16) (17) (19)	VH-GL 5F9.2 (VH3-48 / JH4 FR1) (VH3-48 / JH4 FR2) (VH3-48 / JH4 FR3) (VH3-48 / JH4 FR4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEWV SMIYYDSSEKHY ADSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMN SLRDED TAVYYCARG TPDY WGQGLTVTSS
37 (15) (16) (17) (20)	VH-GL 5F9.3 (VH3-48 / JH6 FR1) (VH3-48 / JH6 FR2) (VH3-48 / JH6 FR3) (VH3-48 / JH6 FR4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEWV SMIYYDSSEKHY ADSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMN SLRDED TAVYYCARG TPDY WGQGTMTVSS

SEQ ID No.	Región de la proteína	Secuencia
38 (21) (22) (23) (18)	VH 5F9.4-GL (VH3-33 / JH3 FR1) (VH3-33 / JH3 FR2) (VH3-33 / JH3 FR3) (VH3-33 / JH3 FR4)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEWV AMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARG TTPDY WGQGMVTVSS
39 (21) (22) (23) (19)	VH-GL 5F9.5 (VH3-33 / JH4 FR1) (VH3-33 / JH4 FR2) (VH3-33 / JH4 FR3) (VH3-33 / JH4 FR4)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEWV AMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARG TTPDY WGQGLVTVSS
40 (21) (22) (23) (20)	VH-GL 5F9.6 (VH3-33 / JH6 FR1) (VH3-33 / JH6 FR2) (VH3-33 / JH6 FR3) (VH3-33 / JH6 FR4)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEWV AMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARG TTPDY WGQGTVTVSS
41 (24) (25) (26) (18)	VH 5F9.7-GL (VH3-23 / JH3 FR1) (VH3-23 / JH3 FR2) (VH3-23 / JH3 FR3) (VH3-23 / JH3 FR4)	EVQLLES GG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEWV SMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK GTPDY WGQGMVTVSS
42 (24) (25) (26) (19)	VH 5F9.8-GL (VH3-23 / JH4 FR1) (VH3-23 / JH4 FR2) (VH3-23 / JH4 FR3) (VH3-23 / JH4 FR4)	EVQLLES GG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEWV SMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK GTPDY WGQGLVTVSS
43 (24) (25) (26) (20)	VH 5F9.9-GL (VH3-23 / JH6 FR1) (VH3-23 / JH6 FR2) (VH3-23 / JH6 FR3) (VH3-23 / JH6 FR4)	EVQLLES GG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEWV SMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK GTPDY WGQGTVTVSS
44 (27) (28) (29) (30)	VL 5F9.1-GL (A18 / JK2 FR1) (A18 / JK2 FR2) (A18 / JK2 FR3) (A18 / JK2 FR4)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQS LE YSDGYTFLEWYLQKPGQSPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKIISRVEAEDVGV YYCF QATHDPLT FGQGTKLEIKR
45 (31) (32) (33) (30)	VL 5F9.2-GL (A17 / JK2 FR1) (A17 / JK2 FR2) (A17 / JK2 FR3) (A17 / JK2 FR4)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQS LE YSDGYTFLEWFQQRPGQSPRRLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKIISRVEAEDVGV YYCF QATHDPLT FGQGTKLEIKR
46 (31) (28) (29) (30)	VL 5F9.3-GL (A17 / JK2 FR1) (A18 / JK2 FR2) (A18 / JK2 FR3) (A18 / JK2 FR4)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQS LE YSDGYTFLEWYLQKPGQSPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKIISRVEAEDVGV YYCF QATHDPLT FGQGTKLEIKR

Las secuencias de CDR derivadas del mAb 5F9 se indican en negrita. También se hace referencia a las secuencias marco específicas (FR1 a FR4) indicando los correspondientes SEQ ID NO. (véanse también las Tablas 3 y 4)

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que se une al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las especies no humanas y regiones de marco de una molécula de inmunoglobulina humana. Las secuencias de Ig humanas conocidas se describen, p. ej., en www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/m-ikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immuno-logy.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/about.hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/about.yasuhito-Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/about.jraats/links.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/about.honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caawg/caawg.htm; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/about.fmolina/Webpages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr/roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), cada una incorporada a la presente memoria en su totalidad como referencia. Tales secuencias importados se pueden utilizar para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, afinidad, la velocidad de asociación, la velocidad de disociación, la avididad, la especificidad, la vida media, o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica.

Los residuos del marco en las regiones marco humanas pueden ser sustituidos por el correspondiente residuo del anticuerpo donador de CDR para alterar, en particular mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones del marco se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., mediante modelado de las interacciones de residuos de las CDR y del marco para identificar residuos del marco importantes para la unión al antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos del marco inusuales en posiciones concretas. (Véanse, p. ej., Queen et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.585.089; Riechmann et al., Nature 332: 323 (1988), que se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad). Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias consenso e importadas de manera que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como una mayor afinidad por el antígeno o los antígenos diana. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en influir en la unión al antígeno. Los anticuerpos pueden humanizarse utilizando una variedad de mecanismos conocidos en la técnica, tales como, pero no limitados a los descritos por Jones et al., Nature 321: 522 (1986); Verhoeyen et al., Science 239: 1534 (1988); Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901 (1987); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151: 2623 (1993); Padlan, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6): 805-814 (1994); Roguska. et al., PNAS 91: 969-973 (1994); publicación PCT WO 91/09967, PCT/US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592,106; EP 519,596, EP 239,400, Patente de los Estados Unidos Núms. 5.565.332, 5.723.323, 5.976.862, 5.824.514, 5.817.483, 5.814.476, 5.763.192, 5.723.323, 5.766.886, 5.714.352, 6.204.02, 6.180.370, 5.693.762, 5.530.101, 5.585.089, 5.225.53; 4.816.567, cada una incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad, incluyendo las referencias citadas en las mismas.

5. Realizaciones adicionales de anticuerpos de la invención

5.1 Anticuerpos Fusión e inmunoadhesinas

La presente solicitud también describe un anticuerpo de fusión o inmunoadhesina que puede prepararse que comprende la totalidad o una parte de un anticuerpo RGM A de la presente solicitud conectado a otro polipéptido. En algunas realizaciones, solo la región variable del anticuerpo RGM A está conectada al polipéptido. En otras realizaciones, el dominio VH de un anticuerpo RGM A de esta solicitud está conectado a un primer polipéptido, mientras el dominio VL del anticuerpo está conectado 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 otras realizaciones, el dominio VH se separa del dominio VL por medio de un conector que permite

que los dominios VH y VL interactúen entre sí (véase a continuación Anticuerpos de cadena sencilla). El anticuerpo VH -conector- VL se conecta a continuación a un polipéptido de interés. El anticuerpo de fusión es útil para dirigir un polipéptido a una célula o tejido que expresa un RGM A. El polipéptido de interés puede ser un agente terapéutico, tal como una toxina, o puede ser un agente de diagnóstico, tal como una enzima; que pueden ser fácilmente visualizados, por ejemplo mediante peroxidasa de rábano picante. Además, se pueden crear anticuerpos de fusión en los que dos (o más) anticuerpos de cadena sencilla se conectan entre sí. Esto es útil si se quiere crear un anticuerpo divalente o polivalente en una cadena polipeptídica sencilla, o si se quiere crear un anticuerpo biespecífico.

Una realización proporciona una proteína de unión marcada en donde un anticuerpo o porción de anticuerpo de la presente solicitud se derivatiza o conecta a otra molécula funcional (p. ej., otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de unión marcada de la presente solicitud se puede obtener conectando funcionalmente un anticuerpo o porción de anticuerpo de la presente solicitud (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares, tales como un ácido nucleico, otro anticuerpo (p. ej., un anticuerpo biespecífico o un díacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

Los agentes detectables útiles con los que un anticuerpo o porción de anticuerpo de la presente solicitud se pueden derivatizar incluyen compuestos fluorescentes. Los agentes fluorescentes detectables ilustrativos incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. Un anticuerpo también puede ser derivatizado con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo se derivatiza con una enzima detectable, ésta se detecta mediante la adición de reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando el agente detectable peroxidasa de rábano picante está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también se puede derivatizar con un ácido nucleico, biotina, y detectar a través de medición indirecta de la unión a avidina o estreptavidina.

5.2 Anticuerpos de cadena sencilla

La presente solicitud incluye un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) que se une a un inmunógeno RGM A de la invención. Para producir el scFv, ADN que codifica VH y V se conecta operativamente al ADN que codifica un conector flexible, p. ej., que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser), de manera que las secuencias de VH y VL pueden expresarse como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones VL y VH unidas por el conector flexible (véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; McCafferty et al., 30 Nature (1990) 34 8: 552-554). El anticuerpo de cadena sencilla puede ser monovalente, si solo se utilizan una VH y una VL sencillas, bivalente, si se utilizan dos VH y VL, o polivalente, si se utilizan más de dos VH y VL. Dos de dichos fragmentos scFv acoplados a través de un conector se denominan "díacuerpo", cuya forma también es abarcada por la invención.

5.3 Anticuerpos biespecíficos

La presente solicitud incluye, adicionalmente, un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo en el que una especificidad es para un polipéptido RGM A inmunogénico de la presente solicitud. Por ejemplo, se puede generar un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a un polipéptido RGM A inmunogénico de la invención a través de un dominio de unión y a una segunda molécula a través de un segundo dominio de unión. Además, se puede generar un anticuerpo de cadena sencilla que contiene más de una VH y VL que se une específicamente a un polipéptido inmunogénico de la invención y a otra molécula que se asocia con la atenuación del colapso del cono de crecimiento mediado por mielina y la inhibición del crecimiento y la brotación de neuritas. Tales anticuerpos biespecíficos pueden generarse utilizando técnicas que son bien conocidas por ejemplo, Fanger et al. Immunol Methods 4: 72-81 (1994) y Wright y Harris, 20 (supra).

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

5.4 Anticuerpos derivatizados y marcados

Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la presente solicitud pueden ser derivatizados o conectados a otra molécula (p. ej., otro péptido o proteína). En general, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se derivatizan de tal manera que la unión a un polipéptido inmunogénico de la invención no se ve afectada negativamente por la derivación o el marcaje.

Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la presente solicitud puede ser unido funcionalmente (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (p. ej., un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un reactivo de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que pueden mediar la asociación del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina). También adicionalmente, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadherencia más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con uno o más de otros o diferentes proteínas o péptidos. Los ejemplos de tales moléculas de inmunoadherencia incluyen el uso de la región central de estreptavidina para preparar una molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para preparar moléculas de scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov et al. (1994) *Molecular Immunology* 31:1047-1058). Se pueden preparar porciones de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Por otra parte, se pueden obtener anticuerpos, porciones de anticuerpo y moléculas de inmunoadherencia utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales.

Se puede producir un anticuerpo derivatizado mediante entrecruzamiento de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, p. ej., para crear anticuerpos biespecíficos). Los agentes de entrecruzamiento adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos claramente reactivos separados por un espaciador apropiado (p. ej., éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) o homobifuncionales (p. ej., suberato de disuccinimidilo). Tales conectores están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.

Un anticuerpo derivatizado también puede ser un anticuerpo marcado. Por ejemplo, los agentes de detección con los que un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se pueden derivatizar son compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamino-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, fósforos que contienen lantánidos y similares. Un anticuerpo también puede marcarse con enzimas que son útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano picante, galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. En realizaciones que están marcadas 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 diaminobencidina. Un anticuerpo también puede marcarse con biotina y detectarse a través de medición indirecta de la unión a avidina o estreptavidina. Un anticuerpo también puede marcarse con un epítipo de polipéptido predeterminado reconocido por un informador secundario (p. ej., secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas epítópicas). Un anticuerpo contra RGM A o un fragmento de antígeno del mismo también se pueden marcar con un aminoácido radiomarcado. El radiomarcador puede usarse tanto para fines diagnósticos como terapéuticos. El anticuerpo contra RGM A radiomarcado se puede utilizar para el diagnóstico, por ejemplo, para la determinación de los niveles del receptor RGM A en un sujeto. Además, la anticuerpo contra RGM A radiomarcado se puede utilizar terapéuticamente para el tratamiento de lesiones de la médula espinal.

Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes radioisótopos o radionucleótidos ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁷⁷Lu, ¹⁶⁶Ho, ¹⁵³Sm. Un anticuerpo contra RGM A 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, p. ej., para aumentar la vida media en suero o para aumentar la unión a tejidos. Además, una marca para polipéptidos puede incluir un ácido nucleico, por ejemplo ADN para la detección por PCR, o la mejora de la expresión génica, o ARNip para suprimir la expresión de genes en células o tejidos que portan RGM A.

La clase y subclase de anticuerpos contra RGM A se pueden determinar mediante cualquier método conocido en la técnica. En general, la clase y subclase de un anticuerpo se pueden determinar usando anticuerpos que son específicos para una clase y subclase de anticuerpo concreto. Tales anticuerpos están disponibles comercialmente. La clase y subclase se pueden determinar mediante ELISA, transferencia Western, así como otras técnicas. Alternativamente, la clase y subclase se pueden determinar mediante secuenciación de todo o una porción de los dominios constantes de las cadenas pesada y/o ligera de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de diversas clases y subclases de inmunoglobulinas, y determinando la clase y subclase de los anticuerpos.

5.5 Inmunoglobulinas de dominio variable dual

Las proteínas de unión de dominio variable dual (DVD) o inmunoglobulinas según se utiliza en la presente memoria, son proteínas que comprenden dos o más sitios de unión a antígeno y que son proteínas de unión multivalentes, como por ejemplo divalentes y tetravalentes. El término "proteína de unión multivalente" se utiliza en esta memoria para indicar una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión a antígeno. La proteína de unión

multivalente está diseñada concretamente para tener las dos o más sitios de unión a antígeno, y generalmente no es un anticuerpo de origen natural. El término "proteína de unión multiespecífica" se refiere a una proteína de unión capaz de unirse a dos o más dianas relacionadas o no relacionadas. Tales DVD pueden ser monoespecíficos, es decir capaces de unirse a un antígeno o multiespecíficos, es decir, capaces de unirse a dos o más antígenos. Las proteínas de unión de DVD que comprenden dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos de DVD de cadena ligera hacen referencia a una Ig de DVD. Cada mitad de una Ig de DVD comprende un polipéptido de DVD de cadena pesada, y un polipéptido de DVD cadena ligera, y dos sitios de unión al antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera con un total de 6 CDR que participan en la unión al antígeno por sitio de unión al antígeno. Las proteínas de unión de DVD y métodos de fabricación de las proteínas de unión de DVD se describen en las Solicitudes de Patente de los estados Unidos Núm. 11/507050 y se incorporan a la presente memoria como referencia. Se pretende que la presente invención comprenda una proteína de unión de DVD que comprende proteínas de unión capaces de unirse a RGM A. Particularmente, la proteína de unión de DVD es capaz de unirse RGM A y a una segunda diana. La segunda diana se selecciona del grupo que consiste en las actividades de MAB antiinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18, IL-23, TNF alfa/beta, IFN-beta, gamma, LIF, OSM, CNTF, PF-4, Proteína básica plaquetaria (PBP), NAP-2, beta-TG, MIP-1, MCP2/3, RANTES, linfotactina), de proteínas mediadoras del transporte (receptor de insulina, receptor de transferrina, receptor de trombina, receptor de leptina, receptor de LDL) de otros MAB neuroregeneradores (NgR, Lingo, p75, CSPG (p. ej., NG-2, neurocano, brevicano, versicano, agregcano) ácido hialurónico, MAG, tenascina, NI-35, NI-250, IMP, perlecano, neurocano, fosfacano, nogo-A, OMGP, Sema4D, Sema 3A, efrina B3, efrina A2, efrina A5, MAG, EphA4, plexina B1, TROY, wnts, ryk rec., BMP-2, BMP-4, BMP-7), de actividades de MAB neuroprotectoras (EGF, EGFR, Sema 3), de MAB anti-beta amiloide (p. ej., m266, 3D6 (bapineuzumab), MAB 7C6 anti-globulímero), de los receptores y transportadores localizados en el SNC (receptores de serotonina, receptores de dopamina, DAT, Asc-1, GlyT1).

5.6 Anticuerpos de especificidad dual

La presente solicitud también describe la tecnología de "anticuerpo de especificidad dual". Los anticuerpos de especificidad dual pueden servir como agonistas, antagonistas, o ambos en diferentes combinaciones. Los anticuerpos de especificidad dual son anticuerpos en los que la cadena VH se une a un primer antígeno y la cadena VL se une a otro antígeno como se ilustra en el documento WO2008082651.

5.7 Anticuerpos cristalizados

Otra realización de la presente solicitud proporciona una proteína de unión cristalizada. El término "cristalizado" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que existe en forma de cristal. Los cristales son una forma de estado sólido de la materia, que es distinta de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales están compuestos de matrices de átomos, iones, moléculas regulares, repetitivas, tridimensionales (p. ej., proteínas tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (p. ej., complejos antígeno/anticuerpo). Estas matrices tridimensionales están dispuestas de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que son bien comprendidas en el campo. La unidad fundamental, o elemento esencial, que se repite en un cristal se llama la unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que se ajusta a una simetría cristalográfica bien definida dada proporciona la "celda unitaria" del cristal. La repetición de la celda unitaria mediante translaciones regulares en las tres dimensiones proporciona el cristal. Véase Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2^a ed., pág. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999).

En particular, la presente solicitud describe cristales de anticuerpos contra RGM A completos y fragmentos de los mismos según se utiliza en la presente memoria, y formulaciones y composiciones que comprenden dichos cristales. En una realización, la proteína de unión cristalizada tiene una mayor vida media *in vivo* que la contraparte soluble de la proteína de unión. En otra realización, la proteína de unión conserva la actividad biológica después de la cristalización.

La proteína de unión cristalizada de la invención pueden producirse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y como se describe en el documento WO 02072636, incorporado a la presente memoria como referencia.

5.8 Anticuerpos glicosilados

Otra realización de la invención proporciona una proteína de unión glicosilada en donde el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo comprende uno o más residuos de carbohidratos. La producción de proteína naciente *in vivo* puede someterse a procesamiento adicional, conocido como modificación post-traducciona. En particular, se pueden añadir enzimáticamente residuos de azúcar (glicosilo), un procedimiento conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que llevan cadenas laterales de oligosacáridos unidos covalentemente se conocen como proteínas o glicoproteínas glicosiladas. Los anticuerpos son glicoproteínas con uno o más restos de carbohidratos en el dominio Fc, así como en el dominio variable. Los residuos de carbohidratos en el dominio Fc tienen efecto

importante en la función efectora del dominio Fc, con un efecto mínimo en la unión al antígeno o la vida media del anticuerpo (R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), págs.11-16). En contraste, la glicosilación del dominio variable puede tener un efecto sobre la actividad de unión al antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo sobre la afinidad de unión del anticuerpo, probablemente debido al impedimento estérico (Co, M. S., et al., *Mol. Immunol.* (1993) 30: 1361-1367), o dar como resultado una mayor afinidad por el antígeno (Wallick, S. C., et al., *Exp. Med.* (1988) 168:1099-1109; Wright, A., et al., *EMBO J.* (1991) 10:2717 2723).

Un aspecto de la presente invención se refiere a la generación de mutantes del sitio de glicosilación en los que se ha mutado el sitio de glicosilación ligado a O o N de la proteína de unión. Un experto en la técnica puede generar tales mutantes usando tecnologías convencionales bien conocidas. Los sitios de glicosilación mutantes que conservan la actividad biológica, pero han aumentado o disminuido la actividad de unión son otro objeto de la presente invención.

En otra realización más, se modifica la glicosilación del anticuerpo o porción de unión a antígeno de la invención. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos se puede lograr mediante, por ejemplo, la alteración de uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la región variable para eliminar de ese modo la glicosilación en dicho sitio. Tal aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Este enfoque se describe con más detalle en la Publicación PCT WO2003016466A2 y en la Patente de los Estados Unidos Núms. 5.714.350 y 6.350.861, cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad.

Adicional o alternativamente, se puede preparar un anticuerpo modificado de la invención que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos fucosilo o un anticuerpo que tiene aumento de estructuras de GlcNAc de bisección. Se han demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula anfitriona con la maquinaria de glicosilación alterada. Las células con la maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden utilizar como células anfitrionas en las que para expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Véanse, por ejemplo, Shields, R. L. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 26733 a 26740; Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17: 176-1, así como, la Patente Europea Núm.: EP 1.176.195; PCT Publications WO 03/035835; WO 99/54342 80, cada una de las cuales se incorpora a la presente como referencia en su totalidad.

La glicosilación de proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como de la célula anfitriona en la que se expresa la proteína. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (p. ej., glicosiltransferasas y glicosidasas), y tener diferentes sustratos (azúcares nucleótidos) disponibles. Debido a estos factores, el patrón de glicosilación de proteínas, y la composición de los residuos de glicosilo, pueden variar dependiendo del sistema anfitrión en el que se expresa la proteína en particular. Los residuos de glicosilo útiles en la invención pueden incluir, pero no están limitados a, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico. En particular, la proteína de unión glicosilada comprende los residuos de glicosilo de tal manera que el patrón de glicosilación es humano.

