

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 924**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2007 PCT/US2007/085349**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.05.2008 WO08064292**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2007 E 07854735 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2091563**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales neutralizantes contra el receptor de Nogo-66 (NGR) y usos de los mismos**

30 Prioridad:

21.11.2006 US 860256 P

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

25.04.2017

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (50.0%)
100 Abbott Park Road
Abbott Park IL 60064-3500, US y
ABBVIE DEUTSCHLAND GMBH & CO KG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MEZLER, MARIO;
MOELLER, ACHIM;
MUELLER, REINHOLD;
MUELLER, BERNHARD K.;
GHAYUR, TARIQ;
BARLOW, EVE H.;
SCHMIDT, MARTIN;
MEYER, AXEL y
TEUSCH, NICOLE**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 609 924 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 neutralizantes contra el receptor de Nogo-66 (NGR) y usos de los mismos

5 **Campo técnico**

La presente solicitud describe proteínas de unión al receptor de Nogo-66, particularmente anticuerpos monoclonales, que tienen la capacidad de unirse al receptor de Nogo-66 y neutralizar la función del receptor de Nogo-66. Estos anticuerpos por lo tanto, son útiles en el tratamiento de varios estados que incluyen pero no se limitan a
10 traumatismos cerebrales, lesiones de médula espinal, ictus, enfermedades neurovegetativas, y esquizofrenia en mamíferos.

Información de los antecedentes

15 La regeneración axonal tras una lesión en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos es imposible casi siempre; el resultado depende del equilibrio entre la capacidad intrínseca de las fibras nerviosas del SNC para rebrotar, y los factores inhibidores del SNC, que se localizan en el microambiente del sitio de la lesión, que evitan activamente el re-brote y por lo tanto la regeneración de los tractos de fibras lesionadas.

20 Se ha establecido que la mielina del SNC, generada por los oligodendrocitos, es el factor más relevante que no permite el crecimiento axonal en la fase temprana de una lesión, produciendo el colapso del crecimiento de conos in vitro así como in vivo, que da como resultado la inhibición directa del crecimiento del axón (para una revisión véase: Lee et al., 2003). Solo últimamente se han identificado factores inhibidores principales de la mielina del SNC: la
25 glucoproteína de mielina de oligodendrocitos (OMgp), glucoproteína asociada a mielina (MAG) y Nogo-A (Domeniconi et al., 2002; revisiones: Woolf y Bloechinger, 2002; McGee y Strittmatter, 2003; Lee et al., 2003). La última proteína contiene un dominio Nogo-66 (GrandPré et al., 2000), que ejerce una función inhibitoria principal. De manera interesante, las tres proteínas inhibitorias presentan altos niveles de expresión en el SNC e interactúan con el mismo receptor anclado al resto glucosilfosfatidilinositol (GPI) neuronal, el receptor de Nogo-66, o NgR (Fournier et al., 2001). El receptor de Nogo-66, NgR, es una proteína de 473 aminoácidos unida al glucosilfosfatidilinositol.
30 Consiste en una secuencia de señal, seguida por 8 dominios con repeticiones ricas en leucina, un dominio en el extremo C con repeticiones ricas en leucina (que forman en conjunto el denominado ectodominio) y el dominio de anclaje a GPI. Por medio del ancla GPI, el NgR se une al plasmalema neuronal externo.