Es conocido por los expertos en la técnica que diferente glicosilación de proteínas puede dar como resultado diferentes características de proteínas. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un microorganismo anfitrión, tal como levadura, y glicosilada utilizando la ruta endógena de levadura puede ser reducida en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como una línea celular CHO. Estas glicoproteínas también pueden ser inmunogénicas en seres humanos y muestran una reducción de la vida media *in vivo* después de la administración. Los receptores específicos en los seres humanos y otros animales pueden reconocer los residuos de glicosilo específicos y promover el rápido aclaramiento de la proteína de la sangre. Otros efectos adversos pueden incluir cambios en el plegamiento de proteínas, la solubilidad, la susceptibilidad a proteasas, el tráfico, el transporte, la compartimentalización, la secreción, el reconocimiento por otras proteínas o factores, la antigenicidad, o la alergenicidad. Por consiguiente, un médico puede preferir una proteína terapéutica con una composición y patrón de glicosilación específicos, por ejemplo composición y patrón glicosilación idénticos, o al menos similares, a los producidos en células humanas o en las células específicas de la especie del animal sujeto deseado.

La expresión de proteínas glicosiladas diferentes de las de una célula anfitriona puede conseguirse modificando genéticamente la célula anfitriona para expresar enzimas de glicosilación heterólogas. La utilización de mecanismos conocidos en la técnica un médico puede generar anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que exhiben glicosilación de la proteína humana. Por ejemplo, las cepas de levadura se han modificado genéticamente para expresar enzimas de glicosilación de origen no natural de manera que las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levadura exhiben glicosilación de proteínas idéntica a la de las células

animales, especialmente células humanas (Solicitudes de patente de los Estados Unidos Núms. 20040018590 y 20020137134 y Publicación PCT WO2005100584 A2).

Adicionalmente, un experto en la técnica apreciará que una proteína de interés puede expresarse usando una biblioteca de células anfitrionas modificadas genéticamente para expresar diversas enzimas de glicosilación, de modo que las células anfitrionas miembros de la biblioteca produzcan la proteína de interés con patrones de glicosilación variantes. Un médico puede entonces seleccionar y aislar la proteína de interés con determinados patrones de glicosilación novedosos. Concretamente, la proteína que tiene un patrón de glicosilación novedoso seleccionado particularmente exhibe propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

5.9 Anticuerpos anti-idiotípicos

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

6. Composiciones farmacéuticas

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de la invención son para su uso en, pero no están limitados a, el diagnóstico, detección, o el seguimiento de un trastorno, en la prevención, el tratamiento, la gestión, o la mejora de un trastorno o uno o más síntomas de los mismos, y/o en investigación. En una realización específica, una composición comprende uno o más anticuerpos de la invención. En otra realización, la composición farmacéutica comprende uno o más anticuerpos de la invención y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos de los anticuerpos de la invención para tratar un trastorno en el que la actividad de RGM A es perjudicial. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos son conocidos por ser útiles para o haber sido o estar siendo utilizados en la actualidad en la prevención, tratamiento, gestión, o mejora de un trastorno o uno o más de sus síntomas. De acuerdo con estas realizaciones, la composición puede comprender adicionalmente un portador, diluyente o excipiente.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención se pueden incorporar a composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En la presente memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, tendrá particular interés incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender adicionalmente cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o eficacia del anticuerpo o porción de anticuerpo.

Varios sistemas de suministro se conocen y se pueden utilizar para administrar uno o más anticuerpos de la invención o la combinación de uno o más anticuerpos de la invención y un agente profiláctico o un agente terapéutico útiles para prevenir, gestionar, tratar o mejorar un trastorno o uno o más de sus síntomas, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral o de otro tipo, etc. Los métodos de administración de un agente profiláctico o terapéutico de la invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (p. ej., intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral, y administración en la mucosa (p. ej., rutas intranasal y oral). Además, se puede emplear la administración pulmonar, p. ej., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosolización. Véanse, p. ej., las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540 y 4.880.078; y las Publicaciones PCT Núms. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903, cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia su totalidad. En una realización, un anticuerpo de la invención, la terapia combinada, o una composición de la invención se administran utilizando la tecnología de suministro de fármacos pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.). En una realización específica, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención se administran por vía intramuscular, por vía intravenosa, por vía

intratumoral, por vía oral, por vía intranasal, por vía pulmonar, o por vía subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección en embolada, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

En una realización específica, puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención localmente a la zona que necesita tratamiento; esto puede lograrse mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local, mediante inyección, o por medio de un implante, siendo dicho implante un material poroso o no poroso, incluyendo membranas y matrices, tales como membranas sialásticas, polímeros, matrices fibrosas (p. ej., Tisseel®), o matrices de colágeno. En una realización, se administra una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de los antagonistas de la invención localmente a la zona afectada a un sujeto para prevenir, tratar, gestionar, y/o mejorar un trastorno o un síntoma del mismo. En otra realización, se administra una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de la invención localmente a la zona afectada combinada con una cantidad eficaz de una o más terapias (p. ej., uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de un anticuerpo de la invención de un sujeto para prevenir, tratar, gestionar y/o mejorar un trastorno o uno o más de sus síntomas.

En otra realización, el agente profiláctico o terapéutico se puede suministrar en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. En una realización, se puede utilizar una bomba para lograr una liberación controlada o sostenida (véanse Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88: 507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574). En otra realización, los materiales poliméricos se pueden utilizar para lograr una liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (véase, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Ratón, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61; véase también Levy et al., 1985, Science 228: 190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25: 351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7 1: 105); Patente de los Estados Unidos Núm. 5.679.377; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.916.597; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.912.015; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.989.463; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.128.326; Publicación PCT Núm. WO 99/15154; y Publicación PCT Núm. WO 99/20253. Los ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etileno-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA), y poliortoésteres. En una realización concreta, el polímero utilizado en una formulación de liberación sostenida es inerte, está libre de impurezas lixiviables, es estable durante el almacenamiento, es estéril y es biodegradable. En otra realización más, un sistema de liberación controlada o sostenida se puede situar en las proximidades de la diana profiláctica o terapéutica, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, más arriba, vol. 2, págs. 115-138 (1984)).

Los sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (1990, Science 249: 1527-1533). Cualquier mecanismo conocido para un experto en la técnica se puede utilizar para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véanse, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.526.938, la publicación PCT WO 91/05548, la publicación PCT WO 96/20698, Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39: 179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long- Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50: 372-397, Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24: 853-854, and Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24: 759-760, cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad.

En una realización específica, cuando la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico se puede administrar in vivo para promover la expresión de su agente profiláctico o terapéutico codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se convierta en intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase la Patente de Estados Unidos Núm. 4.980.286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (p. ej., una pistola de genes; biolística, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo en conexión con un péptido de tipo homeobox que se sabe que entra en el núcleo (véase, p. ej., Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868). Alternativamente, un ácido nucleico puede ser introducido intracelularmente e incorporado dentro del ADN de la célula anfitriona para su expresión mediante recombinación homóloga.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de la vías de administración incluyen, pero no se limitan a, parenteral, por ejemplo,

intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (p. ej., inhalación), transdérmica (p. ej., tópica), transmucosal, y rectal. En una realización específica, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios en forma de una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal o tópica a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son
5 soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaina para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

Si las composiciones de la invención son para ser administradas por vía tópica, las composiciones se pueden formular en forma de una pomada, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, pulverización, aerosol,
10 solución, emulsión u otra forma bien conocida por un experto en la técnica. Véase, p. ej., Remington Pharmaceutical Sciences e Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19^a ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para las formas de dosificación tópicas no pulverizables, se emplean típicamente formas de viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica particularmente mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación,
15 soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, pomadas, y similares, que son, si se desea, esterilizados o mezclados con agentes auxiliares (p. ej., conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, tampones, o sales) para influir en diversas propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópicas adecuadas incluyen preparaciones en aerosol pulverizables en las que el ingrediente activo, en particular en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con una sustancia volátil presurizada (p. ej., un propelente gaseoso, tal como freón) o en un frasco atomizador. También se pueden
20 añadir a las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación si se desea cremas hidratantes o humectantes. Los ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

Si el método de la invención comprende la administración intranasal de una composición, la composición puede formularse en forma de aerosol, pulverización, neblina o en forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o
25 terapéuticos para uso de acuerdo con la presente invención puede ser suministrados convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol desde envases presurizados o de un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado (p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dicloro-tetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos (compuestos, p. ej., de
30 gelatina) para uso en un inhalador o insuflador se pueden formular conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Si el método de la invención comprende la administración oral, las composiciones se pueden formular por vía oral en
35 forma de comprimidos, cápsulas, sellos, cápsulas de gel, soluciones, suspensiones, y similares. Los comprimidos o cápsulas se pueden preparar por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (p. ej., lactosa, celulosa microcristalina, o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (p. ej., almidón de patata o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato sódico). Los comprimidos pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adoptar la forma de, pero no limitada a, soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (p. ej., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o
40 grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (p. ej., lecitina o acacia); vehículos no acuosos (p. ej., aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p. ej., p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, aromatizantes, colorantes, y agentes edulcorantes según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral pueden formularse convenientemente para la liberación lenta, liberación controlada o liberación sostenida de uno o
50 varios agentes profilácticos o terapéuticos.

El método de la invención puede comprender la administración pulmonar, p. ej., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, de una composición formulada con un agente de aerosolización. Véanse, por ejemplo, las Patentes de
55 los Estados Unidos Núms. 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540 y 4.880.078; y las Publicaciones PCT Núms. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903, cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia su totalidad. En una realización específica, un anticuerpo de la invención, la terapia combinada, y/o la composición de la invención se administran utilizando la tecnología de administración de fármacos pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

El método de la invención puede comprender la administración de una composición formulada para la administración parenteral mediante inyección (p. ej., mediante inyección en embolada o infusión continua). Las formulaciones para inyección pueden presentarse en una forma de dosificación unitaria (p. ej., en ampollas o en envases multidosis) con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o

emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como de agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado (p. ej., agua libre de pirógenos estéril) antes de su uso. Los métodos de la invención pueden comprender adicionalmente la administración de composiciones formuladas en forma de preparaciones de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (p. ej., por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las composiciones pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (p. ej., en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o en forma de derivados escasamente solubles (p. ej., en forma de una sal poco soluble).

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

Generalmente, los ingredientes de las composiciones se suministran por separado o mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o un sobre que indique la cantidad de agente activo. Cuando el modo de administración es una infusión, la composición se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua de calidad farmacéutica estéril o solución salina. Cuando el modo de administración es mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se puedan mezclar antes de su administración.

Otra realización proporciona que uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención se envase en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o sobre que indique la cantidad de agente. En una realización, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención se suministra como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente cerrado y puede ser reconstituido (p. ej., con agua o solución salina) para la concentración apropiada para la administración a un sujeto. En particular, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención se suministra como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente cerrado a una dosis unitaria de al menos 5 mg, más concretamente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg, o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizados o las composiciones farmacéuticas de la invención deben almacenarse entre 2°C y 8°C en su envase original y los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención se deben administrar en el plazo de de 1 semana, concretamente en el plazo de 5 días, en el plazo de 72 horas, en el plazo de 48 horas, en el plazo de 24 horas, en el plazo de 12 horas, en el plazo de 6 horas, en el plazo de 5 horas, en el plazo de 3 horas, o en el plazo de 1 hora después de haber sido reconstituidas. En una realización alternativa, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o las composiciones farmacéuticas de la invención se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente cerrado que indica la cantidad y concentración del agente. En particular, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un recipiente herméticamente cerrado a al menos 0,25 mg/ml, más concretamente al menos 0,5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml. La forma líquida debe ser almacenada a temperaturas entre 2°C y 8°C en su envase original.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención se pueden incorporar a una composición farmacéutica adecuada para su administración parenteral. Particularmente, el anticuerpo o porciones de anticuerpo serán preparados en forma de una solución inyectable que contiene de 0,1 a 250 mg/ml de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta de cualquiera de una forma de dosificación líquida o liofilizada en un vial de vidrio de sílex o ámbar, ampolla o jeringuilla precargada. El tampón puede ser L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10 mM, a pH 5,0 a 7,0 (óptimamente pH 6,0). Otros tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. El cloruro de sodio puede usarse para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (de manera óptima 150 mM para una forma de dosificación líquida). Se pueden incluir crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente sacarosa al 0-10% (óptimamente de 0,5 a 1,0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Se pueden incluir agentes de carga para una forma de dosificación liofilizada, principalmente manitol al 1-10% (de manera óptima 2-4%). Se pueden utilizar estabilizadores en las formas de dosificación tanto líquidas como liofilizadas, principalmente L-Metionina 1-50 mM (de manera óptima 5-10 mM). Otros agentes de carga adecuados incluyen glicina, arginina, y pueden ser incluidos como polisorbato-80 al 0-0,05% (óptimamente 0,005-0,01%). Los tensioactivos adicionales incluyen, pero no se limitan a polisorbato 20 y tensioactivos BRIJ. La composición farmacéutica que comprende los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención preparados como una solución inyectable para la administración parenteral, puede comprender adicionalmente agentes útiles como coadyuvantes, tales como los utilizados para aumentar la absorción o dispersión de una proteína terapéutica (p. ej.,

anticuerpo). Un coadyuvante particularmente útil es la hialuronidasa, tal como Hylenex® (hialuronidasa humana recombinante). La adición de hialuronidasa en la solución inyectable mejora la biodisponibilidad humana después de la administración parenteral, particularmente la administración subcutánea. También permite mayores volúmenes en el sitio de la inyección (es decir, más de 1 ml) con menos dolor y malestar, e incidencia mínima de reacciones en el lugar de la inyección. (Véanse los documentos WO2004078140, US2006104968 incorporados a la presente memoria como referencia).

Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones (p. ej., soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones líquidas, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma concreta depende del modo pretendido de administración y de la aplicación terapéutica. Las composiciones particulares típicas están en forma de soluciones inyectables o infusibles, tales como composiciones similares a las utilizadas para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. La manera concreta de administración es parenteral (p. ej., intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En una realización particular, el anticuerpo se administra mediante infusión o inyección intravenosa. En otra realización particular, el anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

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

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la presente invención se pueden administrar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/modo particular de administración es la inyección subcutánea, inyección o infusión intravenosa. Como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que protegerá el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres, y poli(ácido láctico). Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para los expertos en la técnica. Véase, p. ej., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

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

También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos complementarios. En ciertas realizaciones, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención es co-formulado con y/o co-administrado con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para el tratamiento de trastornos en los que la actividad de RGM A es perjudicial. Por ejemplo, un anti-anticuerpo o porción de anticuerpo contra RGM A de la invención se puede co-formular y/o co-administrar con uno o más anticuerpos que se unen a otras dianas (p. ej., anticuerpos que se unen a citoquinas o que se unen a moléculas de la superficie celular). Además, uno o más anticuerpos de la invención pueden usarse combinados con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Tales terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosificaciones inferiores de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo contra RGM A o fragmento del mismo es conectado a un vehículo que prolonga la vida media conocido en la técnica. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, el dominio Fc, polietilenglicol, y dextrano. Dichos vehículos se describen, por ejemplo, en la Solicitud de los Estados Unidos Núm. de Serie 09/428.082 y la Solicitud PCT publicada Núm. WO 99/25044, que se incorpora a la presente memoria como referencia para cualquier propósito.

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

Cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica se puede utilizar de acuerdo con la presente invención. Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véanse Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12: 488-505; Wu y Wu, 1991 *Biotherapy* 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596; Mulligan, *Science* 260: 926-932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217; May, 1993, *TIBTECH* 11 (5): 155-215. Los métodos conocidos comúnmente en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que se puede utilizar son descritos por Ausubel et al. (eds.), en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1993); y Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990). La descripción detallada de los diversos métodos de terapia génica se describe en el documento US20050042664 A1 que se incorpora a la presente memoria como referencia.

Cualquier agente neuroprotector que sea un antioxidante, un captador de radicales, un fármaco anti-convulsivo, tal como Fenitoína o el fármaco para la anemia Eritropoyetina es adecuado para una terapia combinatoria con anticuerpos contra RGM A pro-regenerativos, prolongándose así la generalmente muy corta ventana de tratamiento terapéutico de los neuroprotectores.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención se pueden utilizar para tratar seres humanos que padecen tales enfermedades.

Se debe entender que los anticuerpos de la invención o porciones de unión a antígeno de los mismos se pueden usar solos o combinados con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, siendo seleccionado dicho agente adicional por el experto en la técnica para su uso pretendido. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica por ser útil para el tratamiento de la enfermedad o afección que estén siendo tratadas por el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que confiere un atributo beneficioso a la composición terapéutica p. ej., un agente, que afecta a la viscosidad de la composición.

Además, debe entenderse que las combinaciones que se van a incluir dentro de esta invención son aquellas combinaciones útiles para su propósito pretendido. Los agentes expuestos a continuación son ilustrativos de los propósitos y no se pretende que sean limitantes. Las combinaciones, que son parte de esta invención, pueden ser los anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional seleccionado de la lista de más abajo. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede realizar su función pretendida.

Los ejemplos no limitantes de los agentes terapéuticos para la esclerosis múltiple con los que un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención pueden combinarse incluyen los siguientes: corticosteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferón- β 1a (AVONEX; Biogen); interferón- β 1b (BETASERON; Chiron/Berlex); interferón α -n3 (Interferon Sciences/Fujimoto), interferón- α (Alfa Wassermann/J&J), interferón β 1A-IF (Serono/Inhale Therapeutics), Peginterferón α 2b (Enzon/Schering-Plough), Copolímero 1 (Cop-1 ; COPAXONE; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; cladribina; anticuerpos contra o antagonistas de otras citoquinas o factores de crecimiento humanos y sus receptores, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-23, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden ser combinados con anticuerpos contra moléculas de la superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 o sus ligandos. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, también se pueden combinar con agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, leflunomida, AINE, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de la fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren en la señalización por citoquinas proinflamatorias tales como TNF α o IL-1 (p. ej., inhibidores de quinasas IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP), inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β , inhibidores de TACE, inhibidores de la señalización de células T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatioprina, 6-

mercaptapurinas, inhibidores de la enzima convertora de angiotensina, receptores de citoquinas solubles y derivados de los mismos (p. ej., receptores de TNF p55 o p75 solubles, RIL-1RI, RIL-1RII, RIL-6R) y citoquinas antiinflamatorias (p. ej., IL-4, IL-10, IL-13 y TGF β).

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

10 Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, también se pueden combinar con agentes, tales como alemtuzumab, dronabinol, Unimed, daclizumab, mitoxantrona, hidrocloreto de xaliprodeno, fampridina, acetato de glatiramer, natalizumab, sinnabidol, a-immunoquina NNSO3, ABR-215062, Anergix.MS, antagonistas de receptores de quimioquinas, BBR-2778, calagualina, CPI-1189, LEM (mitoxantrona encapsulada en liposomas), THC.CBD (agonista cannabinoide) MBP-8298, mesopram (inhibidor de PDE4), MNA-715, anticuerpos anti-receptor de IL-6, NeuroVax, pirfenidona allotrap 1258 (RDP-1258), sTNF-R1, talampanel, teriflunomida, TGF-beta2, tiplimotida, antagonistas de VLA-4 (p. ej., TR-14035, VLA4 Ultrahaler, Antegran-ELAN/Biogen), antagonistas de interferón gamma, agonistas de IL-4.

20 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o porción de anticuerpo puede ser determinada por un experto en la técnica y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción de anticuerpo, son superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, puesto que una dosis profiláctica se usa en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

30 Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (p. ej., una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria según se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la invención están dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico concreto que se vaya a alcanzar, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de tal compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en los individuos.

45 Un, intervalo ilustrativo no limitante para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención es de 0,1 a 20 mg/kg, más concretamente de 1 a 10 mg/kg. Cabe señalar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y gravedad de la afección a aliviar. Se debe entender adicionalmente que para cualquier sujeto concreto, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación establecidos en este documento son ejemplares solamente y no están destinados a limitar el alcance o práctica de la composición reivindicada.

55 Ejemplos:

Métodos

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

60 (i) Se recubrieron placas de ELISA de unión directa con hRGM A (R&D) a una concentración de 2 μ g/ml en tampón carbonato. Los pocillos se bloquearon a continuación con una solución de bloqueo al 2% (Bio-Rad) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos biotinilados se diluyeron seriadamente con un factor de dilución 1:5 en BSA/PBS al 0,1% bajo la placa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. El reactivo de detección fue una dilución 1:10.000 de estreptavidina-HRP en BSA/PBS al 0,1%. La detección se

realizó con un reactivo TMB, que se detuvo con 2N H₂SO₄ y la DO se leyó a 450 nm.

(ii) Análisis FACS. Los transfectantes estables de células HEK293 que expresaban en exceso hRGM A o las células BAF3 que expresaban en exceso rataRGM A se sometieron a tinción con MAB 5F9 o 8D1 no marcados durante más de 15 minutos a 4° en tampón BSA/PBS al 0,1%. La detección se llevó a cabo con un anticuerpo de ratón anti-IgG PE de rata.

(iii) Ensayos ELISA en fase sólida para la evaluación de MAB 5F9 en ensayos de unión de hRGM A-Neogenina.

Las placas de ELISA (Immuno Plate Cert. Maxi Sorb. F96 NUNC, 439454) se recubrieron durante 1 hora a 37°C con una concentración de 2,5 µg/ml del dominio extracelular de la proteína Neogenina humana marcada con His (concentración de solución de partida: 30 µg/ml). Después de la incubación, la Neogenina no unida se retiró en 3 etapas de lavado separadas con PBS que contenía Tween 20 al 0,02%. El bloqueo de las placas recubiertas con Neogenina se realizó mediante la adición de 200 µl por pocillo de una solución de bloqueo de albúmina de suero bovino (BSA) al 3%, PBS, Tween 20 (0,02%). Después de la incubación durante 1 hora a 37°C, la solución de bloqueo se retiró y se añadieron fragmentos RGM A o proteína completa, conjugados con una etiqueta de fc humano, con o sin anticuerpo. En algunos experimentos los anticuerpos se preincubaron con las proteínas hRGM A conjugadas con fc durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas recubiertas con Neogenina se incubaron con hRGM A con o sin anticuerpos durante 1 hora a 37°C. Después de 3 etapas de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%), las placas se incubaron con un anticuerpo anti-Fc humano marcado con biotina (1 mg/ml, diluido 1:200 en PBS que contenía BSA al 0,6%, Tween 20 al 0,02%), Jackson ImmunoResearch Núm. de catálogo: 709-065-149, durante 1 hora a 37°C. El anticuerpo no unido se retiró mediante 3 etapas de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%). Para visualizar la unión del anticuerpo anti-fc marcado con biotina, se añadió un complejo que constaba de Estreptavidina-Peroxidasa (Roche, Núm. de catálogo 11089153001), diluido 1:5000 con PBS que contenía BSA al 0,6%, Tween 20 al 0,02%, seguido de incubación a 37°C durante 1 h. El complejo de peroxidasa no unido se eliminó en 3 etapas de lavado posteriores (PBS-Tween 20 (0,02%) antes de añadir el sustrato de Peroxidasa (Immuno Pure TMB, Pierce Núm. 34021). La reacción del sustrato se detuvo 1-30 minutos después de su adición a los pocillos mediante H₂SO₄ 2,5 M. Las placas se analizaron (determinación de DO) a una longitud de onda de 450 nm utilizando un fotómetro Anthos.

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

Las placas de ELISA (Immuno Plate Cert. Maxi Sorb. F96 NUNC, 439454) se recubrieron durante 1 hora a 37°C con una solución que contenía una concentración de 2,5 µg/ml de proteína BMP-4 recombinante humana (R & D Systems, Núm. 314-BP, Núm. de Lote BEM316061). Después de la incubación, se separó la BMP-4 no unida en 3 etapas de lavado separadas con PBS que contenía Tween 20 al 0,02%. El bloqueo de las placas recubiertas con BMP-4 se realizó mediante la adición de 200 µl por pocillo de una albúmina de suero bovino (BSA) al 3%, PBS, solución de bloqueo de Tween 20 (0,02%). Después de la incubación durante 1 hora a 37°C, la solución de bloqueo se retiró y se añadieron fragmentos de RGM A o proteína completa, conjugados con una etiqueta de fc humano, con o sin anticuerpo. En algunos experimentos los anticuerpos se preincubaron con las proteínas hRGM A conjugadas con fc durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas recubiertas con BMP-4 se incubaron con hRGM A con o sin anticuerpos durante 1 hora a 37°C. Después de 3 etapas de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%), las placas se incubaron con un anticuerpo anti-Fc humano marcado con biotina (1 mg/ml, diluido 1:200 en PBS que contenía BSA al 0,6%, Tween 20 al 0,02%), Jackson ImmunoResearch Núm. de catálogo: 709, 065-149, durante 1 hora a 37°C. El anticuerpo no unido se retiró mediante 3 etapas de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%). Para visualizar la unión del anticuerpo anti-fc marcado con biotina, se añadió un complejo que consistía en Estreptavidina-Peroxidasa (Roche, Núm. de catálogo 11089153001), diluido 1:5000 con PBS que contenía BSA al 0,6%, Tween 20 al 0,02%, seguido de incubación a 37°C durante 1 h. El complejo de peroxidasa no unido se retiró en 3 etapas de lavado posteriores (PBS-Tween 20 (0,02%) antes de añadir el sustrato de Peroxidasa (Immuno Pure TMB, Pierce Núm. 34021). La reacción del sustrato se detuvo 1-30 min después de su adición a los pocillos mediante H₂SO₄ 2,5 M. Las placas se analizaron (determinación de DO) a una longitud de onda de 450 nm utilizando un fotómetro Anthos.

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

Las placas de ELISA (Immuno Plate Cert. Maxi Sorb. F96 NUNC, 439454) se recubrieron durante 1 hora a 37°C con una solución que contenía una concentración de 2,5 µg/ml de proteína recombinante humana BMP-2 (R & D Systems, Núm. 355-BM, Núm. de Lote MSA04). Después de la incubación, se retiró la BMP-2 no unida en 3 etapas de lavado separadas con PBS que contenía Tween 20 al 0,02%. El bloqueo de las placas recubiertas con BMP-2 se realizó mediante la adición de 200 µl por pocillo de una albúmina de suero bovino al 3% (BSA), PBS, solución de bloqueo de Tween 20 (0,02%). Después de la incubación durante 1 hora a 37°C, la solución de bloqueo se retiró y se añadieron fragmentos de RGM A o proteína completa, conjugados con una etiqueta de fc humano, con o sin anticuerpo. En algunos experimentos los anticuerpos se preincubaron con las proteínas hRGM A conjugadas con fc durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas recubiertas con BMP-2 se incubaron con hRGM A con o sin anticuerpos durante 1 hora a 37°C. Después de 3 etapas de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%), las placas se incubaron con un anticuerpo anti-Fc humano marcado con biotina (1 mg/ml, diluido 1:200 en PBS que contenía BSA

al 0,6%, Tween 20 al 0,02%), Jackson ImmunoResearch Núm. de catálogo: 709, 065-149, durante 1 hora a 37°C. El anticuerpo no unido se retiró mediante 3 etapas de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%). Para visualizar la unión del anticuerpo anti-fc marcado con biotina, se añadió un complejo que consistía en Estreptavidina-Peroxidasa (Roche, Núm. de catálogo 11089153001), diluido 1:5000 con PBS que contenía BSA al 0,6%, Tween 20 al 0,02%, seguido de incubación a 37°C durante 1 h. El complejo de peroxidasa no unido se eliminó en 3 etapas de lavado posteriores (PBS-Tween 20 (0,02%) antes de añadir el sustrato de peroxidasa (Immuno Pure TMB, Pierce Núm. 34021). La reacción del sustrato se detuvo 1-30 min después de su adición a los pocillos de H₂SO₄ 2,5 M. Las placas se analizaron (determinación de DO) a una longitud de onda de 450 nm utilizando un fotómetro Anthos.

10 (vi) Cultivo de células Ntera-2

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

Para la diferenciación neuronal, las células Ntera-2 se sembraron a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células/175 cm² en medio de diferenciación (medio DMEM que contenía FBS al 10%, HS al 5%, penicilina-estreptomina al 1%, ácido retinoico 10 µM). Las células se diferenciaron durante 3 semanas y el medio se intercambió dos veces a la semana.

Después de la diferenciación, las células se separaron con tripsina-EDTA y se dividieron a una razón 1:6. Cuarenta y ocho horas más tarde las células neuronales se separaron mediante golpecitos de las células subyacentes. Las células desalojadas fueron transferidas para la agregación en el nuevo medio a matraces de cultivo oscilante nuevos (Corning, USA). Se permitió que las células Ntera-2 diferenciadas se agregaran bajo condiciones de leve balanceo horizontal a 37°C, durante 24 h en medio Neurobasal (Gibco) con un suplemento de B27 (Gibco), glutamina (Gibco) y penicilina-estreptomina. Los agregados de Ntera-2 se sembraron a una densidad de aproximadamente 20-30 agregados por cubreobjetos en placas de 24 pocillos. Los cubreobjetos previamente recubiertos de poli-lisina se recubrieron con laminina (20 µg/ml, Sigma) y con el fragmento Núm. 786 de RGM A humana acoplada a fc recombinante (aminoácidos 47-168) a una concentración de 10 µg/ml. Después de la siembra, los cultivos se trataron con el MAB 5F9, se añadieron a tres concentraciones diferentes (0,1 µg/ml; 1 µg/ml; 10 µg/ml) al medio de cultivo y se incubaron adicionalmente durante 24 horas a 37°C en medio Neurobasal. Los agregados se fijaron en paraformaldehído al 4% (2 h, temperatura ambiente) y se permeabilizaron mediante la adición de Triton X-100 al 0,1% en PBS (20 min. A temperatura ambiente). Para los cultivos de tinción fluorescente se bloquearon con PBS que contenía BSA al 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Después del bloqueo, las células NTERA se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón contra el isotipo 3 de β-tubulina (SDL3D10 clon, Sigma Núm. T8660) durante 2 h a temperatura ambiente. El anticuerpo no unido se eliminó mediante 3 etapas de lavado diferentes (5-15 min cada una) y las células Ntera se incubaron con un anticuerpo de Burro anti-ratón conjugado con Cy-3 (Jackson ImmunoResearch Lote 62597), diluido 1:350 veces en PBS con BSA al 0,5% y 0,5 µg/ml de bisbenzimidida. Después de una incubación de 1 hora, los cultivos se lavaron 3 veces para retirar el anticuerpo secundario no unido. Para la microscopía de fluorescencia, cubreobjetos se embebieron en Fluoromount G (Southern Biotech, Eching).

Se adquirieron imágenes de agregados de Ntera-2 utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200 y el crecimiento de los cultivos se analizaron automáticamente mediante un sistema de adquisición de imágenes y de análisis propio. El análisis automático de derivación se realizó con Imagen Pro Plus 4.5 y el análisis estadístico de los datos se realizó con GraphPad Prism 4. El crecimiento se normalizó a los cultivos de control desarrollados en ausencia de fragmento Núm. 786 de RGM A humana.

50 (vii) Cultivo de SH-SY5Y.

Las células SH-SY5Y (ATCC, CRL-2266) son células de neuroblastoma humano derivadas de un tumor cerebral metastásico. Estas células se cultivaron en un medio que consistía en solución salina equilibrada de Earle (Invitrogen Life Technologies, Núm. de catálogo 24010-043) al 50% y Mezcla de Nutrientes F12 (Ham) + GlutaMAX-1 (Invitrogen Life Technologies, Núm. de catálogo 31765-027) al 50%. Este medio se complementó adicionalmente con suero de ternera fetal inactivado por calor (FCS, JRH Biosciences, Kansas Núm. de catálogo 12107-1000M) al 10%, NEAA al 1% (solución de aminoácidos no esenciales MEM (Sigma-Aldrich Núm. de catálogo M1745), y penicilina al 1% (10.000 U/ml)/Estreptomina (10.000 µg/ml) (Invitrogen Life Technologies, Núm. de catálogo 15140-122). Para estimular la diferenciación neuronal y el crecimiento de los procesos neuronales, las células SH-SY5Y se cultivaron en medio con un suplemento de ácido retinoico 10 mM (RA, Sigma-Aldrich Núm. de catálogo R2625-050MG)) durante varios días. Las células SH-SY5Y diferenciadas se cultivaron en matraces de cultivo de tejido y se separaron mediante tripsinización cuidadosa y se sembraron en cubreobjetos de vidrio recubiertos con un patrón de bandas de proteína RGM A o fragmento de la misma y colágeno I.

(viii) Preparación de cubreobjetos de vidrio con bandas

La versión modificada del ensayo de bandas sobre cubreobjetos de vidrio se llevó a cabo de una manera ligeramente diferente a la descrito previamente (Knoell et al. Nature Protocols 2: 1216-1224, 2007) y se resume a continuación.

5 Matrices de silicio estériles para la producción de bandas que consistían en proteínas purificadas fueron presionadas sobre la superficie de una placa de Petri dirigiendo hacia arriba la cara rugosa de la matriz. Cubreobjetos limpios, lavados con etanol, se colocaron sobre la matriz y las esquinas de la matriz se marcaron con un rotulador en la parte trasera del cubreobjetos. La matriz que portaba el cubreobjetos se volvió cuidadosamente del revés con el cubreobjetos frente a la parte inferior de la placa de Petri. La RGM A inhibidora completa conjugada con fc o fragmentos fc o RGM A humana recombinante (R & D Systems Núm. de catálogo 2459 RM) de la misma se mezclaron con 10 µl de un anticuerpo anti-ratón marcado con FITC (anti-IgG de ratón de cabra específico de Fab, Sigma-Aldrich Núm. de catálogo F-4018) para visualizar las bandas de RGM A. Utilizando una jeringa Hamilton, se inyectaron cuidadosamente 50 µl de la solución de anticuerpo contra RGM A-FITC a través del canal de entrada. El exceso de líquido salió de la matriz a través del canal de salida y se retiró con un paño Kleenex. Después de la incubación de la matriz-cubreobjetos a 37°C durante 2 horas, la primera solución de recubrimiento (que contenía RGM A) se lavó con 100 µl de PBS. En la siguiente etapa, el cubreobjetos con las bandas de RGM A se transfirió a una placa de 24 pocillos, se recubrió con 500 µl de Colágeno I (Colágeno I de cola de rata, Becton Dickinson Biosciences Núm. de catálogo 354236) para llenar los espacios vacíos entre las bandas de RGM A y se incubó a 37°C durante 2 horas. En el extremo se produjo un patrón de bandas alternas de RGM A y Colágeno I en el cubreobjetos. Después de la incubación, el colágeno I no unido fue retirado mediante lavado mediante tres etapas de lavado separadas con PBS y las células SH-SY5Y diferenciadas se sembraron en los cubreobjetos. La incubación de las células SH-SY5Y sobre el sustrato con un patrón se continuó a 37°C durante 20-24 horas en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra RGM A humana.

25 Para el análisis de inmunofluorescencia las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 2 h a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C y se permeabilizaron mediante incubación con PBS que contenía Triton X-100 al 0,1% durante 10-20 min a temperatura ambiente. Después de bloquear con BSA al 3% durante 60 minutos, las células se incubaron con el anticuerpo primario (clon SDL 3D10 isotipo 3 anti-β-tubulina monoclonal, Sigma-Aldrich Núm. de catálogo T8660) durante 2 horas a temperatura ambiente y después de varias etapas de lavado con el anticuerpo secundario (Cy-3 de burro anti-ratón JacksonImmuno Research Lote: 62 597), se diluyeron en PBS con BSA al 0,1% durante 1 h. Los núcleos se contratiñeron utilizando bisbenzimid H33258 (Riedel-de-Haen, Núm. de catálogo A-0207). Las células se incorporaron finalmente en Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates Inc.: Núm. de catálogo 010001). Las células se analizaron usando un microscopio de fluorescencia Axioplan2 (Zeiss).

(ix) Construcción y expresión de anticuerpos recombinantes anti-RGMA

40 El ADN que codificaba los fragmentos de ADNc de la región variable de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1 de rata anti-RGMA humana se clonó en un vector de expresión pHybE que contenía la región constante de IgG1 humana, que contenía las mutaciones de aminoácidos región bisagra 2, mediante recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones son un cambio de leucina a alanina en las posiciones 234 y 235 (numeración de EU, Lund et al., 1991, J. Immunol, 147: 2657). La cadena ligera de la región variable de los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1 se clonó en el vector pHybE que contenía una región constante kappa humana. Los vectores PHYB-E ilustrativos incluyen pHybE-Hck y pHybE-hCgl, z, no-a (véase la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. de Serie 61/021.282). Los anticuerpos completos se expresaron transitoriamente en células 293E mediante co-transfección de ADNc de las cadenas pesada y ligera quiméricos ligado al plásmido de expresión pHybE. Los sobrenadantes celulares que contenían el anticuerpo recombinante se purificaron mediante cromatografía de Proteína A Sefarosa y el anticuerpo unido se eluyó mediante la adición de tampón ácido. Los anticuerpos se neutralizaron y se sometieron a diálisis en PBS. Los anticuerpos monoclonales anti-RGMA humana purificados se sometieron a ensayo a continuación para determinar su capacidad para unirse a RGMA mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 1 y ELISA de competición como se describe en el Ejemplo 7.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales anti-RGMA humana

55 Los anticuerpos monoclonales de rata anti-RGMA humana se obtuvieron como sigue:

Ejemplo 1A: Inmunización de ratas con antígeno de RGMA humana

60 Se inyectaron por vía subcutánea 25 µg de RGMA humana purificada recombinante (R & D Systems Núm. de catálogo 2459-RM lote MRH02511A) mezclada con coadyuvante completo de Freund (Sigma), en cuatro ratas Harlan Sprague Dawley de 6-8 semanas el día 1. Los días 21, 42 y 63, se inyectó por vía subcutánea veinticinco microgramos de RGMA humana purificada recombinante mezclada con coadyuvante de Freund incompleto (Sigma) en las mismas 4 ratas Harlan Sprague Dawley. El día 144, o el día 165 a las ratas se les inyectaron por vía

intravenosa 10 µg de RGMA humana recombinante purificada.

Ejemplo 1B: Generación de hibridoma

5 Los esplenocitos obtenidos a partir de las ratas inmunizadas descritos en el Ejemplo 1.2.A se fusionaron con células SP2/O- a una proporción de 2:1 de acuerdo con el método establecido descrito por Kohler, G. y Milstein 1975, Nature, 256: 495 para generar hibridomas. Los productos de fusión se sembraron en medios de selección que contenían hipoxantina y azaserina en placas de 96 pocillos a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células de bazo por pocillo. De siete a diez días después de la fusión, se observaron colonias de hibridoma macroscópicos. El sobrenadante de cada pocillo que contenía las colonias de hibridoma se sometió a ensayo mediante ELISA directo (véase el Ejemplo 2) para determinar la presencia de anticuerpos contra RGMA humana. Las líneas celulares positivas del ELISA se sometieron a ensayo en FACS frente a células HEK293 transfectadas estables que expresaban RGMA humana y/o de rata. Estas líneas celulares de hibridoma de rata se sometieron a ensayo posteriormente en un ELISA directo para determinar la reactividad cruzada con la RGMA de rata, y en ELISA de unión a la proteína de fusión HuRGMA 47-168.

Tabla 7: Unión de lucha contra RGMA rata anticuerpos monoclonales

Nombre	ELISA directo rHuRGMA	FACS HEK293-rhRGMA	ELISA directo rRataRGMA	ELISA Directo hRGMA 47-168/HulgGfc
ML68-8D1	Sí	Sí	No	Sí
ML69-5F9	Sí	Sí	Sí	Sí

Ejemplo 2: Unión mediante ELISA directo de mAbs 5F9 y 8D1.

20 Como se muestra en la Figura 1A, los MAB 5F9 y 8D1 se unen a hRGM A con títulos similares, como se describe en la sección anterior (i). También se demostró que MAB 5F9 se unía a rataRGM A en ELISA, mientras que 8D1 no era capaz de unirse a rataRGM A (datos no mostrados). La Figura 1B muestra que MAB 5F9 y 8D1 se unen a células HEK293 que sobreexpresan hRGM A en FACS. La Figura 1C muestra que 5F9 pero no 8D1 es capaz de unirse a células BAF3 que expresan en exceso rataRGM A en FACS. El FACS se llevó a cabo como se describe en la sección (ii).

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

40 Los ensayos de ELISA en fase sólida se utilizaron también para evaluar el MAB 5F9 en ensayos de unión competitiva de hRGM A-BMP-4. Las placas de ELISA se prepararon y se utilizaron como se ha descrito en la sección (iv) de la presente solicitud. La hRGM A se añadió a una concentración de 0,5 µg/ml con anticuerpos 5F9 durante 1 h a 37°C. El MAB 5F9 se usó a las siguientes concentraciones: 1,25 µg/ml; 0,63 µg/ml; 0,32 µg/ml; 0,16 µg/ml; 0,08 µg/ml; 0,04 µg/ml; 0,02 µg/ml; 0,01 µg/ml. La unión de hRGM A se visualizó utilizando un anticuerpo anti-fc marcado con biotina y un complejo de Estreptavidina-Peroxidasa. Las placas se analizaron (determinación de DO) a una longitud de onda de 450 nm utilizando un fotómetro Anthos. Como se muestra en la Figura 3, las cuatro concentraciones más altas de anticuerpos, inhibieron de una manera dependiente de la dosis la unión de RGM A humana completa a BMP-4.

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

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

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

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

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

Se realizó un análisis cuantitativo de la actividad neutralizadora de MAB 5F9 en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados Ntera humanos para someter a ensayo el potente fragmento (aminoácidos 47-168) inhibidor de la cadena ligera conjugado con fc de la proteína RGM A humana. El crecimiento de los cultivos se analizó automáticamente por tener agregados teñidos con bisbencimida y posteriormente se fotografió. La tinción solo marcó el agregado no las neuritas en crecimiento. Sin embargo, éstas se tiñeron con un anticuerpo contra β3-tubulina y un anticuerpo secundario marcado con fluoróforo. El crecimiento de las neuritas se determinó automáticamente calculando el índice de crecimiento de las neuritas, un índice determinado restando el área de los cuerpos celulares de la zona teñida con β3-tubulina del agregado y sus procesos. A continuación, este factor se dividió por el área de los cuerpos celulares como describen Lingor et al. en J. Neurochem. 103: 181-189, 2007. La Figura 7, muestra que el MAB 5F9 neutralizó dependientemente de la dosis (0,1-10,0 µg) la actividad inhibitoria del crecimiento de un fragmento (fragmento 0, 47-168; 10 µg) inhibidor de hRGM A conjugado con fc potente en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados de Ntera humana.

Ejemplo 4: Actividad de mAb 5F9 en bandas de hRGM A/Colágeno I.