El propio NgR pertenece a una familia de tres proteínas ancladas a GPI enriquecidas del SNC (llamadas NgR, NgR
35 2 y NgR 3) con una identidad de secuencia de aproximadamente el 40 % pero con una organización estructural total muy similar (Barton et al. 2003; Lauren et al. 2003; Pignot et al. 2003). Aunque el NgR es el único miembro conocido que interactúa con múltiples moléculas inhibitorias asociadas a la mielina, se ha demostrado recientemente que la MAG también interactúa con NgR 2 (Venkatesh et al. 2005). La función de los homólogos de NgR no se conoce actualmente. El propio NgR no se expresa durante el desarrollo temprano en roedores o pollos, pero presenta altos
40 niveles de expresión en animales adultos; el NgR se expresa en la mayoría si no en todas las regiones del SNC, incluyendo la médula espinal (Hunt et al., 2002a, b). La expresión en la médula espinal se ha demostrado en el pollo (Fournier et al., 2001), rata (Hunt et al., 2002a) y ratón (Wang et al., 2002b) tanto a nivel de ARNm como de proteína. En el tejido del SNC de adultos, la proteína NgR se expresa en todas las neuronas maduras, incluyendo sus procesos axonales. La unión del ligando a NgR inicia una cascada de señalización intracelular, que da como
45 resultado la inhibición del crecimiento del axón, y el colapso de crecimiento de conos. Como el NgR no contiene un dominio transmembrana, la señalización necesita un co-receptor, que transduce la señal de interacción NgR/ligando a la célula. La etapa inicial de la señalización NgR es su interacción con los co-receptores p75 o TROY (Wong et al., 2002; Shao et al., 2005; Park et al., 2005). Se ha identificado un segundo co-receptor, llamado Lingo-1. Solamente un complejo ternario entre NgR, P75 o TROY y Lingo-1 constituye el complejo de señalización funcional (Mi et al.,
50 2004; Park et al., 2005). El resultado de esta señalización es un reordenamiento del citoesqueleto de actina. En la neurona este cambio del citoesqueleto de actina produce una inhibición del crecimiento del axón y la inducción del colapso del crecimiento del cono.

In vitro, las células del ganglio de la raíz dorsal de ratones (-/-) pierden la capacidad de unión a Nogo 66 y dan
55 menos respuesta a los efectos inhibidores de Nogo66, Fc-MAG, OMgp o mielina en un ensayo de colapso de crecimiento del cono (Kim et al., 2004). Los ratones NgR (-/-) presentaban un aumento de la regeneración de los tractos del tallo encefálico, incluyendo los tractos rubroespinal y rafeespinal, tras una lesión parcial o completa de la médula espinal. Incluso tras una transección experimental completa de la médula espinal, los ratones NgR (-/-) presentaban un aumento de la recuperación funcional en un ensayo de campo abierto. A continuación de la
60 hemisección y la transección de la médula espinal, la recuperación de los ratones NgR (-/-) era significativamente mejor que la de los homocigotos (+/+) y la camada de heterocigotos (Kim et al., 2004).

El documento WO2005016955 desvela polipéptidos inmunogénicos del receptor-1 de Nogo, anticuerpos contra el
65 receptor-1 de Nogo, fragmentos de unión al antígeno de los mismos, receptores Nogo solubles y proteínas de fusión de los mismos y ácidos nucleicos que codifican los mismos. También desvela composiciones que comprenden, y métodos para producir y utilizar dichos anticuerpos contra el receptor de Nogo, fragmentos de unión al antígeno de

los mismos, receptores Nogo solubles y proteínas de fusión de los mismos y ácidos nucleicos que codifican los mismos.

La presente solicitud describe la generación de anticuerpos monoclonales neutralizantes contra el NgR, que compiten selectivamente por la unión con Nogo-66 y que se espera que mejoren trastornos en los que la actividad de NgR puede ser perjudicial. Se espera que los anticuerpos monoclonales neutralizantes de la presente invención, por ejemplo, promuevan la regeneración neuronal del SNC lesionado, específicamente tras una lesión aguda de la médula espinal, traumatismo cerebral o enfermedades degenerativas, por ejemplo, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer o esclerosis múltiple.

Breve descripción de las figuras

Figura 1a y 1b: Unión del anticuerpo mAb 50 y mAb 51 a NgR humano y de rata.

Figura 2: Competición de unión a AP-Nogo66 con NgR-Fc por mAb 50 y mAb 51.

Figura 3: Competición de unión de Nogo66 a NgR humano y de rata expresado en células HEK293f por mAb 50 y mAb 51.

Figura 4: Unión de mAb 50 y mAb 51 a células Ntera 2.

Figura 5: Cuantificación del crecimiento de neuritas de agregados de células Ntera2.

Figura 6: Mutantes de eliminación del hNgR.