Las células SH-SY5Y se cultivaron y se utilizaron como se describe en la sección (vii) de la presente solicitud. Se prepararon cubreobjetos de vidrio con bandas de RGM A y colágeno I como se describe en la sección (viii) de la presente solicitud. Se produjo un tapiz de bandas alternas de hRGM A/Colágeno I y Colágeno I para los experimentos de acuerdo con un protocolo descrito en la bibliografía (Knoell et al. Nature Protocols 2: 1216-1224, 2007). En ausencia del MAB 5F9 (A), las células SH-SY5Y neuronales muestran una clara preferencia por la banda de Colágeno I, prefiriendo más de 90% de las células las bandas de Colágeno I sobre las bandas de hRGM A. Con concentraciones crecientes de MAB 5F9 las células SH-SY5Y neuronales prefieren las bandas de hRGM A sobre las bandas de Colágeno I (B-E). A la concentración de MAB más alta utilizada (E), las neuronas SH-SY5Y muestran una fuerte preferencia por las bandas de hRGM A en comparación con las bandas de Colágeno I (véase la figura 8). Esto se puede interpretar como una característica única del MAB 5F9 ya que transforma la naturaleza inhibitoria de RGM A en una actividad atractiva. En presencia de concentraciones crecientes de 5F9, las células neuronales prefieren migrar y crecer en un sustrato de RGM A, y no en un sustrato permisivo como el Colágeno I. Dicha

característica única nunca se había descrito antes para un anticuerpo monoclonal.

Ejemplo 5: Construcción de los anticuerpos injertados con CDR

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

- 10 a) VH3-48, VH3-33 y VH3-23, así como las secuencias de empalme hJH3, hJH4 y hJH6 para la construcción de secuenciasceptoras de cadena pesada (de acuerdo con la Tabla 3 de más arriba);
 b) A17 y A18, así como hJK2 para la construcción de secuenciasceptoras de cadena ligera (de acuerdo con la Tabla 4 de más arriba).

15 Al injertar las correspondientes CDR de VH y VL de 5F9 en dichas secuenciasceptoras se prepararon las siguientes secuencias de VH y VL injertadas, humanizadas, modificadas de CDR (véase también la Tabla 6, de más arriba): VH 5F9.1-GL, VH 5F9.2-GL, VH 5F9.3-GL, VH 5F9.4-GL, VH 5F9.5-GL, VH 5F9.6-GL, VH 5F9.7-GL, y VH 5F9.8-GL; VL 5F9.1-GL, VL 5F9.2-GL, y VL 5F9.3-GL.

20 Ejemplo 6: Construcción de retromutaciones del marco en anticuerpos injertados con CDR

Para generar retromutaciones del marco del anticuerpo humanizado, se introducen mutaciones en las secuencias de anticuerpos injertadas con CDR preparadas de acuerdo con el Ejemplo 5, mediante síntesis *de novo* del dominio variable y/o uso de cebadores mutagénicos y PCR, y métodos bien conocidos en la técnica. Se construyen diferentes combinaciones de retromutaciones y otras mutaciones para cada uno de los injertos de CDR como sigue.

30 Para las cadenas pesadas VH 5F9.1-GL, VH 5F9.2-GL, y VH 5F9.3-GL se someten a retromutación uno o más de los siguientes residuos de Vernier y de la interfaz VH/VL de la siguiente manera: V37 → I, V48 → I, S49 → G, y/o R98 → K

Para las cadenas pesadas VH 5F9.4-GL, GL-VH 5F9.5, y VH-GL 5F9.6 se someten a retromutación uno o más de los siguientes residuos de Vernier y de la interfaz VH/VL de la siguiente manera: V37 → I, I → V48, A49 → G, K → R98.

35 Para las cadenas pesadas VH 5F9.7-GL, GL-VH 5F9.8, y VH-GL 5F9.9 se someten a retromutación uno o más de los siguientes residuos de Vernier y de la interfaz VH/VL de la siguiente manera: V37 → I, I → V48, S49 → G.

Las mutaciones adicionales incluyen las siguientes:
 40 para cadenas pesadas VH 5F9.1-GL, VH 5F9.2-GL, y VH 5F9.3-GL: D88 → A,
 para cadenas pesadas VH 5F9.4-GL, VH 5F9.5-GL, y VH 5F9.6-GL: Q1 → E y
 para las cadenas pesadas VH 5F9.7-GL, VH 5F9.8-GL, y VH 5F9.9-GL: L5 → V.

45 Para la cadena ligera VL 5F9.1-GL se someten a retromutación uno o más de los siguientes residuos de Vernier y de la interfaz VH/VL de la siguiente manera: I2 → V, M4 → L, Y41 → F.

Para la cadena ligera VL 5F9.2-GL se someten a retromutación uno o más de los siguientes residuos de Vernier y de la interfaz VH/VL de la siguiente manera: M4 → L, L → R51.

50 Para la cadena ligera VL 5F9.3-GL se someten a retromutación uno o más de los siguientes residuos de Vernier y de la interfaz VH/VL de la siguiente manera: M4 → L, Y41 → F.

Ejemplo 7: Construcción y expresión de anticuerpos anti-RGMA humanizados recombinantes

55 Los vectores de expresión pHybE que albergan las cadenas pesadas y ligeras que contienen retromutaciones del marco se co-transfectaron a células 293-6E para producir transitoriamente anticuerpos humanizados de completos, como se describe en la sección ix de más arriba. Las mutaciones se introdujeron en las secuencias de anticuerpo injertadas con CDR preparadas de acuerdo con el Ejemplo 5, mediante síntesis *de novo* del dominio variable y/o uso de cebadores mutagénicos y PCR, y métodos bien conocidos en la técnica. Las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos humanizados se describen en la Tabla 8.

Específicamente, para las cadenas pesadas:

VH 5F9.1, VH 5F9.5, y VH 5F9.9 contienen VH 5F9.4-GL con una mutación Q1 → E.
 VH 5F9.2, VH 5F9.6, VH 5F9.10, VH 5F9.19, VH 5F9.20, VH 5F9.21 y VH 5F9.22 contienen VH 5F9.4-GL

con una mutación Q1 → E y las siguientes retromutaciones de residuos de Vernier y de la interfaz VH/VL: V37 → I, V48 → I, A49 → G, R98 → K.

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

Para las cadenas ligeras:

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

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

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

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

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

TABLA 8: Expresión de anticuerpos humanizados

SEQ ID NO.	Región de la proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
47	VH h5F9.1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEWV AMIYYDSSEKHY ADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYC ARGTTPDY WGQGMVTVSS
44	VL h5F9.1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLE WYLQKPGQSPQLLIYE VSNR F SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC FQATHDPLT FGQGTKLEIKR
48	VH h5F9.2	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMN WIRQAPGKGLEW IGMIYYDSSEKHY ADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYC AKGTTPDY WGQGMVTVSS
44	VL h5F9.2	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLE WYLQKPGQSPQLLIYE VSNR F SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC FQATHDPLT FGQGTKLEIKR
49	VH h5F9.3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEW SMIYYDSSEKHY ADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYC AKGTTPDY WGQGMVTVSS
44	VL h5F9.3	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLE WYLQKPGQSPQLLIYE VSNR F SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC FQATHDPLT FGQGTKLEIKR
50	VH h5F9.4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMN WIRQAPGKGLEW IGMIYYDSSEKHY ADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYC AKGTTPDY WGQGMVTVSS

ES 2 562 832 T3

SEQ ID NO.	Región de la proteína	Secuencia
44	VL h5F9.4	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWYLQKPGQSPQLLIYEVS NR SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC FQATHDPLT FGQGTKLEIKR
47	VH h5F9.5	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEWV AMIYYDSSEKHY ADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYC ARGTTPDY WGQGMVTVSS
45	VL h5F9.5	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWFQQRPGQSPRRLIYEVS NR SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC FQATHDPLT FGQGTKLEIKR
48	VH h5F9.6	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMN WIRQAPGKGLEW IGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYC AKGTTPDY WGQGMVTVSS
45	VL h5F9.6	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWFQQRPGQSPRRLIYEVS NR SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC FQATHDPLT FGQGTKLEIKR
49	VH h5F9.7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEWV SMIYYDSSEKHY ADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYC AKGTTPDY WGQGMVTVSS
45	VL h5F9.7	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWFQQRPGQSPRRLIYEVS NR SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC FQATHDPLT FGQGTKLEIKR
50	VH h5F9.8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMN WIRQAPGKGLEW IGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYC AKGTTPDY WGQGMVTVSS
45	VL h5F9.8	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWFQQRPGQSPRRLIYEVS NR SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC FQATHDPLT FGQGTKLEIKR
47	VH h5F9.9	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEWV AMIYYDSSEKHY ADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMN SLRAED TAVYYC ARGTTPDY WGQGMVTVSS

ES 2 562 832 T3

SEQ ID NO.	Región de la proteína	Secuencia
46	VL h5F9.9	DVVMTQSP LSLP PVTLGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWYLQKPGQSPQLLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SR VEAEDVGV YYCFQATHDPLTFGQGTKLEIKR
48	VH h5F9.10	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAAS GFTFS NYGMN WIR QAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMN SL RAED TAVYYCAKGTTPDYWGQGMVTVSS
46	VL h5F9.10	DVVMTQSP LSLP PVTLGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWYLQKPGQSPQLLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SR VEAEDVGV YYCFQATHDPLTFGQGTKLEIKR
49	VH h5F9.11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAAS GFTFS NYGMN WVR QAPGKGLEWVSMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMN SL RAED TAVYYCAKGTTPDYWGQGMVTVSS
46	VL h5F9.11	DVVMTQSP LSLP PVTLGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWYLQKPGQSPQLLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SR VEAEDVGV YYCFQATHDPLTFGQGTKLEIKR
50	VH h5F9.12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAAS GFTFS NYGMN WIR QAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMN SL RAED TAVYYCAKGTTPDYWGQGMVTVSS
46	VL h5F9.12	DVVMTQSP LSLP PVTLGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWYLQKPGQSPQLLIYEVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SR VEAEDVGV YYCFQATHDPLTFGQGTKLEIKR
48	VH h5F9.19	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAAS GFTFS NYGMN WIR QAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMN SL RAED TAVYYCAKGTTPDYWGQGMVTVSS
51	VL h5F9.19	DVVL T QSP LSLP PVTLGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEW FQ RPGQSP RL LIYEVS NRF SGVPDRFSGSG S TDFTLKI SR VEAEDVGV YYCFQATHDPLTFGQGTKLEIKR
48	VH h5F9.20	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAAS GFTFS NYGMN WIR QAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMN SL RAED TAVYYCAKGTTPDYWGQGMVTVSS

ES 2 562 832 T3

SEQ ID NO.	Región de la proteína	Secuencia
52	VL h5F9.20	DVVLTSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWFQQRPGQSPRRLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQATHDPLTFGQGTKLEIKR
48	VH h5F9.21	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGTTPDYWGQGMVTVSS
53	VL h5F9.21	DVVLTSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWFLQKPGQSPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQATHDPLTFGQGTKLEIKR
48	VH h5F9.22	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGTTPDYWGQGMVTVSS
54	VL h5F9.22	DVVLTSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWYLQKPGQSPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQATHDPLTFGQGTKLEIKR
50	VH h5F9.23	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGTTPDYWGQGMVTVSS
51	VL h5F9.23	DVVLTSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWFQQRPGQSPRRLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQATHDPLTFGQGTKLEIKR
50	VH h5F9.24	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGTTPDYWGQGMVTVSS
52	VL h5F9.24	DVVLTSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLE YSDGYTFLEWFQQRPGQSPRRLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQATHDPLTFGQGTKLEIKR

SEQ ID NO.	Región de la proteína	Secuencia
50	VH h5F9.25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMN WIRQAPGKGLEWIG MIYYDSSEKHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAK GTT PDYWGQGT MVT VSS
53	VL h5F9.25	DVVLTSPLSLPVTLGQPASISCRSS QSLE YSDGYTFLEW FLQKPGQSPQLLI YEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC FQATHDPLT FGQGTKLEIKR
50	VH h5F9.26	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMN WIRQAPGKGLEWIG MIYYDSSEKHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAED TAVYYCAK GTT PDYWGQGT MVT VSS
54	VL h5F9.26	DVVLTSPLSLPVTLGQPASISCRSS QSLE YSDGYTFLEW YLQKPGQSPQLLI YEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC FQATHDPLT FGQGTKLEIKR

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

5 Las placas ELISA (Costar 3369) se recubrieron durante la noche a 4°C con 50 µl/pocillo de hRGMA de 0,25 µg/ml en tampón de carbonato-bicarbonato de sodio 0,2 M, pH 9,4, se lavaron con Tampón de Lavado (PBS que contiene Tween 20 al 0,1%), y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 200 µl/pocillo de leche en polvo no grasa al 2% en PBS. Después de lavar con Tampón de Lavado, se añadió por duplicado una mezcla de un quimérico 5F9 biotinilado (concentración final 0,1 µg/ml) y anticuerpo de ensayo competidor no marcado partiendo de una concentración final de 50 µg/ml y diluido seriadamente 5 veces) en 50 µl/pocillo de tampón de ELISA.

10 Después de incubar las placas durante 1 hora a temperatura ambiente, y lavar con Tampón de Lavado, los anticuerpos unidos se detectaron usando 100 µl/pocillo de dilución 1:10.000 de estreptavidina conjugada con HRP (Fitzgerald) en tampón de ELISA. Después de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, y lavar con Tampón de Lavado, se llevó a cabo el desarrollo del color mediante la adición de 100 µl/pocillo de tampón TMB (Zymed).

15 Después de incubar durante 15 min a temperatura ambiente, el desarrollo del color se detuvo añadiendo 50 µl/pocillo de ácido clorhídrico 1N. La absorbancia se leyó a 490 nm.

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

20 Tabla 9: Valores de IC₅₀ de anticuerpos 5F9 humanizados en ELISA competitivo

Anticuerpo	CI ₅₀ (µg/ml)	Anticuerpo	CI ₅₀ (µg/ml)
h5F9.1	> 10	h5F9.19	N/A
h5F9.2	> 10	h5F9.20	> 2.0
h5F9.3	> 10	h5F9.21	0.60
h5F9.4	> 10	h5F9.22	> 2.0
h5F9.5	> 10	h5F9.23	0.55
h5F9.6	> 10	h5F9.24	1.32
h5F9.7	> 10	h5F9.25	0.66
h5F9.8	> 10	h5F9.26	> 2.0
h5F9.9	> 10		
h5F9.10	> 10		

Anticuerpo	CI50 (µg/ml)	Anticuerpo	CI50 (µg/ml)
h5F9.11	> 10		
h5F9.12	> 10		

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

5 El ensayo BIACORE (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) determina la afinidad de los anticuerpos con las mediciones cinéticas de las constantes de asociación y disociación. La unión de los anticuerpos a RGMA humana purificada recombinate se determinó mediante mediciones basadas en resonancia de plasmón superficial con un aparato Biacore® 3000 (Biacore® AB, Uppsala, Suecia) utilizando HBS-EP de migración (HEPES 10 mM [pH 7,4], NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,005%) a 25°C. Todos los productos químicos se obtuvieron de Biacore® AB (Uppsala, Suecia). Se inmovilizaron aproximadamente 5000 UR de anticuerpo policlonal específico de fragmento, (Fc_γ), IgG de cabra anti-humana (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) diluido en acetato de sodio 10 mM (pH 4,5) directamente a través de un chip biosensor de calidad para investigación CM5 utilizando un kit de acoplamiento de amina convencional de acuerdo con las instrucciones y los procedimientos del fabricante a 25 µg/ml. Los radicales sin reaccionar sobre la superficie de biosensor se bloquearon con etanolamina. Se utilizó una superficie de carboximetildextrano modificado en la celda de flujo 2 y 4 como una superficie de reacción. Se utilizó carboximetildextrano sin modificar sin IgG de cabra anti-humana en la celda de flujo 1 y 3 como la superficie de referencia. Los anticuerpos purificados se diluyeron en solución salina tamponada con HEPES para la captura a través de superficies de reacción específicas de anti-IgG humana de cabra. Los anticuerpos humanos que se van a capturar como ligando (25 µg/ml) se inyectaron sobre matrices de reacción a una velocidad de flujo de 5 µl/min. Las constantes de velocidad de asociación y disociación, K_{on} (unidad $M^{-1}s^{-1}$) y k_{off} (unidad s^{-1}) se determinaron de acuerdo con un flujo continuo de 25 µl/min. Las constantes de velocidad se obtuvieron mediante mediciones cinéticas de unión al antígeno a diez concentraciones diferentes que oscilan de 0,39 a 50 nM. Para el análisis cinético, las ecuaciones de velocidad derivadas del modelo de unión de Langmuir 1:1 se ajustaron simultáneamente a las fases de asociación y disociación de las ocho inyecciones (utilizando el análisis de ajuste global) con el uso de soporte lógico Bioevaluation 4.0.1. La constante de disociación en equilibrio (unidad M) de la reacción entre los anticuerpos humanizados y la RGMA humana recombinate purificada se calculó a continuación a partir de las constantes de velocidad cinéticas mediante la siguiente fórmula: $K_D = k_{off}/k_{on}$.

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

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

30 Ejemplo 10: Los anticuerpos humanizados 5F9 neutralizan la actividad quimiorrepelente de RGM A humano en un ensayo de quimiotaxis de SH-SY5Y neuronal.

35 El ensayo de quimiotaxis mide el comportamiento quimiotáctico de las células en respuesta a factores difusibles que puede ejercer actividades quimioatrayentes o quimiorrepelentes. La RGM A ha sido descrita como una proteína que actúa en forma tanto unida a membrana (repulsión dependiente del contacto) como difusible, soluble (quimiorrepelente) y por lo tanto se ha evaluado en un ensayo de quimiotaxis de hRGM A. Para este fin se utilizaron células de neuroblastoma humano SH-SY5Y sensibles a RGM A, que portan el receptor de RGM Neogenina (Schaffar et al. J. Neurochemistry: 107: 418-431, 2008). Se cultivaron células SH-SY5Y en Solución Salina Equilibrada de Earle/F12 (EBSS/F12) con un suplemento de suero bovino fetal al 10% y aminoácidos no esenciales al 1% (MEM-NEAA). Para la inducción de crecimiento de neuritas las células se cultivaron en medio con un suplemento de ácido retinoico (RA) 10 mM. Al cabo de 5-6 horas, las células se trataron con tripsina y se contaron para la siembra en las Cámaras de Boyden de 24 pocillos (BD Falcon 351185, HTS Multiwell System). Se añadieron 500 µl de la suspensión celular (correspondiente a 1×10^5 células) al círculo interior de cada pocillo. Este círculo interior está separado del círculo exterior más grande de cada pocillo por una membrana de PET con un diámetro de poro de 8 µm. Se pipetearon 600 µl de medio +/- RGM A +/- anticuerpos al círculo exterior y las células se cultivaron en las Cámaras Boyden Multipocillo durante la noche a 37°C. Después el medio de incubación se aspiró y se reemplazó por el fijador (paraformaldehído al 2%). La fijación continuó durante 2 horas a temperatura ambiente y después de varias etapas de lavado con PBS se realizó la permeabilización utilizando PBS que contenía Triton-X-100 al 0,1% (15 min, RT). La tinción de las células se realizó incubando las mismas durante 1 hora en la oscuridad en una solución de Faloidina Alexa Fluor 488 1:100 (Invitrogen A12379) y Bisbenzimidida (H332456) 1:100. Después de 2 etapas de lavado con PBS, los cultivos cargaron con PBS, se sellaron con parafilm y se almacenaron en la

oscuridad para el análisis con un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiovert).

En la ausencia de hRGM A las células migran a través de los poros de la membrana y se pueden contar después de la fijación y la tinción. Sólo se cuentan aquellas células que se unen a la parte inferior de la membrana, debido a que estas células habían migrado a través de la membrana de PET. Las células en el lado superior de la membrana se retiraron cuidadosamente antes del procedimiento de fijación. Este ensayo de quimiotaxis demostró que la presencia de hRGM A reducía significativamente el número de células SH-SY5Y que migran a través de la membrana en más de 80%. El anticuerpo monoclonal de rata 5F9, el quimérico de humano-rata 5F9 y el humanizado 5F9 pero no uno monoclonal de rata de control de isotipo (p21) neutralizaron parcial o completamente la actividad quimiorrepelente de hRGM A a 10 µg/ml, que se manifiesta como un mayor número de células que se encuentran en la parte inferior de la membrana (Figura 10).

Ejemplo 11: 5F9 induce la regeneración de los axones del nervio óptico aplastados, con mielina dañada en un modelo de rata de lesión del nervio óptico.

El modelo de Aplastamiento del Nervio Óptico (o Lesión del nervio óptico) proporciona un modelo animal para someter a ensayo diversas sustancias que estimulan la regeneración de las fibras del nervio óptico y reducen la muerte celular masiva de células ganglionares de la retina.

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas Sprague Dawley macho y Wistar macho adultas obtenidas de Charles River (D) Laboratories (Alemania). Los animales se mantienen en jaulas individuales en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 h con alimento y agua *ad libitum*. El aplastamiento del nervio óptico se realiza siempre solo en el ojo izquierdo mediante cirugía anterior mínima. Este es un método mínimamente invasivo de la lesión del nervio óptico y fue desarrollado por los autores de la presente invención, de acuerdo con los métodos de cirugía visual anterior humana. Antes y durante la operación los animales del procedimiento son anestesiados mediante anestesia de inhalación utilizando Sevoflurano (Abbott GmbH Co. & KG, Delkenheim, Alemania) y se fijan a la mesa de operaciones mediante el uso de una mordaza fijadora y cinta adhesiva para las extremidades. La caída de la temperatura corporal es impedida mediante el montaje de los animales sobre una almohadilla calefactora. Para la cirugía de aplastamiento anterior del nervio óptico de la rata, el ojo izquierdo se libera cuidadosamente de ligamentos y de tejido conectivo. Como primer paso, se realiza un corte microquirúrgico (2-3 mm) del tejido adyacente en la comisura exterior del ojo. A continuación, el nervio óptico se expone mediante el uso de un par de fórceps para mover a un lado los músculos del ojo y la glándula lagrimal, preservándolo de ese modo. En la siguiente etapa, las meninges se abrieron longitudinalmente mediante el uso de micro tijeras para exponer el nervio óptico.

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

a) Administración local de anticuerpos y solución tampón.

Después de la lesión por aplastamiento del nervio óptico masculino las ratas Sprague Dawley fueron tratadas localmente con anticuerpo 5F9 (n = 10 animales), el anticuerpo de control 8D1 (n = 10 animales) o con un control de vehículo de PBS (n = 10 animales). Los experimentadores fueron cegados para los diferentes grupos de tratamiento. Para la aplicación local de anticuerpos, pequeñas piezas de espuma de gel (longitud: 2,5 mm, anchura: 2,5 mm, altura: 2,5 mm) se empaparon con 20 µl de una solución de anticuerpo de 10 mg/ml o con 20 µl de PBS y se colocaron directamente adyacentes a la zona de la lesión del nervio óptico. Después de la cirugía mínimamente invasiva y la aplicación de anticuerpos, los animales se colocaron sobre toallas de papel en la jaula limpia montada sobre el calentador para controlar la temperatura corporal hasta que comenzaron a moverse. Se aplicó sobre el ojo un ungüento que contenía antibiótico (Gentamytrex, Dr. Mann Pharma) para evitar la infección bacteriana y la sequedad de la esclerótica. Se aplicó i.p. carprofeno (Rimadyl, 5 mg/kg, Pfizer GmbH, Karlsruhe) para la terapia del dolor postoperatorio directamente después de la cirugía y a continuación dos veces por día durante un período de 3 días. Los animales se observaron y se controlaron regularmente varias horas directamente después de la cirugía y durante los siguientes días para asegurarse de que todos los animales sobrevivían y se recuperaban de la anestesia y la cirugía. Cinco semanas después de la cirugía y de la aplicación de anticuerpo/vehículo, los animales se anestesiaron con una sobredosis de Narcoren (40-60 mg/kg) y se perfundieron mediante la inyección de solución de paraformaldehído al 4% en el corazón. Los nervios ópticos se aislaron y se transfirieron a una solución de paraformaldehído al 4% durante 1 h a temperatura ambiente para asegurar una fijación adecuada del tejido. Después de la postfijación, los nervios ópticos de rata se almacenaron durante la noche en una solución de sacarosa al 30% (4°C). Al día siguiente los nervios ópticos se incluyeron en Tissue Tek, se congelaron y se prepararon secciones longitudinal con un espesor de 16 µm utilizando un criostato.

Para las inmunotinciones, las secciones del nervio óptico se fijaron con Acetona fría (-20°C) (10 min), se lavaron 3x

(5 min) con Solución Salina Tamponada con Tris (TBS, Fluka 93312) y se bloquearon y se permeabilizaron con TBS, que contenía Albúmina de Suero bovino al 5% y Triton-X-100 al 1% (30 min), a temperatura ambiente). La BSA residual y el detergente se eliminaron mediante 2 etapas de lavado separadas (5 min cada una) con TBS. Las secciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal de conejo anti-GAP-43 (Abcam, ab 7562) diluido 1:100 en una solución de BSA/TBS al 5%. Después de 3 etapas de lavado con TBS, Tween al 0,1%, las secciones se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes A11034), diluido 1:1000 en BSA/TBS al 5%, que contenía una dilución 1:100 de Bisbenzimidazol (H33258, 50 mg/ml) para visualizar los núcleos celulares. Antes de la inclusión, las secciones teñidas se lavaron 3 veces con TBS-Tween al 0,1% (5 min cada etapa) y con agua destilada. Las secciones se incluyeron en Fluoromount G, se cubrieron con un cubreobjetos y se almacenaron en la oscuridad para la documentación microscópica.

Utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss las imágenes (Figura 11) de las secciones longitudinales teñidas se almacenaron utilizando el soporte lógico Zeiss Axiovision. Las representaciones individuales de cada nervio se montaron para el análisis utilizando el soporte lógico de Análisis de Imágenes Photoshop (Adobe). El análisis cuantitativo se realizó de dos maneras diferentes usando las imágenes compuestas de los nervios ópticos. La zona positiva para GAP-43 en el sitio de la lesión se midió usando el soporte lógico Axiovision (Figura 12B). Independiente de este primer análisis cuantitativo, se contaron fibras regeneradoras individuales (positivas para GAP-43) en 4 zonas diferentes: 0-200 μm , 200-400 μm , 400-600 μm y 600-1200 μm más allá del sitio de aplastamiento. Los análisis de los datos y evaluación estadística de los datos se realizaron con la ayuda del soporte lógico Graphpad Prism. (Figura 12A)

b) Administración sistémica de anticuerpos y solución tampón.

Para el suministro sistémico de anticuerpos, se trataron sistémicamente (por vía intraperitoneal, ip) o por vía intravenosa, iv) ratas Wistar macho con 5F9 anticuerpo (n = 10 animales) o con un vehículo de control PBS (n = 10 animales). Los animales recibieron inyecciones dos veces y las inyecciones se realizaron el día 0, poco después de la inducción de aplastamiento del nervio y el día 21 después del aplastamiento. Las dosis de anticuerpo administradas fueron 2 mg/kg el día 0 y 10 mg/kg el día 21. Los animales se sacrificaron cinco semanas después de la lesión por aplastamiento y del aislamiento de tejidos, preparación de secciones, tinciones y análisis cuantitativo se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. Al igual que antes los experimentadores fueron cegados para los dos grupos de tratamiento diferentes. Las imágenes compuestas de nervios ópticos de rata se muestran en la Figura 13. En los animales tratados con 5F9 (A), muchas fibras positivas para GAP-43 se extienden más allá del sitio de aplastamiento en contraste con los animales de control tratados con PBS (B). El sitio de aplastamiento se encuentra en el margen izquierdo y fibras en regeneración se tiñen con un anticuerpo para GAP-43. Se observan muchas fibras en el borde superior e inferior del nervio óptico en los animales tratados con 5F9 pero no en los animales con PBS.

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

En un segundo experimento, las ratas Wistar machos fueron tratadas después de la lesión del nervio óptico sistémicamente (iv) con anticuerpo 5F9 (n = 10 animales), el anticuerpo de control 8D1 (n = 10 animales) o con el control de vehículo de PBS (n = 10 animales). Las ratas recibieron inyecciones una vez por semana con 2 mg/kg de anticuerpo administrado iv y las inyecciones se iniciaron inmediatamente después del aplastamiento del nervio óptico. Todas las ratas recibieron 4 inyecciones y los animales fueron sacrificados 5 semanas después de la lesión por aplastamiento. Los experimentadores fueron cegados y el procesamiento de tejidos y análisis cuantitativo se realizaron como se ha descrito antes. PBS 5F9 pero no el control de vehículo aumentó significativamente el número de fibras positivas para GAP-43 en regeneración. Se encontraron significativamente más fibras ($p < 0,001$) en los animales tratados con 5F9 a distancias de 200 μm a 1400 μm , que en los animales tratados con vehículo o anticuerpo de control. Los animales fueron tratados una vez por semana iv durante 4 semanas partiendo del día 0 con 5F9 (2 mg/kg por dosis), con el anticuerpo 8D1 de control (2 mg/kg por dosis) o con PBS. (Figura 14B)

Ejemplo 12: 5F9 induce la remielinización de axones con el nervio óptico aplastado, dañado en un modelo de rata de lesión del nervio óptico.

Un marcador de oligodendrocitos y mielina es la proteína básica de mielina (BPM). Se utilizó un anticuerpo dirigido contra BPM para responder a la pregunta de si las diferencias se produjeron en la remielinización en los diferentes grupos de tratamiento. Para visualizar el procedimiento de remielinización, las secciones del nervio óptico de los animales tratados sistémicamente se fijaron con acetona fría (-20°C) (10 min), se lavaron 3 veces (5 min) con

5 solución salina tamponada con Tris (TBS, Fluka 93312) y se bloquearon y permeabilizaron con TBS, que contenía albúmina de suero bovino al 5% y Triton-X-100 al 1% (30 min), a temperatura ambiente). La BSA residual y el detergente se eliminó mediante 2 etapas de lavado separadas (5 minutos cada una) con TBS. Las secciones se incubaron durante 3 horas o durante la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal anti-BPM de conejo (Abcam, ab 2404) diluido 1:50 en solución de BSA/TBS al 5%. Después de 3 etapas de lavado con TBS, Tween al 0,1%, las secciones se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de anti-conejo de cabra conjugado con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes A11034), diluido 1:1000 en BSA/TBS al 5%, que contenía una dilución 1:100 de Bisbenzimidaz (H33258, 50 µg/ml) para visualizar los núcleos celulares. Antes de la inclusión, las secciones teñidas se lavaron 3 veces con TBS con Tween al 0,1% (5 min cada etapa) y con agua destilada. Las secciones se incluyeron en Fluoromount G, se cubrieron con un cubreobjetos y se almacenaron en la oscuridad para la documentación microscópica.

15 Utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss las imágenes de secciones longitudinales teñidas se almacenaron utilizando el soporte lógico Zeiss Axiovision. Las representaciones individuales de cada nervio se montaron para el análisis utilizando el soporte lógico de Análisis de Imágenes de Photoshop (Adobe). El análisis cuantitativo se llevó a cabo de dos maneras diferentes usando las imágenes compuestas de los nervios ópticos. La zona positiva para BPM en el sitio de la lesión se midió utilizando el soporte lógico Axiovision. El análisis de datos y la evaluación estadística de los datos se realizó con la ayuda del soporte lógico Graphpad Prism.

20 Los animales fueron tratados con 5F9 el día 0 y d21 con 2 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. Se les administró por vía intraperitoneal o intravenosa anticuerpo o vehículo. Imágenes compuestas de nervios ópticos de ratas.

25 La mielinización se visualizó utilizando un anticuerpo dirigido contra el marcador de mielina proteína básica mielina BPM. Los sitios de aplastamiento se encuentran en medio de los nervios compuestos y la zona está libre en los animales de control tratados con vehículo (A y B). En los animales tratados 5F9 (C y D), se observaron muchas estructuras positivas para BPM en la zona media (centro del aplastamiento) de los nervios ópticos. (Figura 15)

30 La mielinización se visualizó utilizando un anticuerpo dirigido contra el marcador de la proteína mielina básica de mielina BPM. El área de BPM se midió usando el soporte lógico Zeiss Axiovision. M1 y M2 son dos mediciones independientes y M es el área media medida positiva para BPM. 5F9 aumenta significativamente ($p < 0,001$ en comparación con el control de vehículo) el área de BPM del sitio de aplastamiento del nervio óptico en un factor de 3,5. (Figura 16)

35 Ejemplo 13: 5F9 protege la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR) de la degeneración e induce la brotación de neuronas de la retina en la CFNR en degeneración

40 Con el fin de observar la protección de la degeneración de CFNR y la inducción de la brotación de neuronas de la retina se estableció un método de ensayo de laboratorio novedoso. Dicho método se basa en la explantación y el análisis de retina de rata adulta de los ojos de ratas con aplastamiento del nervio óptico (como se describe en el Ejemplo 11, más arriba) y tratada sistémicamente con anticuerpo 5F9, anticuerpo de control p21 (un anticuerpo monoclonal IgG1 de rata) o vehículo de PBS. Para llevar a cabo este experimento las ratas con aplastamiento del nervio óptico fueron tratadas con Abs o PBS inmediatamente después de la inducción del aplastamiento del nervio óptico y a continuación a intervalos de 1 semana (cinco veces; a dosificaciones de anticuerpos de 2 mg/kg o 10 mg/kg)

45 a) Preparación de retina y tinción de inmunofluorescencia:

50 Los animales fueron profundamente anestesiados con Sevoflurano (8%; Abbott), a continuación se sacrificaron inmediatamente mediante apertura de la caja torácica y perfusión con una solución de paraformaldehído al 4% (PFA) a través del ventrículo izquierdo del corazón. Los ojos fueron se diseccionaron con el tejido conectivo ajustado y se colocaron en PFA al 4% hasta llevar a cabo la preparación de la retina.

55 La preparación de la retina se realizó en Solución Salina Equilibrada de Hank (HBSS, libre de Magnesio y de Calcio; Invitrogen, Núm. 14170070). El ojo se fijó en el tejido conectivo mediante pinzas y se realizó un corte redondo en la esclerótica inmediatamente alrededor de la córnea.

La lente y el cuerpo ciliar se retiraron cuidadosamente a través de la abertura, en la mayoría de los casos junto con la retina. En caso de que la retina estuviera todavía unida a la esclerótica - ésta se separó suavemente y se extrajo.

60 La media esfera de la retina se cortó en cuatro puntos, se abrió y se extendió sobre una membrana de nitrocelulosa de color gris (Sartorius, Núm. 13006-50-N). Si fuera necesario, la membrana con la retina sobre ella se dejó secar al aire durante 5 a 10 seg.

Después de eso, la retina sobre la membrana se colocó en una solución de formaldehído tamponada con fosfato

neutra al 10% (pH 7,3; Fisher Scientific, Núm. F/1520/21) a + 4°C hasta que se realizó la tinción de inmunofluorescencia.

La tinción se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo:

5 La preparación retina se lavó con TBS, seguido de bloqueo y permeabilización con BSA al 5%, Triton X-100 1% en TBS durante 30 min y lavado de nuevo con TBS. Se añadieron anticuerpos primarios (Ab TUJ-1 monoclonal, un Ab anti-tubulina β III de ratón, AbCam, Núm. ab14545; dilución 1:500, en TBS, BSA al 5%) durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad seguido de lavado con TBS, Tween 20 al 0,1%. A continuación se añadieron anticuerpo secundario (Cy3 anti-ratón de burro; Jackson ImmunoResearch (Dianova) 715-165-151, dilución 1:1000) y Bisbenzimid (50 μ g/ml 1:100 dilución) (en TBS, BSA al 5%) durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad seguido de lavado con TBS, Tween 20 al 0,1%, y lavado con H₂O desalada. La preparación se montó luego con Fluoromount G y se almacenó a + 4°C en la oscuridad.

15 b) Investigación del efecto protector de 5F9 sobre las fibras de la retina en el ojo (la CFNR)

Se escogieron imágenes (n = 12) seleccionadas al azar utilizando el soporte lógico Axiovision de cada retina, y se determinó para cada imagen el número de fibras nerviosas.

20 Para el experimento se utilizaron tres retinas con nervios ópticos aplastados para cada grupo: el grupo del mab 5F9, el grupo del mab control p21 y el grupo de vehículo de PBS. El análisis de los datos y el análisis estadístico se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism.

25 Los resultados se ilustran en la Figura 17. Se observa una densidad de haces de fibras nerviosas significativamente mayor en retinas de animales tratados sistémicamente con el anticuerpo 5F9 de la invención.

c) Investigación del efecto de 5F9 sobre la brotación de las neuronas de la retina en el ojo

30 Utilizando el soporte lógico Axiovision se eligieron imágenes seleccionadas al azar (n = 12) de cada retina explantada, y se determinó el número de neuronas en brotación para cada imagen.

35 Para el experimento se utilizaron tres retinas con nervios ópticos aplastados para cada grupo: el grupo del mab 5F9, el grupo del mab de control p21 y el grupo de vehículo de PBS. Se realizó el análisis de datos y el análisis estadístico utilizando el programa GraphPad Prism.

Los resultados se ilustran en la Figura 18. Se observa un número significativamente mayor de neuronas intrarretinianas en brotación en retinas de animales tratados sistémicamente con el anticuerpo 5F9 de la invención.

40 <110> Abbott GmbH & Co. KG
 <120> Anticuerpos contra la proteína RGM A para su uso en el tratamiento de la degeneración de la Capa de Fibras Nerviosas de la Retina
 <130> M/50237
 <160> 68
 <170> PatentIn Versión 3.3
 45 <210> 1
 <211> 1353
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 50 <221> CDS
 <222> (1) ..(1353)
 <400> 1

ES 2 562 832 T3

atg	cag	ccg	cca	agg	gag	agg	cta	gtg	gta	aca	ggc	cga	gct	gga	tgg	48
Met	Gln	Pro	Pro	Arg	Glu	Arg	Leu	Val	Val	Thr	Gly	Arg	Ala	Gly	Trp	
1				5				10						15		
atg	ggt	atg	ggg	aga	ggg	gca	gga	cgt	tca	gcc	ctg	gga	ttc	tgg	ccg	96
Met	Gly	Met	Gly	Arg	Gly	Ala	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Gly	Phe	Trp	Pro	
			20					25					30			
acc	ctc	gcc	ttc	ctt	ctc	tgc	agc	ttc	ccc	gca	gcc	acc	tcc	ccg	tgc	144
Thr	Leu	Ala	Phe	Leu	Leu	Cys	Ser	Phe	Pro	Ala	Ala	Thr	Ser	Pro	Cys	
		35					40					45				
aag	atc	ctc	aag	tgc	aac	tct	gag	ttc	tgg	agc	gcc	acg	tcg	ggc	agc	192
Lys	Ile	Leu	Lys	Cys	Asn	Ser	Glu	Phe	Trp	Ser	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	
	50					55					60					
cac	gcc	cca	gcc	tca	gac	acc	ccc	gag	ttc	tgt	gca	gcc	ttg	cgc		240
His	Ala	Pro	Ala	Ser	Asp	Thr	Pro	Glu	Phe	Cys	Ala	Ala	Leu	Arg		
65				70				75						80		
agc	tac	gcc	ctg	tgc	acg	cgg	cgg	acg	gcc	cgc	acc	tgc	cgg	ggt	gac	288
Ser	Tyr	Ala	Leu	Cys	Thr	Arg	Arg	Thr	Ala	Arg	Thr	Cys	Arg	Gly	Asp	
				85				90						95		
ctg	gcc	tac	cac	tcg	gcc	gtc	cat	ggc	ata	gag	gac	ctc	atg	agc	cag	336
Leu	Ala	Tyr	His	Ser	Ala	Val	His	Gly	Ile	Glu	Asp	Leu	Met	Ser	Gln	
			100					105						110		
cac	aac	tgc	tcc	aag	gat	ggc	ccc	acc	tcg	cag	cca	cgc	ctg	cgc	acg	384
His	Asn	Cys	Ser	Lys	Asp	Gly	Pro	Thr	Ser	Gln	Pro	Arg	Leu	Arg	Thr	
		115					120					125				
ctc	cca	ccg	gcc	gga	gac	agc	cag	gag	cgc	tcg	gac	agc	ccc	gag	atc	432
Leu	Pro	Pro	Ala	Gly	Asp	Ser	Gln	Glu	Arg	Ser	Asp	Ser	Pro	Glu	Ile	
		130				135					140					
tgc	cat	tac	gag	aag	agc	ttt	cac	aag	cac	tcg	gcc	acc	ccc	aac	tac	480
Cys	His	Tyr	Glu	Lys	Ser	Phe	His	Lys	His	Ser	Ala	Thr	Pro	Asn	Tyr	
145					150					155					160	

ES 2 562 832 T3

acg cac tgt ggc ctc ttc ggg gac cca cac ctc agg act ttc acc gac	528
Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp	
165 170 175	
cgc ttc cag acc tgc aag gtg cag ggc gcc tgg ccg ctc atc gac aat	576
Arg Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn	
180 185 190	
aat tac ctg aac gtg cag gcc acc aac acg cct gtg ctg ccc ggc tca	624
Asn Tyr Leu Asn Val Gln Ala Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser	
195 200 205	
gcg gcc act gcc acc agc aag ctc acc atc atc ttc aag aac ttc cag	672
Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln	
210 215 220	
gag tgt gtg gac cag aag gtg tac cag gct gag atg gac gag ctc ccg	720
Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro	
225 230 235 240	
gcc gcc ttc gtg gat ggc tct aag aac ggt ggg gac aag cac ggg gcc	768
Ala Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala	
245 250 255	
aac agc ctg aag atc act gag aag gtg tca ggc cag cac gtg gag atc	816
Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile	
260 265 270	
cag gcc aag tac atc ggc acc acc atc gtg gtg cgc cag gtg ggc cgc	864
Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg	
275 280 285	
tac ctg acc ttt gcc gtc cgc atg cca gag gaa gtg gtc aat gct gtg	912
Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val	
290 295 300	
gag gac tgg gac agc cag ggt ctc tac ctc tgc ctg ccg gcc tgc ccc	960
Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys Pro	
305 310 315 320	
ctc aac cag cag atc gac ttc cag gcc ttc cac acc aat gct gag ggc	1008
Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr Asn Ala Glu Gly	
325 330 335	
acc ggt gcc cgc agg ctg gca gcc gcc agc cct gca ccc aca gcc ccc	1056
Thr Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala Pro Thr Ala Pro	
340 345 350	
gag acc ttc cca tac gag aca gcc gtg gcc aag tgc aag gag aag ctg	1104
Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu	
355 360 365	
ccg gtg gag gac ctg tac tac cag gcc tgc gtc ttc gac ctc ctc acc	1152
Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr	
370 375 380	
acg ggc gac gtg aac ttc aca ctg gcc gcc tac tac gcg ttg gag gat	1200
Thr Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp	
385 390 395 400	
gtc aag atg ctc cac tcc aac aaa gac aaa ctg cac ctg tat gag agg	1248
Val Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Tyr Glu Arg	
405 410 415	
act cgg gac ctg cca ggc agg gcg gct gcg ggg ctg ccc ctg gcc ccc	1296