Figura 7: Competición de la unión de MAG-Fc a NgR-Fc.

Figura 8: Neuronas ganglionares de la raíz dorsal de rata en condiciones permisivas e inhibitoras y neutralización de inhibición del crecimiento de neuritas inducida por Nogo66 por el mAb 50.

Figura 9: Neutralización de la inhibición del crecimiento de neuritas inducida por Nogo66 por mAb 50 y mAb 51 en células DRG de rata.

Listado de secuencias

SEQ ID NO. 1: Proteína NgR Humana

SEQ ID NO. 8: Nucleótido NgR Humano

SEQ ID NO. 2: Proteína NgR de Rata

SEQ ID NO. 9: Nucleótido NgR de rata

SEQ ID NO. 3: Clon de anticuerpo 50 VH

SEQ ID NO. 4: Clon de anticuerpo 50 VL

SEQ ID NO. 5: Clon de anticuerpo 51 VH

SEQ ID NO. 6: Clon de anticuerpo 51 VL

SEQ ID NO. 7: Proteína AP-Nogo-66

SEQ ID NO. 10: Nucleótido AP-Nogo-66

Descripción detallada

La presente divulgación se refiere a proteínas de unión aisladas que interactúan con el receptor de Nogo (NgR), en particular anticuerpos monoclonales neutralizantes que se unen y neutralizan el NgR humano y de rata. Estos anticuerpos tienen la capacidad de competir con el Nogo-66 por la unión con NgR. Otros aspectos de la presente divulgación incluyen métodos para producirlos, composiciones farmacéuticas que utilizan los mismos, y métodos para utilizar dichas proteínas de unión.

Específicamente, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal neutralizante aislado, o fragmentos de unión al antígeno del mismo, que interactúa específicamente con al menos un epítipo de un receptor de Nogo-66, donde el anticuerpo monoclonal neutralizante aislado, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende una secuencia que comprende una región variable de cadena pesada (región VH) que comprende SEQ ID NO: 3 y una secuencia que comprende una región variable de cadena ligera (región VL) que comprende SEQ ID NO: 4; o una secuencia que comprende una región variable de cadena pesada (región VH) que comprende SEQ ID NO: 5 y una secuencia que comprende una región variable de cadena ligera (región VL) que comprende SEQ ID NO: 6. La presente invención proporciona además un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al menos a un epítipo de un receptor de Nogo-66, donde dicho anticuerpo monoclonal es el anticuerpo monoclonal secretado por una línea celular de hibridoma, N° de la ATCC PTA-8383, o N° de la ATCC PTA-8384. La presente invención proporciona además una composición que comprende el anticuerpo mencionado anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Anticuerpos

La realización principal de la presente divulgación comprende proteínas o polipéptidos aislados que se unen específicamente a un epítipo del receptor de Nogo-66 (NgR). La expresión "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o polipéptido que gracias a su origen o fuente de derivación no están asociados con los componentes asociados naturalmente que les acompañan en su estado nativo; está sustancialmente libre de otras proteínas de la misma especie; se expresa por una célula de diferente especie; o no se encuentra en la naturaleza.

Por lo tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina naturalmente, estará "aislada" de sus componentes asociados naturalmente. También se puede hacer que una proteína esté sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente por aislamiento, utilizando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica. El término "polipéptido" como se utiliza

5 en el presente documento, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" o "proteína" se utilizan de manera intercambiable con el término polipéptido y también se refiere a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" engloba proteínas artificiales o nativas, fragmentos de proteína y análogos polipeptídicos de una secuencia proteica. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

10 Las proteínas o polipéptidos aislados que se unen específicamente al menos a un epítipo de un receptor de Nogo-66 (NgR) son capaces de inhibir la unión de un ligando a dicho NgR. El receptor de Nogo-66, NgR, es una proteína de 473 aminoácidos unida a glucosilfosfatidilinositol. Consiste en una secuencia de señal en el extremo N, seguido por 8 dominios con repeticiones ricas en leucina, un dominio en el extremo C con repeticiones ricas en leucina (que forman juntos el denominado ectodominio) y el dominio de anclaje a GPI. Por medio del ancla a GPI, se une el NgR

15 al plasmalema neuronal externo. Las proteínas preferidas de la presente divulgación son anticuerpos monoclonales neutralizantes o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen al menos a un epítipo del NgR humano. El Nogo-66 es uno de los distintos factores inhibidores principales de la mielina del SNC que induce la inhibición del crecimiento del axón y promueve el colapso del crecimiento del cono.