ES 2 562 832 T3

Thr Arg Asp Leu Pro Gly Arg Ala Ala Ala Gly Leu Pro Leu Ala Pro
 420 425 430
 cgg ccc ctc ctg ggc gcc ctc gtc ccg ctc ctg gcc ctg ctc cct gtg 1344
 Arg Pro Leu Leu Gly Ala Leu Val Pro Leu Leu Ala Leu Leu Pro Val
 435 440 445
 ttc tgc tag 1353
 Phe Cys
 450
 <210> 2
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Met Gln Pro Pro Arg Glu Arg Leu Val Val Thr Gly Arg Ala Gly Trp
 1 5 10 15
 Met Gly Met Gly Arg Gly Ala Gly Arg Ser Ala Leu Gly Phe Trp Pro
 20 25 30
 Thr Leu Ala Phe Leu Leu Cys Ser Phe Pro Ala Ala Thr Ser Pro Cys
 35 40 45
 Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Gly Ser
 50 55 60
 His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly Asp
 85 90 95
 Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser Gln
 100 105 110
 His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Leu Arg Thr
 115 120 125
 Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu Ile
 130 135 140
 Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Thr Pro Asn Tyr
 145 150 155 160
 Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp
 165 170 175
 Arg Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn
 180 185 190

5

ES 2 562 832 T3

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

Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln
 210 215 220

Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro
 225 230 235 240

Ala Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala
 245 250 255

Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile
 260 265 270

Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg
 275 280 285

Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val
 290 295 300

Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys Pro
 305 310 315 320

Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr Asn Ala Glu Gly
 325 330 335

Thr Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala Pro Thr Ala Pro
 340 345 350

Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu
 355 360 365

Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr
 370 375 380

Thr Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp
 385 390 395 400

Val Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Tyr Glu Arg
 405 410 415

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

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

Phe Cys
 450

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

ES 2 562 832 T3

<220>
 <223> hRGMA fc
 <220>
 <221> CDS
 5 <222> (1) ..(1929)
 <220>
 <221> péptido_senial
 <222> (1) ..(102)
 <220>
 10 <221> rasgo_misc
 <222> (103) ..(1230)
 <223> Fragmento hRGMA 47-422
 <220>
 15 <221> rasgo_misc
 <222> (1231) ..(1929)
 <223> porción Fc
 <400> 3

atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca	48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro	
1 5 10 15	
ggt tcc act ggt gac gcg gcc cag ccg gcc agg cgc gcg cgc cgt acg	96
Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Thr	
20 25 30	
aag ctt ccg tgc aag atc ctc aag tgc aac tct gag ttc tgg agc gcc	144
Lys Leu Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala	
35 40 45	
acg tcg ggc agc cac gcc cca gcc tca gac gac acc ccc gag ttc tgt	192
Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys	
50 55 60	
gca gcc ttg cgc agc tac gcc ctg tgc acg cgg cgg acg gcc cgc acc	240
Ala Ala Leu Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr	
65 70 75 80	
tgc cgg ggt gac ctg gcc tac cac tcg gcc gtc cat ggc ata gag gac	288
Cys Arg Gly Asp Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp	
85 90 95	
ctc atg agc cag cac aac tgc tcc aag gat ggc ccc acc tcg cag cca	336
Leu Met Ser Gln His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro	
100 105 110	
cgc ctg cgc acg ctc cca ccg gcc gga gac agc cag gag cgc tcg gac	384
Arg Leu Arg Thr Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp	
115 120 125	

20

ES 2 562 832 T3

agc ccc gag atc tgc cat tac gag aag agc ttt cac aag cac tgc gcc Ser Pro Glu Ile Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala 130 135 140	432
acc ccc aac tac acg cac tgt ggc ctc ttc ggg gac cca cac ctc agg Thr Pro Asn Tyr Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg 145 150 155 160	480
act ttc acc gac cgc ttc cag acc tgc aag gtg cag ggc gcc tgg ccg Thr Phe Thr Asp Arg Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro 165 170 175	528
ctc atc gac aat aat tac ctg aac gtg cag gtc acc aac acg cct gtg Leu Ile Asp Asn Asn Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val 180 185 190	576
ctg ccc ggc tca gcg gcc act gcc acc agc aag ctc acc atc atc ttc Leu Pro Gly Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe 195 200 205	624
aag aac ttc cag gag tgt gtg gac cag aag gtg tac cag gct gag atg Lys Asn Phe Gln Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met 210 215 220	672
gac gag ctc ccg gcc gcc ttc gtg gat ggc tct aag aac ggt ggg gac Asp Glu Leu Pro Ala Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp 225 230 235 240	720
aag cac ggg gcc aac agc ctg aag atc act gag aag gtg tca ggc cag Lys His Gly Ala Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln 245 250 255	768
cac gtg gag atc cag gcc aag tac atc ggc acc acc atc gtg gtg cgc His Val Glu Ile Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg 260 265 270	816
cag gtg ggc cgc tac ctg acc ttt gcc gtc cgc atg cca gag gaa gtg Gln Val Gly Arg Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val 275 280 285	864
gtc aat gct gtg gag gac tgg gac agc cag ggt ctc tac ctc tgc ctg Val Asn Ala Val Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu 290 295 300	912
cgg ggc tgc ccc ctc aac cag cag atc gac ttc cag gcc ttc cac acc Arg Gly Cys Pro Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr 305 310 315 320	960
aat gct gag ggc acc ggt gcc cgc agg ctg gca gcc gcc agc cct gca Asn Ala Glu Gly Thr Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala 325 330 335	1008
ccc aca gcc ccc gag acc ttc cca tac gag aca gcc gtg gcc aag tgc Pro Thr Ala Pro Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys 340 345 350	1056
aag gag aag ctg ccg gtg gag gac ctg tac tac cag gcc tgc gtc ttc Lys Glu Lys Leu Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe 355 360 365	1104
gac ctc ctc acc acg ggc gac gtg aac ttc aca ctg gcc gcc tac tac Asp Leu Leu Thr Thr Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr 370 375 380	1152
gcg ttg gag gat gtc aag atg ctc cac tcc aac aaa gac aaa ctg cac	1200

ES 2 562 832 T3

Ala	Leu	Glu	Asp	Val	Lys	Met	Leu	His	Ser	Asn	Lys	Asp	Lys	Leu	His	
385					390					395					400	
ctg	tat	gag	agg	act	cgg	gac	ctg	cca	ggc	ttg	aat	tct	gca	gat	atc	1248
Leu	Tyr	Glu	Arg	Thr	Arg	Asp	Leu	Pro	Gly	Leu	Asn	Ser	Ala	Asp	Ile	
				405					410					415		
gag	gga	cga	atg	gat	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	ctc	ctg	ggg	gga	1296
Glu	Gly	Arg	Met	Asp	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
			420					425					430			
ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	1344
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
		435				440					445					
tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	1392
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
	450					455					460					
gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	1440
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
	465				470					475					480	
aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	1488
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
				485					490					495		
gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	1536
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
			500					505					510			
gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	1584
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
		515					520					525				
aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	1632
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
	530					535					540					
acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	1680
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
	545				550					555					560	
acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	1728
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
				565					570					575		
gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	1776
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
			580					585					590			
ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tat	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	1824
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
		595				600						605				
aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	1872
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
	610					615					620					
gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	1920
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
	625				630					635					640	
ggt	aaa	tga														1929
Gly	Lys															

<210> 4
 <211> 642
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo Sintético
 <400> 4

ES 2 562 832 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Thr Asp Arg Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro
165 170 175

Leu Ile Asp Asn Asn Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val
180 185 190

Leu Pro Gly Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe
195 200 205

ES 2 562 832 T3

Lys Asn Phe Gln Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met
 210 215 220
 Asp Glu Leu Pro Ala Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp
 225 230 235 240
 Lys His Gly Ala Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln
 245 250 255
 His Val Glu Ile Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg
 260 265 270
 Gln Val Gly Arg Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val
 275 280 285
 Val Asn Ala Val Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu
 290 295 300
 Arg Gly Cys Pro Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr
 305 310 315 320
 Asn Ala Glu Gly Thr Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala
 325 330 335
 Pro Thr Ala Pro Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys
 340 345 350
 Lys Glu Lys Leu Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe
 355 360 365
 Asp Leu Leu Thr Thr Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr
 370 375 380
 Ala Leu Glu Asp Val Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His
 385 390 395 400
 Leu Tyr Glu Arg Thr Arg Asp Leu Pro Gly Leu Asn Ser Ala Asp Ile
 405 410 415
 Glu Gly Arg Met Asp Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 420 425 430
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 435 440 445
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 450 455 460
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

ES 2 562 832 T3

atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca	48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro	
1 5 10 15	
ggt tcc act ggt gac gcg gcc cag ccg gcc agg cgc gcg cgc cgt acg	96
Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr	
20 25 30	
aag ctt ccg tgc aag atc ctc aag tgc aac tct gag ttc tgg agc gcc	144
Lys Leu Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala	
35 40 45	
acg tcg ggc agc cac gcc cca gcc tca gac gac acc ccc gag ttc tgt	192
Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys	
50 55 60	
gca gcc ttg cgc agc tac gcc ctg tgc acg cgg cgg acg gcc cgc acc	240
Ala Ala Leu Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr	
65 70 75 80	
tgc cgg ggt gac ctg gcc tac cac tcg gcc gtc cat ggc ata gag gac	288
Cys Arg Gly Asp Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp	
85 90 95	
ctc atg agc cag cac aac tgc tcc aag gat ggc ccc acc tcg cag cca	336
Leu Met Ser Gln His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro	
100 105 110	
cgc ctg cgc acg ctc cca ccg gcc gga gac agc cag gag cgc tcg gac	384
Arg Leu Arg Thr Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp	
115 120 125	
agc ccc gag atc tgc cat tac gag aag agc ttt cac aag cac tcg gcc	432
Ser Pro Glu Ile Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala	
130 135 140	
acc ccc aac tac acg cac tgt ggc ctc ttc ggg gac ttg aat tct gca	480
Thr Pro Asn Tyr Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Leu Asn Ser Ala	
145 150 155 160	
gat atc gag gga cga atg gat cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg	528
Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu	
165 170 175	
ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc	576
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu	
180 185 190	
atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc	624
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	
195 200 205	
cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag	672
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu	
210 215 220	

ES 2 562 832 T3

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg 720
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 225 230 235 240

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat 768
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 245 250 255

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc 816
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 260 265 270

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag 864
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 275 280 285

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc 912
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 290 295 300

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg 960
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 305 310 315 320

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct 1008
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 325 330 335

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc 1056
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 340 345 350

gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg 1104
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 355 360 365

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg 1152
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 370 375 380

tct ccg ggt aaa tga 1167
 Ser Pro Gly Lys
 385

<210> 6
 <211> 388
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo Sintético
 <400> 6

5

10

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

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

Lys Leu Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala

ES 2 562 832 T3

35		40		45											
Thr	Ser	Gly	Ser	His	Ala	Pro	Ala	Ser	Asp	Asp	Thr	Pro	Glu	Phe	Cys
50						55					60				
Ala	Ala	Leu	Arg	Ser	Tyr	Ala	Leu	Cys	Thr	Arg	Arg	Thr	Ala	Arg	Thr
65					70					75					80
Cys	Arg	Gly	Asp	Leu	Ala	Tyr	His	Ser	Ala	Val	His	Gly	Ile	Glu	Asp
				85					90					95	
Leu	Met	Ser	Gln	His	Asn	Cys	Ser	Lys	Asp	Gly	Pro	Thr	Ser	Gln	Pro
			100					105						110	
Arg	Leu	Arg	Thr	Leu	Pro	Pro	Ala	Gly	Asp	Ser	Gln	Glu	Arg	Ser	Asp
		115					120					125			
Ser	Pro	Glu	Ile	Cys	His	Tyr	Glu	Lys	Ser	Phe	His	Lys	His	Ser	Ala
130						135					140				
Thr	Pro	Asn	Tyr	Thr	His	Cys	Gly	Leu	Phe	Gly	Asp	Leu	Asn	Ser	Ala
145					150					155					160
Asp	Ile	Glu	Gly	Arg	Met	Asp	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
				165					170					175	
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
			180					185					190		
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
		195					200						205		
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
	210					215					220				
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
225					230					235					240
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
				245					250					255	
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
			260					265					270		
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
		275					280						285		
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
	290					295					300				

ES 2 562 832 T3

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
385

<210> 7

<211> 1.431

<212> ADN

<213> Rattus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1) ..(1431)

<400> 7

5

10

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

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

aag ctt ggt acc gag ctc gga tcc act agt cca gtg tgg tgg aat tct 144
Lys Leu Gly Thr Glu Leu Gly Ser Thr Ser Pro Val Trp Trp Asn Ser
35 40 45

gca gat atc aca agt ttg tac aaa aaa gca gcc tcc ccg tgc aag atc 192
Ala Asp Ile Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly Ser Pro Cys Lys Ile
50 55 60

ctc aag tgc aac tct gag ttc tgg agc gcc acg tgc tca ggc agc cac 240
Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Ser Gly Ser His
65 70 75 80

gcc cct gcc tct gac gac gtg ccc gag ttc tgt gct gcc ctg cgc acc 288
Ala Pro Ala Ser Asp Asp Val Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu Arg Thr
85 90 95

tac gcc ctg tgc acg cga cgg aca gcc cgc acc tgc cgg ggc gac ctg 336
Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly Asp Leu
100 105 110

ES 2 562 832 T3

gct tac cac tgc gct gtc cat ggc ata gag gac ctc atg agc cag cac	384
Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser Gln His	
115 120 125	
aac tgc tcc aag gat ggc ccc acc tca cag cct cga gtg cgc acg ctc	432
Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Val Arg Thr Leu	
130 135 140	
ccg cca gct ggg gac agc cag gag cgc tca gat agc ccc gag atc tgc	480
Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu Ile Cys	
145 150 155 160	
cac tat gag aag agt ttc cac aag cac tca gct gcc ccc aac tac act	528
His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Ala Pro Asn Tyr Thr	
165 170 175	
cac tgc ggc ctc ttt ggg gac cca cac ctc agg act ttc aca gac cac	576
His Cys Gly Thr Cys Lys Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp His	
180 185 190	
ttc cag aca tgt aag gtg caa ggc gct tgg cct ctc atc gac aat aat	624
Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn Asn	
195 200 205	
tac ctg aac gtg cag gtc acc aat aca cct gtg ctg ccc ggc tct gcc	672
Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser Ala	
210 215 220	
gcc act gcc acc agc aag ctc acc atc atc ttc aag aac ttc caa gag	720
Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln Glu	
225 230 235 240	
tgt gtg gac cag aaa gta tac caa gcc gag atg gac gag ctt ccg tcc	768
Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro Ser	
245 250 255	
gcc ttt gcc gat ggc tcc aaa aac ggt gga gat aaa cac gga gcc aac	816
Ala Phe Ala Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala Asn	
260 265 270	
agc ctg aag atc aca gag aag gtg tca ggc cag cac gtg gag atc cag	864
Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile Gln	
275 280 285	
gcc aag tac atc ggc acc acc atc gtg gtg aga cag gtg ggc cgc tac	912
Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg Tyr	
290 295 300	
ctg acc ttc gcc gtc cgg atg ccc gag gag gta gtc aac gcc gtg gag	960
Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val Glu	
305 310 315 320	
gac cgt gac agc caa ggc ctc tac ctc tgc ctg cgg ggc tgc ccg ctc	1008
Asp Arg Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys Pro Leu	
325 330 335	
aac cag cag atc gac ttc cag gct ttc cgt gcc aac gcc gag agc cct	1056
Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe Arg Ala Asn Ala Glu Ser Pro	
340 345 350	
cgc agg cca gca gct gcc agc ccc tct cct gtg gtc ccc gag aca ttt	1104
Arg Arg Pro Ala Ala Ala Ser Pro Ser Pro Val Val Pro Glu Thr Phe	
355 360 365	
ccg tac gag aca gct gtg gcc aag tgc aaa gag aag ctg cct gta gaa	1152

ES 2 562 832 T3

Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu Pro Val Glu
 370 375 380
 gac ttg tac tac cag gcc tgt gtc ttc gac ctc ctc acg act ggc gac 1200
 Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr Thr Gly Asp
 385 390 395 400
 gtg aac ttc acg ctg gcc gcc tac tat gct ttg gag gat ggc aag atg 1248
 Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp Gly Lys Met
 405 410 415
 ctc cac tcc aac aag gac aag cta cac ctg ttt gaa agg act cgg gag 1296
 Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Phe Glu Arg Thr Arg Glu
 420 425 430
 ctg cct gac cca gct ttc ttg tac aaa gtg gtg ata tcc agc aca gtg 1344
 Leu Pro Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Ile Ser Ser Thr Val
 435 440 445
 gcg gcc gct cga gga ggg ccc gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat 1392
 Ala Ala Ala Arg Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
 450 455 460
 ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat tga 1431
 Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 465 470 475

<210> 8
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.
 <400> 8

5

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

10

ES 2 562 832 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 562 832 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 9
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH 5F9
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (62) ..(62)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 9

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

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

ES 2 562 832 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> VL 5F9
 <400> 10

5

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

Asp Gln Ala Ser Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

Arg

<210> 11
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> región constante gamma-1 de Ig
 <400> 11

10

15

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

ES 2 562 832 T3

		20				25				30					
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40				45				
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90						95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
		115					120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165					170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185						190	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230					235					240
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245					250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			

ES 2 562 832 T3

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

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

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

<210> 12
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> mutante de la región constante gamma-1 de Ig
 <400> 12

5

10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 562 832 T3

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

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

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

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

<210> 14
<211> 105
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Región constante lambda de Ig
<400> 14

5

10

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

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

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

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

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

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

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 15
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> VH3-48/JH3 FR1
<400> 15

15

20

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

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

25

<210> 16
<211> 14

ES 2 562 832 T3

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH3-48/JH3 FR2
 <400> 16
 5
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH3-48/JH3 FR3
 <400> 17
 10
 15
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20
 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH3-49/JH3 FR4
 <400> 18
 20
 25
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH3-48/JH4 FR4
 <400> 19
 30
 35
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH3-48/JH6 FR4
 <400> 20
 40
 45
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH3-33/JH6 FR!
 <400> 21
 50

ES 2 562 832 T3

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

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

<210> 22
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH3-33/JH6 FR2
 <400> 22

5

10

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

<210> 23
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH3-33/JH6 FR3
 <400> 23

15

20

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

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

<210> 24
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH3-23/JH3 FR1
 <400> 24

25

30

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

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

<210> 25
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH3-23/JH3 FR2
 <400> 25

35

40

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

<210> 26
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH3-23/JH3 FR3
 <400> 26

45

ES 2 562 832 T3

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

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

5
 <210> 27
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> A18/JK2 FR1
 <400> 27

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20

15
 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20
 <223> A18/JK2 FR2
 <400> 28

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

25
 <210> 29
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 30
 <223> A18/JK2 FR3
 <400> 29

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

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

35
 <210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40
 <223> A18/JK2 FR4
 <400> 30

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

45
 <210> 31
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 50
 <223> A17/JK2 FR1
 <400> 31

ES 2 562 832 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys

20

5

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> A17/JK2 FR2
 <400> 32

10

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

15

<210> 33
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> A17/JK2 FR3
 <400> 33

20

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

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

25

<210> 34
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH 5F9
 <400> 34

30

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

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

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

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

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

35

ES 2 562 832 T3

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

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

Val Ser Ser
 115

<210> 35
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH 5F9.1-GL
 <400> 35

5

10

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
 115

<210> 36
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH 5F9.2-GL
 <400> 36

15

20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

ES 2 562 832 T3

<211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> VH 5F9.4-GL
 <400> 38

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
 115

10 <210> 39
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> VH 5F9.5-GL
 <400> 39

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

ES 2 562 832 T3

20 25 30

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> VH 5F9.6-GL
<400> 40

5

10

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

15
<210> 41
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 562 832 T3

<220>

<223> VH 5F9.7-GL

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

5

<210> 42

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> VH 5F9.8-GL

<400> 42

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

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

15

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

ES 2 562 832 T3

35 40 45

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 43
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH 5F9.9-GL
 <400> 43

5

10

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

15

<210> 44
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VL 5F9.1-GL
 <400> 44

ES 2 562 832 T3

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

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

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

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

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

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

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

Arg

- <210> 45
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> VL 5F9.2-GL
- <400> 45

5

10

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

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

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

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

ES 2 562 832 T3

50 55 60

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

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

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

Arg

<210> 46
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> VL 5F9.3-GL
<400> 46

5

10

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

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 47
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> VH h5F9.1
<400> 47

15

20

ES 2 562 832 T3

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

- <210> 48
- <211> 115
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> VH h5F9.2
- <400> 48

5

10

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

ES 2 562 832 T3

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 51
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> VL h5F9.19
<400> 51

5

10

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

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

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

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

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

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

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

Arg

ES 2 562 832 T3

5
 <210> 52
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VL h5F9.20
 <400> 52

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

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

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

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

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

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

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

10 Arg

<210> 53
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VL h5F9.21
 <400> 53

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

ES 2 562 832 T3

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 54
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VL h5F9.22
 <400> 54

5

10

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

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

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

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

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

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

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

Arg

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

15

ES 2 562 832 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> VH 8D1
 <400> 55

5

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

<210> 56
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VL 8D1
 <400> 56

10

15

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asn Tyr
 20 25 30

ES 2 562 832 T3

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

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Tyr Ile Pro Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

5
 <210> 57
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH 5F9 CDR H1
 <400> 57

10
 Asn Tyr Gly Met Asn
 1 5

15
 <210> 58
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH 5F9 CDR-H2
 <400> 58

20
 Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

25
 <210> 59
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH 5F9 CDR-H3
 <400> 59

30
 Gly Thr Thr Pro Asp Tyr

1 5

35
 <210> 60
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VL 5F9 CDR-L1
 <400> 60