20 El término "anticuerpo" como se utiliza en el presente documento, tiene la intención de referirse a moléculas de inmunoglobulina compuestas por cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Se dice que un anticuerpo es "capaz de unirse" a una molécula si es capaz de reaccionar con la molécula para unir de esta manera la molécula al anticuerpo. El término "epítipo" significa que se refiere a la parte de cualquier molécula que se puede unir a un anticuerpo, que también puede ser reconocida por el

25 anticuerpo. Los epitopos o "determinantes antigénicos" consisten habitualmente en agrupamientos químicamente activos en la superficie de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

30 La expresión "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "fragmento antigénico"), como se utiliza en el presente documento, se refiere a una o más partes de un anticuerpo que mantienen la capacidad para unirse específicamente al receptor y lo activa o modula, respectivamente. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede llevarse a cabo por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión que se incluyen en la expresión "parte de unión al 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), que consiste en un dominio VH; y (vi) una CDR aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se codifican por genes distintos, se pueden unir utilizando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que los capacita

40 para producirse como una única cadena proteica en las que el par de regiones VL y VH forman moléculas monovalentes conocidas como anticuerpos Fv de cadena sencilla (scFv). (Véase por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proceedings of the National Academy of Science USA 85:5879-5883). Se tiene la intención de que dichos anticuerpos scFv también se engloben en la expresión parte de unión al antígeno de un anticuerpo. También se incluyen en el término otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tal como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos, bivalentes en los que se expresan los dominios VH y VL en una cadena polipeptídica sencilla, porque utilizan un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, forzando de esta manera a que los dominios se emparejen con dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión al antígeno sobre el mismo receptor o a través de dos moléculas de receptor. (Véase, por ejemplo, Holliger et al. (1993) Proceedings of the

50 National Academy of Science USA 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2:1121-1123).

Un "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en el presente documento tiene la intención de referirse a una preparación de moléculas de anticuerpo, que comparten una secuencia de aminoácidos de cadena pesada común y de cadena ligera común, al contrario que las preparaciones de anticuerpo "policlonal" que contienen una mezcla de diferentes anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales se pueden generar por varias nuevas tecnologías tal como presentación en fagos, bacterias, levaduras o ribosomas, así como los métodos clásicos ejemplificados por anticuerpos derivados de hibridoma (por ejemplo, un anticuerpo secretado por un hibridoma preparado por tecnología de hibridoma, tal como la metodología convencional de Kohler y Milstein ((1975) Nature 256:495-497). Los anticuerpos de la presente invención se generaron por la técnica de hibridoma/inmunización convencionales en ratones utilizando la proteína NgR generada en una línea celular de mamífero.

Un "anticuerpo monoclonal neutralizante" como se utiliza en el presente documento tiene la intención de referirse a una preparación de moléculas de anticuerpo que al unirse con el antígeno específico son capaces de competir e inhibir la unión del ligando natural de dicho antígeno. En el caso específico de la presente solicitud, los anticuerpos neutralizantes de la presente invención son capaces de competir con Nogo66 por la unión al NgR, y evitar la actividad biológica o función de Nogo66 que resultaría de la unión de Nogo66 a NgR.

- Preferentemente, el anticuerpo monoclonal neutralizante de la presente divulgación es un anticuerpo humano. La expresión "anticuerpo humano" se refiere a anticuerpo que tienen regiones variables y constantes que se corresponden con, o se derivan de, secuencias de la línea germinal de inmunoglobulinas humanas (por ejemplo, véase Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242, 1991). Los anticuerpos humanos de la presente divulgación, sin embargo, pueden incluir restos de aminoácido no codificados por secuencias de la línea germinal de inmunoglobulina humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatorias o específicas del sitio in vitro o por mutación somática in vivo), por ejemplo, en las CDR y, en particular, la CD3. Como se utiliza en el presente documento "CDR" se refiere a la región determinante de complementariedad en las secuencias variables de anticuerpo. Hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera, que se designan CDR1, CDR2, y CDR3, para cada una de las regiones variables. En distintas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal. Se hace referencia a los anticuerpos neutralizantes de la presente invención en el presente documento como mAb 50 y mAb 51 (N° de la ATCC PTA-8383 y PTA-8384, respectivamente). Los anticuerpos mAb 50 y mAb 51 y los fragmentos de anticuerpo funcionales, anticuerpos relacionados con mAb 50 y mAb 51 y fragmentos de anticuerpo funcionales y otros anticuerpo y fragmentos de anticuerpo funcionales con propiedades equivalentes a mAb 50 y mAb 51, tal como la alta afinidad de unión a NgR con cinética de disociación baja y alta capacidad neutralizante, se pretenden que sean parte de la presente invención.
- La afinidad de unión y la tasa de disociación de un anticuerpo anti-NgR de la presente divulgación para un polipéptido NgR inmunogénico o un fragmento del mismo, se puede determinar por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la afinidad de unión se puede medir por tecnología de ELISA de competición, RIA, BIAcore o KinExA. La tasa de disociación también se puede medir por tecnología BIAcore y KinExA. La afinidad de unión y la tasa de disociación se miden por resonancia de plasmones superficiales utilizando, por ejemplo, un BIAcore.
- Uno de los anticuerpos preferidos de la presente invención comprende una secuencia que comprende una región variable de cadena pesada (región VH) que comprende la SEQ ID NO: 3 y una región variable de cadena ligera (región VL) que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4, el anticuerpo mAb 50. Otra realización comprende una secuencia que comprende una región variable de cadena pesada (región VH) que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena ligera (región VL) que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6, el anticuerpo mAb 51.
- Preferentemente, los anticuerpos mAb 50 y mAb 51 se unen al NgR humano con una CE_{50} de menos de 1×10^{-9} M, más preferentemente los anticuerpos se unen al NgR con una CE_{50} de 1×10^{-10} , y más preferentemente los anticuerpos se unen a NgR con una CE_{50} por debajo de 4×10^{-11} M.
- Se tiene la intención de que los anticuerpos anti-NgR mAb 50 y mAb 51 se unan al NgR humano en distintas formas, incluyendo pro-NgR, NgR maduro y NgR truncado. Los anticuerpos mAb 50 y mAb 51 no se unen específicamente a otros homólogos de NgR, como NgR 2 o NgR 3, u otras proteínas que contengan LRR. Sin embargo, los anticuerpos mAb 50 y mAb 51 presentan reactividad cruzada con NgR de otras especies, en particular roedores y más específicamente con NgR de rata. Adicionalmente mAb 52 hasta 62 tienen reactividad cruzada con el NgR de ratón. Por ejemplo, los anticuerpos se unen a NgR de rata (la CI_{50} de ambos anticuerpos para el NgR de rata es aproximadamente de 3×10^{-11} M).
- También se tiene la intención de que las proteínas de unión aisladas que interactúan con (NgR) de la presente divulgación puede ser una proteína de unión glucosilada donde el anticuerpo o la parte de unión al antígeno del mismo comprenden uno o más restos de carbohidrato. La producción emergente de proteínas in vivo puede sufrir un procesamiento adicional, conocido como modificación post-traducciona. En particular, se pueden añadir enzimáticamente restos de azúcares (glucosilo), un proceso conocido como glucosilación. Las proteínas resultantes que albergan cadenas laterales de oligosacáridos unidas covalentemente se conocen como proteínas glucosiladas o glucoproteínas. La glucosilación de las proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como la célula huésped en la que se expresa la proteína. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glucosilación (por ejemplo, glucosiltransferasas y glucosidasas), y tienen diferentes sustratos (azúcares nucleótidos) disponibles. Debido a dichos factores, el patrón de glucosilación de proteínas, y la composición de los restos glucosilo, pueden ser diferentes dependiendo del sistema huésped en el que se expresa la proteína particular. Los restos glucosilo útiles en la invención pueden incluir, pero no se limitan a, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. Preferentemente la proteína de unión glucosilada comprende restos glucosilo de manera que el patrón de glucosilación es humano.
- Los anticuerpos de la presente divulgación comprenden una región constante de cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Además, el anticuerpo puede comprender una región constante de cadena ligera, sea una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda. Preferentemente, el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera kappa. De manera alternativa, la parte de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena sencilla. Las sustituciones de estos de aminoácidos en la parte Fc para alterar la función efectora del anticuerpo se conocen en la técnica (Winter, et al., Pat. de EE. UU. N° 5.648.260; 5.624.821). La parte Fc de un anticuerpo