ES 2 562 832 T3

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

5 <210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VL CDR-L2 5F9
 <400> 61

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

10 <210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VL 5F9 CDR-L3
 <400> 62

Phe Gln Ala Thr His Asp Pro Leu Thr
1 5

15 <210> 63
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH 8D1 CDR-H1
 <400> 63

Ser Tyr Val Met His
1 5

20 <210> 64
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VH 8D1 CDR-H2
 <400> 64

Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

25 <210> 65
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 8D1 VH CDR-H3
 <400> 65

Ala Arg Arg Asn Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Asp Tyr
1 5 10

30 <210> 66
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

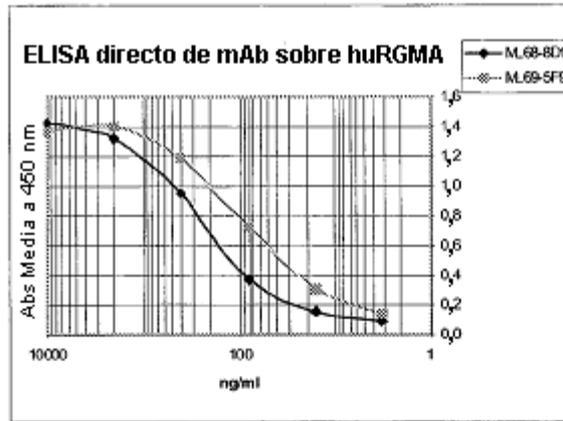
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de unión a la Molécula de Orientación Repulsiva humana (RGM A) para su uso en el tratamiento de la degeneración la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR).
2. La proteína de unión para su uso como se define en la reivindicación 1, en donde dicho tratamiento es un tratamiento terapéutico o profiláctico, neuroregenerador o neuroprotector, local o sistémico.
- 10 3. La proteína de unión para su uso como se define en la reivindicación 1 o 2, en donde como resultado de dicho tratamiento
- a) se observa la brotación de neuronas de la retina; y/o
- b) los axones de las CGR (células ganglionares de la retina) en la retina son preservados de la degeneración.
- 15 4. La proteína de unión para su uso como se define en una de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha degeneración de la CFNR se asocia con una enfermedad seleccionada entre:
- retinopatía diabética, neuropatía óptica isquémica, retinosquiasis ligada al cromosoma X, neuropatía óptica inducida por fármacos, distrofia de la retina, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedades oculares **caracterizadas por** drusen de la cabeza del nervio óptico, enfermedad ocular **caracterizada por**
- 20 **determinantes genéticos** de la degeneración de los fotorreceptores, distrofia de conos y bastones autosómica recesiva, y trastornos mitocondriales con neuropatía óptica.
- 25 5. La proteína de unión para su uso como se define en una de las reivindicaciones anteriores que se disocia de la RGM humana con una K_D de 1×10^{-7} M o menos y una constante de velocidad k_{off} de $1 \times 10^{-2} s^{-1}$ o menos, ambas determinadas mediante resonancia de plasmón superficial.
- 30 6. La proteína de unión para su uso como se define en una de las reivindicaciones anteriores que se une a RGM A humana y neutraliza la actividad inhibitoria del crecimiento de neuritas de RGM A humana como se determina en un ensayo convencional in vitro.
- 35 7. La proteína de unión para su uso como se define en una de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo humanizado.
- 40 8. La proteína de unión para su uso como se define en una de las reivindicaciones anteriores, que comprende un dominio de unión a antígeno, dicha proteína de unión capaz de unirse a un epítipo de una molécula de RGM, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una CDR seleccionada del grupo que consiste en:
- a) las secuencias de aminoácidos del grupo CDR-H3 que consisten en los SEQ ID NO: 59 y 65, y secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50% con una de dichas secuencias;
- y/o
- b) las secuencias de aminoácidos del grupo CDR-L3 que consisten en los SEQ ID NO: 62 y 68, y secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tiene una identidad de secuencia de al menos 50% con una de dichas secuencias.
- 45 9. La proteína de unión para su uso como se define en una de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente al menos una CDR seleccionada entre:
- a) el grupo CDR-H1 de las secuencias de aminoácidos que consisten en los SEQ ID NO: 57 y 63; y/o
- b) el grupo de CDR-L1 de las secuencias de aminoácidos que consisten en los SEQ ID NO: 60 un 66; y/o
- 50 c) el grupo de CDR-H2 de las secuencias de aminoácidos que consisten en los SEQ ID NO: 58 y 64; y/o
- d) el grupo de CDR-L2 de las secuencias de aminoácidos que consisten en los SEQ ID NO: 61 y 67; y secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50% con una de dichas secuencias.
- 55 10. La proteína de unión para su uso como se define en la reivindicación 9, que comprende al menos 3 CDR que - se seleccionan entre un conjunto de CDR de dominio variable que consiste en:

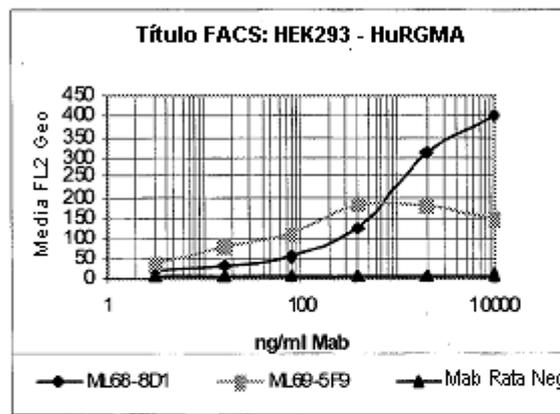
Conjunto VH 5F9		
VH 5F9 CDR-H1	Residuos 31-35 del SEQ ID NO: 34.	SEQ ID NO: 57
VH 5F9 CDR-H2	Residuos 50 a 66 del SEQ ID NO:34	SEQ ID NO: 58
VH 5F9 CDR-H3	Residuos 99 a 104 del SEQ ID NO:34	SEQ ID NO: 59
Conjunto VL 5F9		
VL 5F9 CDR-L1	Residuos 24-39 del SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 60
VL 5F9 CDR-L2	Residuos 55-61 del SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 61
VL 5F9 CDR-L3	Residuos 94 a 102, del SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 62
Conjunto VH 8D1		
VH 8D1 CDR-H1	Residuos 31 a 35 del SEQ ID NO:55	SEQ ID NO: 63
VH 8D1 CDR-H2	Residuos 50-66 del SEQ ID NO: 55.	SEQ ID NO: 64
VH 8D1 CDR-H3	Residuos 97 a 110 del SEQ ID NO:55	SEQ ID NO: 65
Conjunto VL 8D1		
VL 8D1 CDR-L1	Residuos 24 a 34 del SEQ ID NO:56	SEQ ID NO: 66
VL 8D1 CDR-L2	Residuos 50 a 56 del SEQ ID NO:56	SEQ ID NO: 67
VL 8D1 CDR-L3	Residuos 89 a 97 del SEQ ID NO:57	SEQ ID NO: 68

- 5 o un conjunto de dominios variables en donde al menos una de dichas 3 CDR es una secuencia de aminoácidos de CDR modificada que tiene una identidad de secuencia de al menos 50% con la secuencia parental.
11. La proteína de unión para su uso como se define en la reivindicación 10, que comprende al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable.
- 10 12. La proteína de unión para su uso como se define en la reivindicación 11, en donde dichos al menos dos conjuntos de CDR de dominio variable se seleccionan de un grupo que consiste en:
conjunto VH 5F9 y conjunto VL 5F9; y
conjunto VH 8D1 y conjunto VL 8D1.
- 15 13. La proteína de unión para su uso como se define en una de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente un marco aceptor humano.
14. La proteína de unión para su uso como se define en una de las reivindicaciones anteriores, que comprende al menos un dominio variable de cadena pesada seleccionado entre los SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, y 43; y/o al menos un dominio variable de cadena ligera seleccionado entre los SEQ ID NO: 44, 45, y 46.
- 20 15. La proteína de unión para su uso como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 13 y 14, en donde dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácido en la región del marco en un residuo clave, dicho residuo clave se selecciona del grupo que consiste en:
25 (posición de la secuencia de la cadena pesada): 1, 5, 37, 48, 49, 88, 98;
(posición de la secuencia de la cadena ligera): 2, 4, 41, 51.
16. La proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha proteína de unión comprende al menos un dominio variable (mutado en marco) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre los grupos que consisten en:
30 (secuencias de la cadena pesada) SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50; y
(secuencias de la cadena ligera) SEQ ID NO: 51, 52, 53, y 54.
17. La proteína de unión para su uso como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo seleccionado entre 5F9 y 8D1.
35