interviene en varias funciones efectoras importantes, por ejemplo, la inducción de citocinas, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y una tasa de semivida/aclaramiento del anticuerpo y complejos de antígeno-anticuerpo. En algunos casos estas funciones efectoras son deseables para los anticuerpos terapéuticos, pero en otros casos pueden ser innecesarios o incluso perjudiciales, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos de IgG humanas, particularmente la IgG1 e IgG3, intervienen en la ADCC y CDC por medio de la unión de Fc γ Rs y el complemento C1q, respectivamente. Los receptores Fc neonatales (FcRn) son componentes críticos que determinan la semivida circulante de los anticuerpos. En otra realización más, al menos se sustituye un resto de aminoácido en la región constante del anticuerpo, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo, en el que las funciones efectoras del anticuerpo se alteran.

Generación de proteínas recombinantes

Para la inmunización y para los ensayos ELISA, así como para los ensayos de crecimiento de neuritas (descrito en la sección "Ejemplos"), se produjeron NgR solubles recombinantes de seres humanos y ratas. También, se generó el ligando Nogo66, fusionado a un marcador de fosfatasa alcalina (AP-Nogo66) y servía como factor inhibidor para los ensayos de crecimiento de neuritas así como de ligando en los estudios ELISA y FACS (también descritos en la sección "Ejemplos").

NgR humano y de rata

La proteína NgR humana se basaba en el número de acceso AAG53612. El ADN de la proteína (para los aminoácidos 27 a 450) se clonó en un vector pSec (Ambion), y se generó la proteína por expresión estable en células CHO-K1. El receptor expresado consistía en 424 aminoácidos de la proteína completa (los aminoácidos 27 a 450), acoplados a un Myc y un marcador 6x His en el extremo C de acuerdo con SEQ ID NO. 1: proteína NgR humana y SEQ ID NO. 8: nucleótido NgR humano. Las células Human secNgR 27-450 aa_D6_CHO-K1 se cultivaron en ocho fábricas celulares de 40 cámaras con 5000 ml de medio libre de suero UltraCHO (Cambrex Bio Science) por fábrica de células hasta la confluencia (5 días). Luego de los 40 sobrenadantes se centrifugó 1 y se concentró hasta 40 ml con columnas Hemoflow F (Fresenius Medical Care). El concentrado se congeló a -80 °C. Para la purificación proteica el concentrado proteico del sobrenadante se llevó a 1000 ml con 500 ml 20 mM de NaH₂PO₄; 140 mM de NaCl; pH 7,4 y se concentró de nuevo a 300 ml. El proceso de concentración se repitió de nuevo y finalmente se añadieron al concentrado 300 ml de 20 mM de NaH₂PO₄; 150 mM de NaCl, pH 7,4 y se concentró de nuevo a 300 ml. Se añadieron 50 ml de Ni-NTA-Superflow Fa. (Qiagen, n° de catálogo 30430), se equilibró con 20 mM de NaH₂PO₄; 300 mM de NaCl; pH 8,0 a los 600 ml de concentrado, se agitó durante 1 h a 6 °C, se desechó el sobrenadante y las perlas Ni-NTA se cargaron en una columna. La columna se lavó a temperatura ambiente con 10 VC de 20 mM de NaH₂PO₄; 300 mM de NaCl, pH 8,0 seguido por 5-10 VC con 20 mM de NaH₂PO₄; 300 mM de NaCl; 10 mM de imidazol; pH 8,0. La columna se eluyó con 20 mM de NaH₂PO₄; 300 mM de NaCl; 100 mM de Imidazol; pH 8,0 y recolectó el pico activo a UV-280 nm. El eluido se dializó posteriormente durante una noche a 6 °C contra 5 l de Tris/HCl 50 mM; 1 M de NaCl; pH 7,0, y el dializado se cargó a temperatura ambiente en una columna Q-Sepharose (tamaño de la columna 1,6 cm x 3 c; volumen 6 ml; Amersham Biosciences n° de catálogo 17-0510-01). El tampón A era 50 mM de Tris/HCl; pH 7,0. El tampón B era 50 mM de Tris/HCl; 1 M de NaCl; pH 7,0 con un caudal de 2 ml/min. El gradiente era del 0 % B mantenido a 5 VC; 1-50 % B en 12 CV; 50-100 % B en 2 CV; mantenido al 100 % B 5 CV. El tamaño de fracción era 2,5 ml. Posteriormente, las fracciones se analizaron en SDS-PAGE, las fracciones se agruparon según su tamaño en SDS-PAGE y la pureza (la pureza más alta de NgR-His para el NgT-His altamente glucosilado; con la pureza más alta de NgR-His para el NgR-His menos glucosilado). Las fracciones agrupadas se dializaron una vez más contra 20 mM de NaH₂PO₄; 140 mM de NaCl; pH 7,4 en un tubo de diálisis de 12-14 kDa a 6 °C, la fracción se filtró a través de un filtro estéril de 0,2 μ m y se almacenó a 6 °C para su uso posterior. Para el almacenaje a largo plazo las fracciones de receptor se hicieron alícuotas y se almacenaron a -80 °C.