A



B



C

FACS de Línea Celular Estable BAF3-rataRGMA

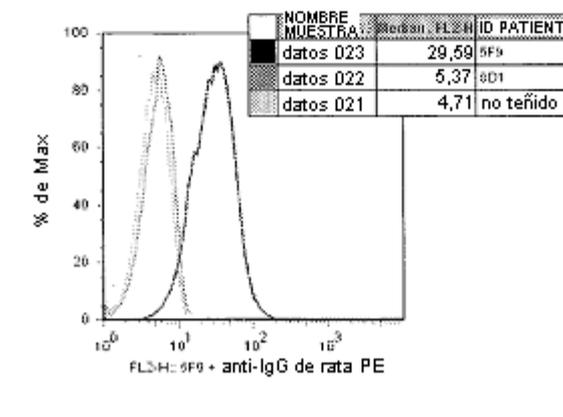


Fig. 1

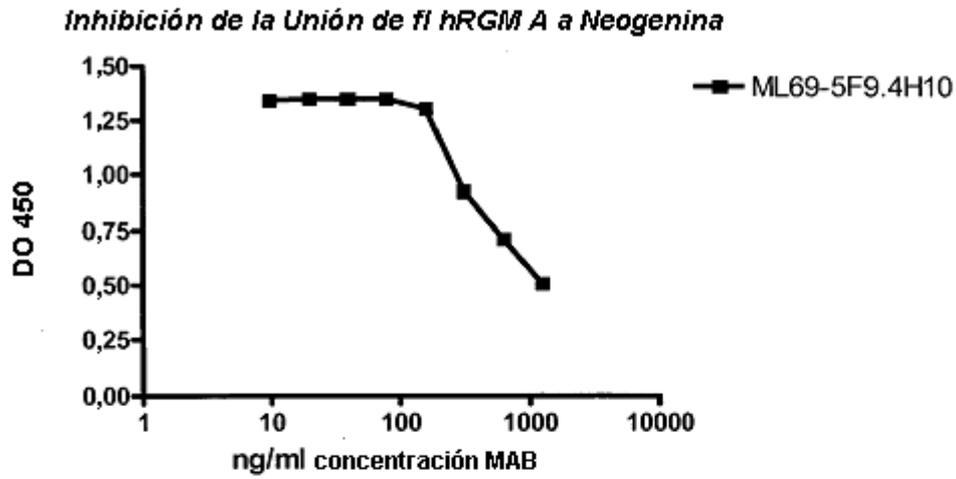


Fig. 2

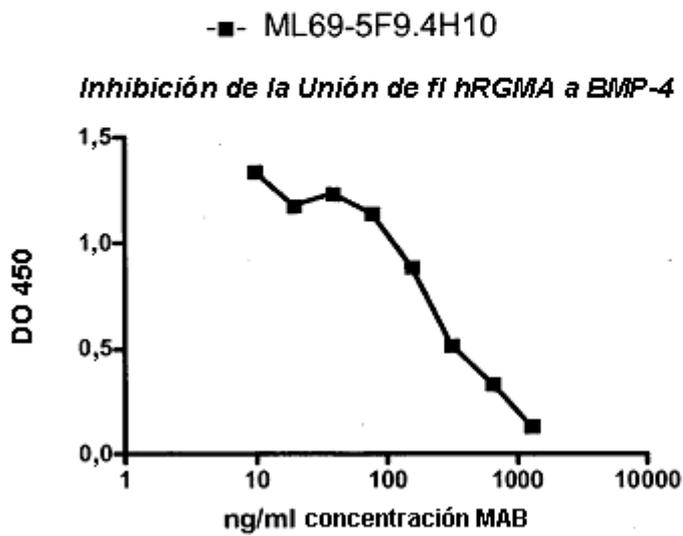


Fig. 3

Inhibición de la unión del Fragmento 0 a BMP-4 por MAB 5F9

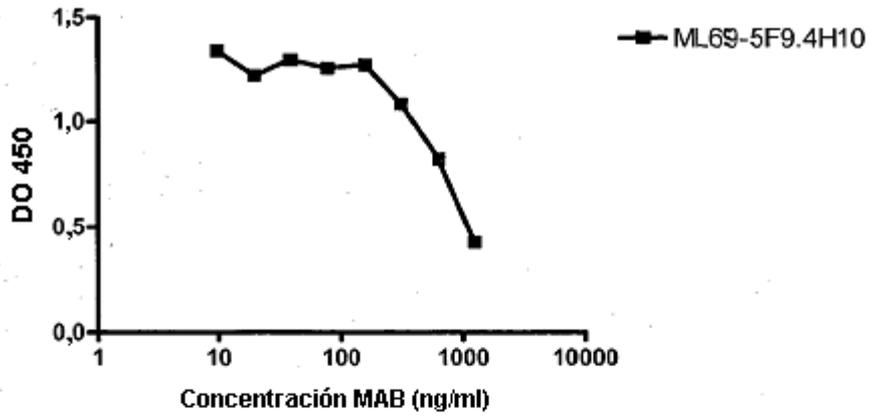


Fig. 4

Inhibición de la unión de hRGM A completa, conjugada con fc a BMP-2

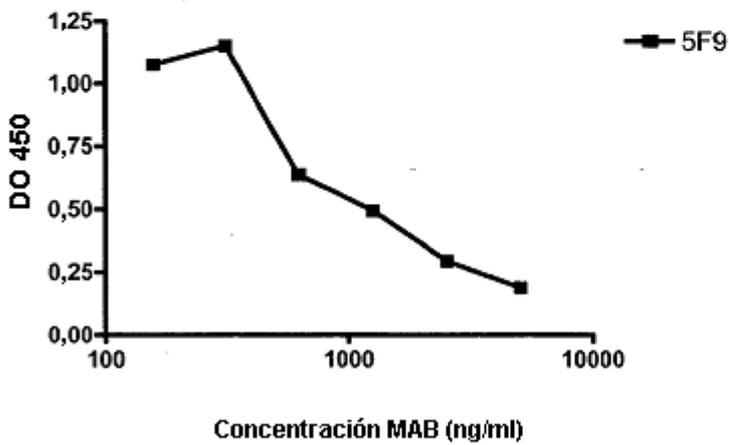


Fig. 5

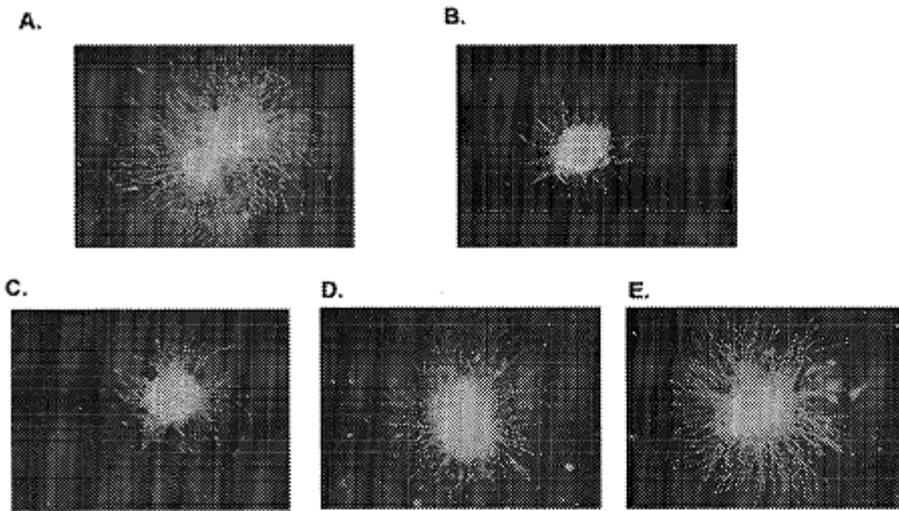


Fig. 6

Ensayo de ML69-5F9 sobre RGM A Fr. 0

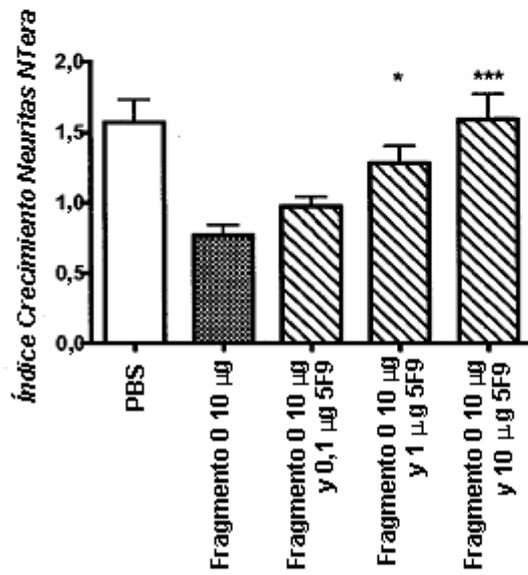


Fig. 7

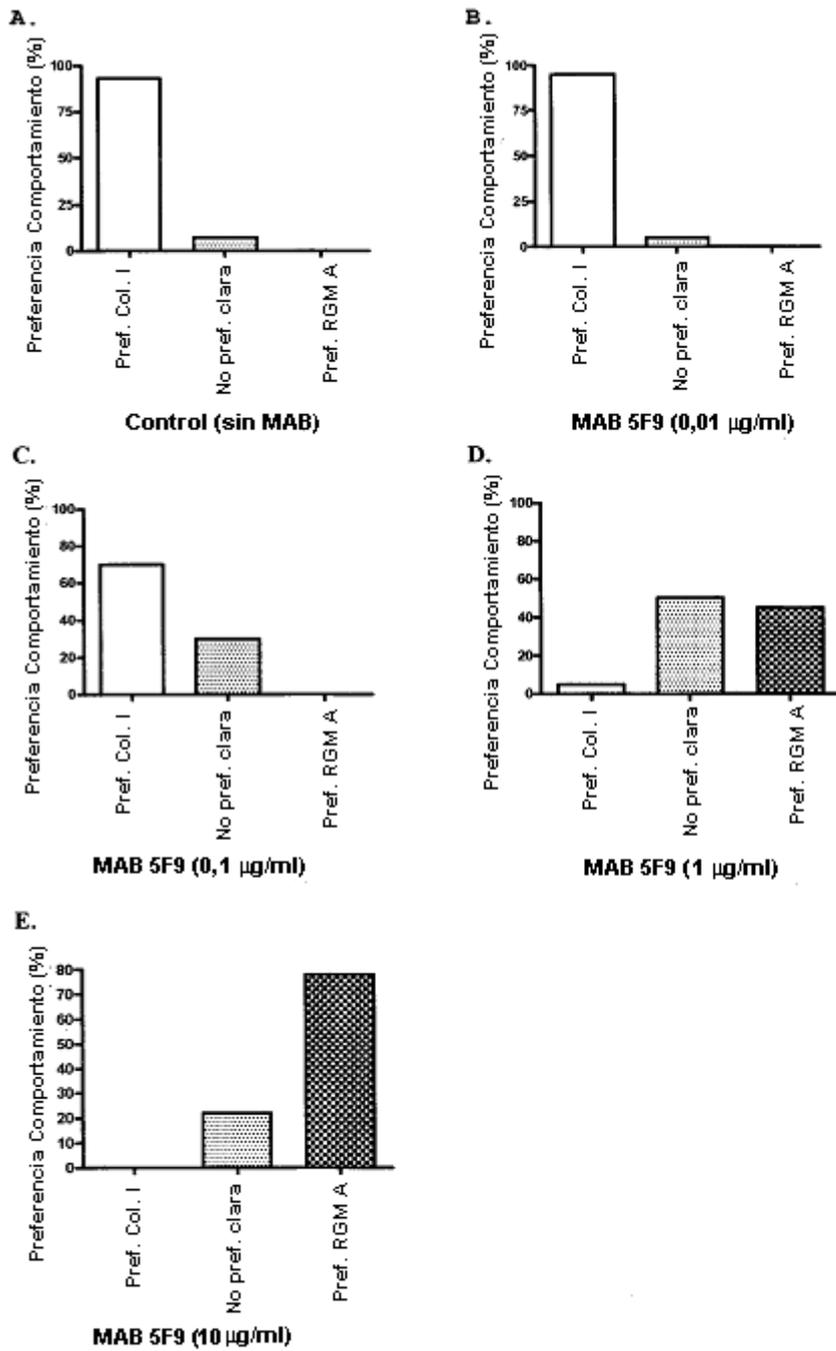


Fig. 8

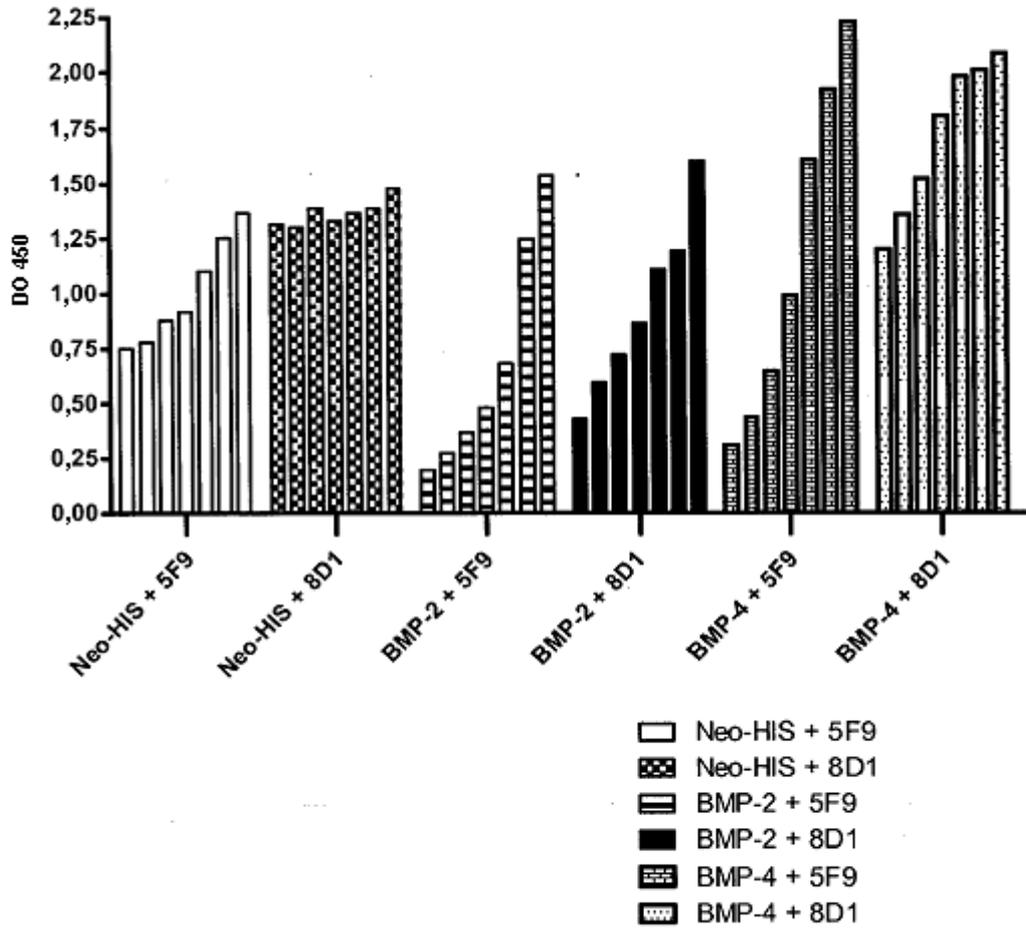
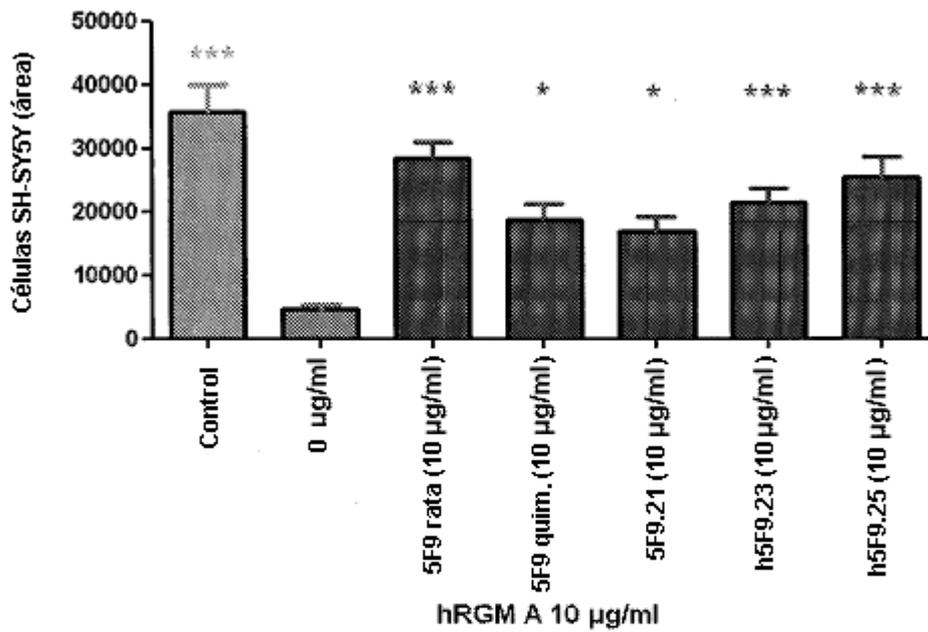


Fig. 9

Ensayo de quimiotaxis (sin EGF): Prueba de 5F9 humanizado, quimérico, de rata, n = 2



* $p < 0,05$: **significación** vs. 5F9 0 µg/ml

*** $p < 0,001$: **significación** vs. 5F9 0 µg/ml

*** $p < 0,001$: **significación** vs. 5F9 0 µg/ml

Fig. 10

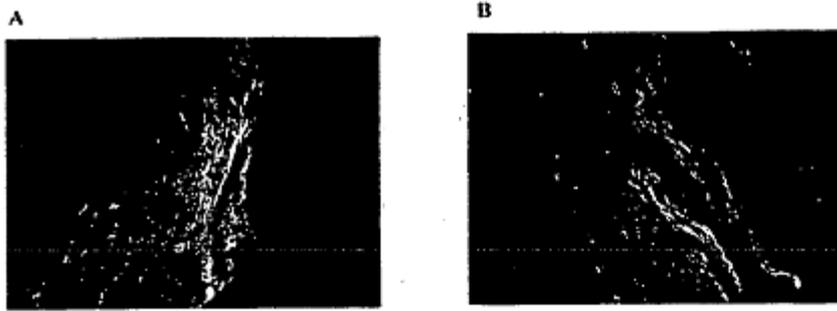


Fig. 11

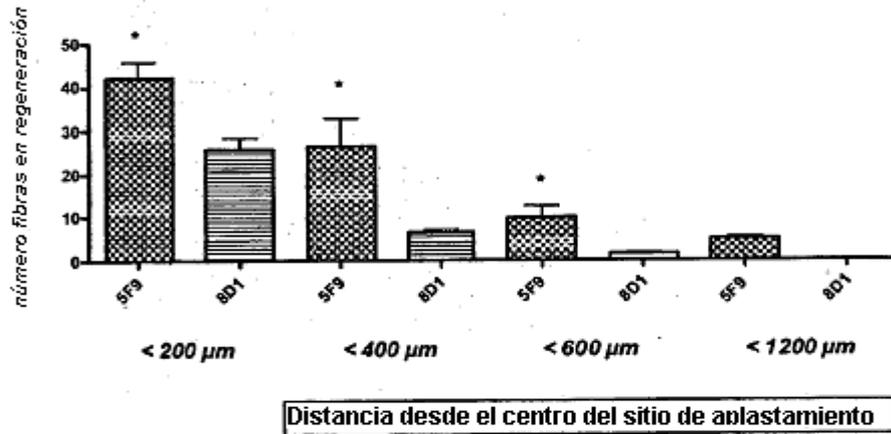


Fig. 12 A

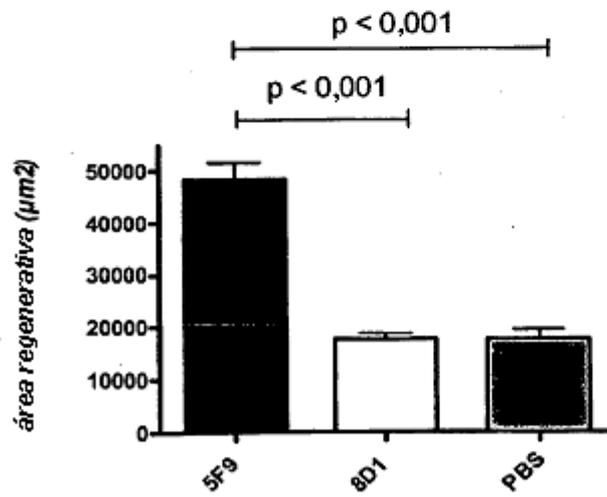


Fig. 12 B

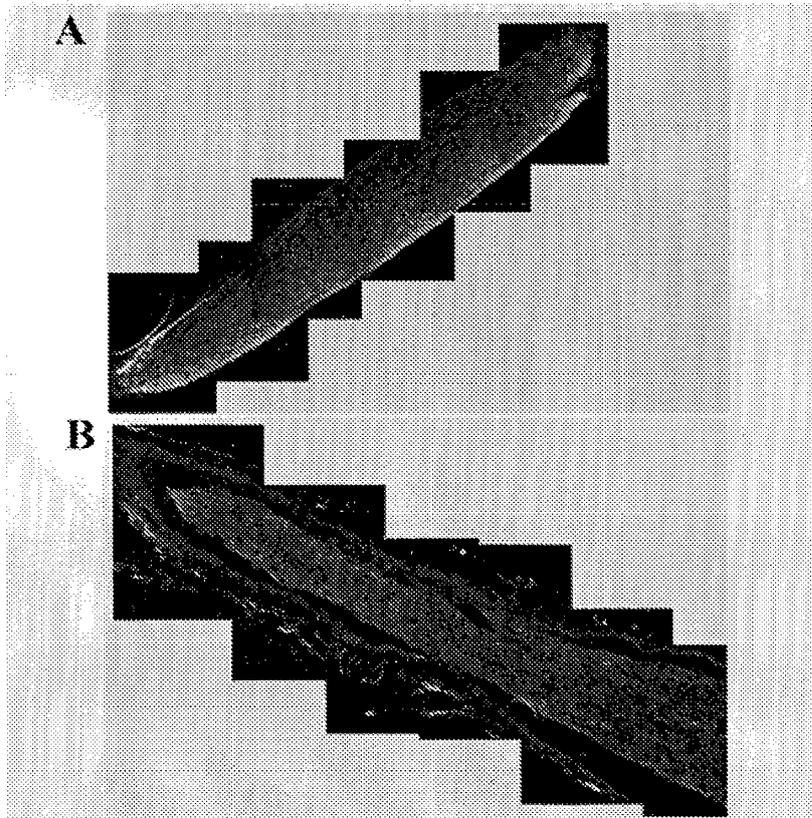


Fig. 13

Tratamiento con 5F9 sistémico en Modelo de aplastamiento del nervio óptico

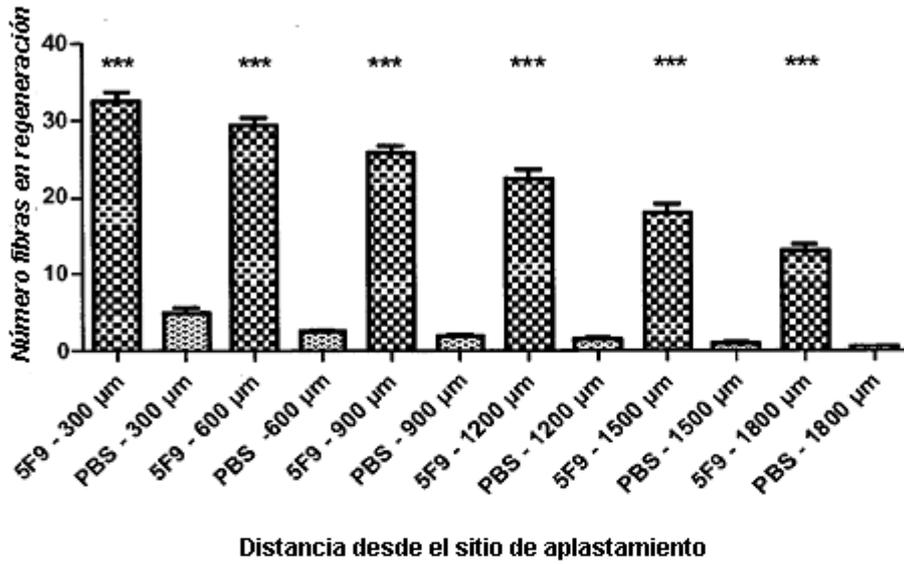


Fig. 14A

**Aplastamiento Nervio Óptico
5F9 sistémico**

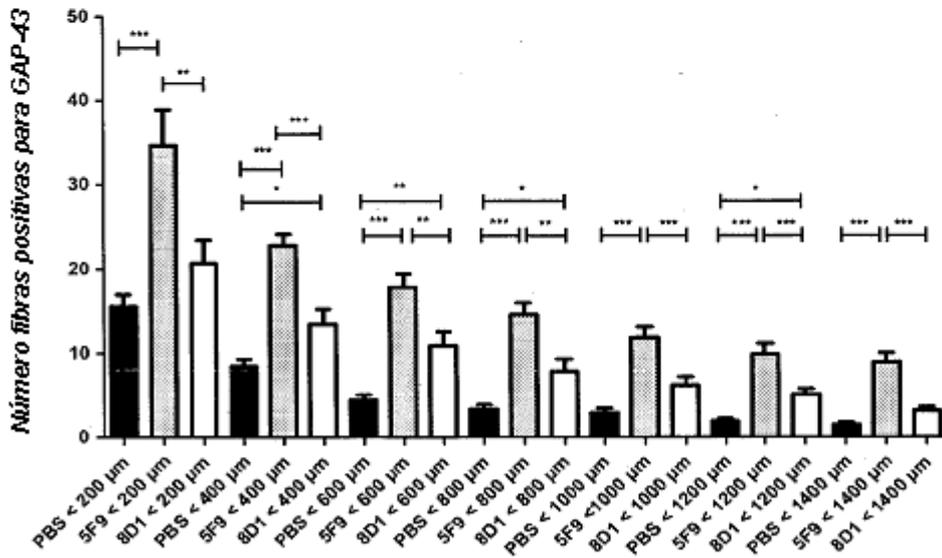


Fig. 14B

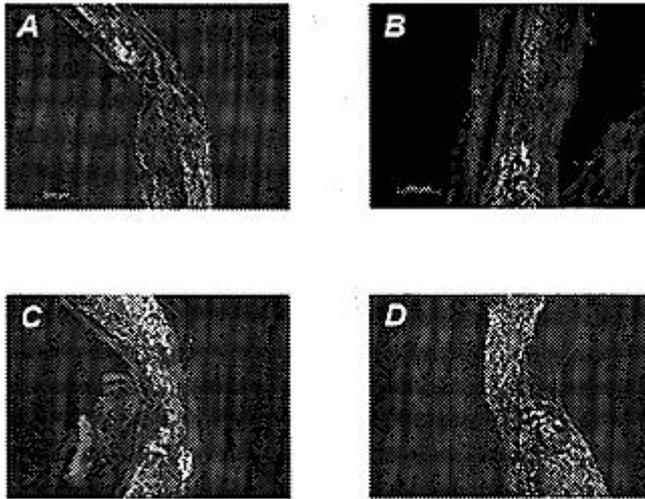


Fig. 15

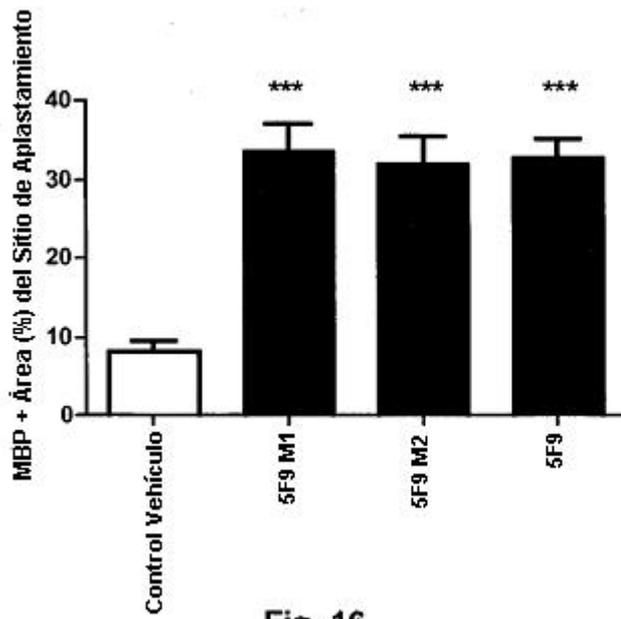


Fig. 16

**5F9 Conserva los Axones RGC en la
Protección de CFNR de la Retina**

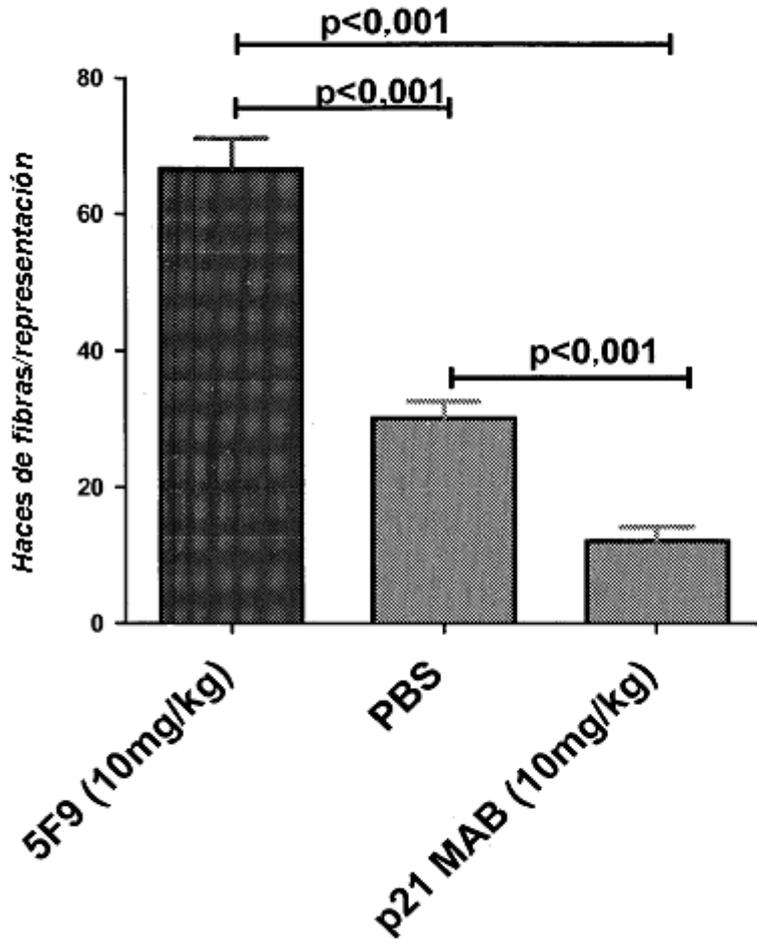


Fig. 17

5F9 Incrementa el Numero de Neuronas Intrarretinianas en Brotación

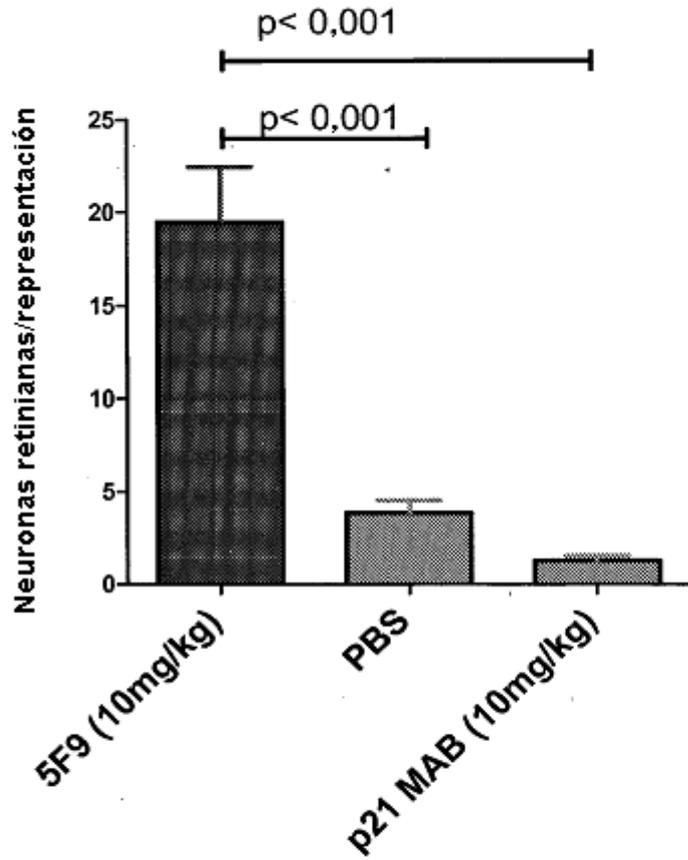


Fig. 18

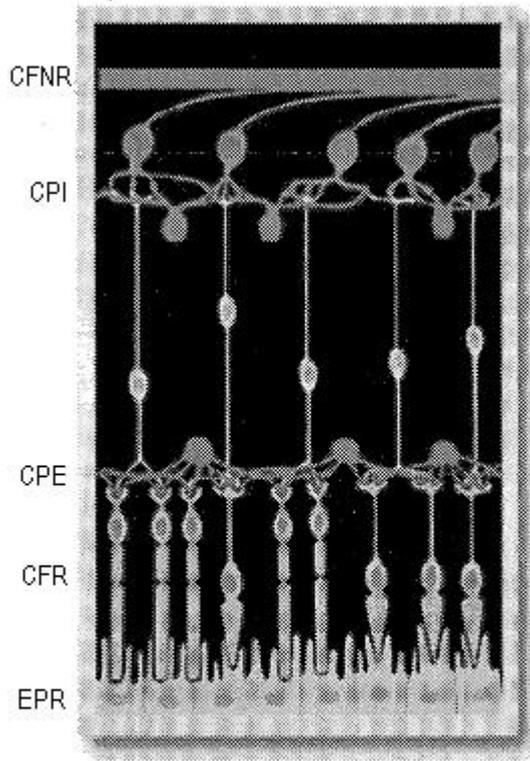


Fig. 19