El ADN de NgR de rata (número de acceso AAM46772) se clonó en el pcADN3.1 (Invitrogen), y se expresó y produjo en un sistema de expresión transitoria en células HEK293F. La proteína que contenía los aminoácidos 27 a 450 acoplada al marcador 6x His de acuerdo con SEQ ID NO. 2: proteína NgR de rata y SEQ ID NO. 9: nucleótido NgR de rata. La producción de la proteína de rata era por medio de expresión transitoria convencional durante 48-72 horas en células HEK293f. El sobrenadante celular se recolectó y se purificó la proteína siguiendo etapas similares a las descritas anteriormente para la proteína humana. En algunos experimentos se utilizaron proteínas de R&D Systems. Estas incluían la quimera NgR/Fc recombinante humana, Número de Cat. 1208-NG y quimera receptor de Nogo recombinante de ratón/Fc, Número de Cat. 1440-NG.

Expresión de NgR en la superficie celular

Para los NgR que se expresan en la superficie celular, se clonó la secuencia del receptor de longitud completa (AAM46772 de rata y AAG53612 humana, respectivamente) que comprendía la fase de lectura abierta a partir de los aminoácidos 1 hasta 473 en un pcDNA4. Los plásmidos se transfectaron en células CHO-K1 o HEK293 con procedimientos convencionales. En resumen, las células se sembraron en placas de Petri en medio MEM, se transfectaron con Fugene 6 (Roche) según el fabricante. Se llevó a cabo la selección con 150 μ g/ml de Zeozin durante 2-3 semanas y se verificó la expresión proteica por FACS (véase el Ejemplo 4, posteriormente). Para la

expresión transitoria en células HEK293F, se transfectaron las células en suspensión según el fabricante (Invitrogen; sistema Free-Style), se recolectaron tras 48 o 72 horas y se utilizaron para los estudios FACS (véase la sección de Ejemplos).

5 Producción de AP-Nogo66

Se produjo AP-Nogo66 (SEQ ID NO. 7 y SEQ ID NO. 10) en condiciones convencionales. En resumen, se clonó el Nogo66 en el vector pAPTag5, se transfectaron las células HEK293 con la construcción y se seleccionaron con PRMI Glutamax + un 10 % de FCS, 150 µg/ml Zeocin. Para la producción de la proteína las células HEK293 se cultivaron en seis fábricas de 10 cámaras con 1200 ml de RPMI (Invitrogen) más un 10 % de FCS por fábrica celular hasta la confluencia (3 días). Luego se desechó el sobrenadante y se cargaron 1200 ml de Pro293a-CDM (Cambrex Bio Science) en cada fábrica de células. Las células se cultivaron durante 3 días más. A continuación se centrifugaron los 7200 ml de sobrenadante y se concentró hasta 350 ml con columnas Hemoflow F (Fresenius Medical Care). Tras la adición de 1 mM de PefablocSC (ROCHE) se prepararon alícuotas del concentrado y se congeló a -80 °C.

15 Producción de anticuerpos y líneas celulares generadoras de anticuerpos

Los anticuerpos de la divulgación se pueden generar por inmunización de un huésped adecuado (por ejemplo, vertebrados, que incluyen seres humanos, ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, ganado vacuno, caballos, reptiles, peces, anfibios, y huevos de ave, reptil y peces). Dichos anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Para generar los anticuerpos de la presente divulgación, se inmuniza el huésped con un polipéptido NgR inmunogénico o un fragmento del mismo de la invención. El término "inmunización" se refiere en el presente documento al proceso de presentación de un antígeno a un repertorio inmunitario siempre que ese repertorio exista en un organismo natural sin alterar genéticamente, o un organismo transgénico, que incluye los modificados para presentar un repertorio inmunitario humano artificial. De manera similar, una "preparación inmunogénica" es una formulación de antígeno que contiene adyuvantes y otros aditivos que aumentarían la inmunogenicidad del antígeno.

La inmunización de animales se puede hacer por cualquier método conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Los métodos para inmunizar animales no humanos tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, ganado vacuno, y caballos se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane y Pat. de EE. UU. N° 5. 994.619. En una realización preferida, el antígeno NgR se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmunitaria. Dichos adyuvantes incluyen el adyuvante completo o incompleto de Freund, RIBI (muramil dipéptidos) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Dichos adyuvantes pueden proteger al polipéptido de la dispersión rápida por secuestro en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulen al huésped para que secrete factores que son quimioestáticos para los macrófagos y otros componentes del sistema inmunitario. Preferentemente, si se va a administrar un polipéptido, el programa de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, separados varias semanas.

Se contempla que el huésped animal se inmunice con NgR asociado con la membrana celular de una célula intacta o destruida y los anticuerpos de la presente solicitud se identifican uniéndolos con un polipéptido NgR de la invención.

Tras la inmunización del huésped animal con el antígeno NgR, los anticuerpos y las células productoras de anticuerpos se pueden obtener del animal. Se obtiene un suero que contiene el anticuerpo anti-NgR del animal por extracción de sangre o por sacrificio del animal. El suero se puede utilizar tal como se obtiene del animal, se puede obtener la fracción de inmunoglobulina del suero, o los anticuerpos anti-NgR se pueden purificar del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidas de esta manera son policlonales, por lo tanto tienen una matriz heterogénea de propiedades.

50 Líneas celulares productoras de anticuerpos

La presente divulgación también describe hibridomas inmortalizados productores de anticuerpos que se pueden preparar a partir del animal inmunizado. Preferentemente, el animal inmunizado es un animal no humano que expresa genes de inmunoglobulina humana y las células B esplénicas se fusionan con un mieloma derivado de la misma especie que el animal no humano.

Tras la inmunización, al animal se sacrifica y las células B esplénicas se fusionan con células de mieloma inmortalizadas como se conoce bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*. Preferentemente, las células de mieloma no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Tras la fusión y la selección con antibióticos, se exploran los hibridomas utilizando NgR, o una porción del mismo o una célula que exprese NgR. Preferentemente, la exploración inicial se lleva a cabo utilizando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), preferentemente un ELISA (se proporciona un ejemplo de exploración por ELISA en la sección de Ejemplos).

Los hibridomas productores de anticuerpos anti-NgR se seleccionan, se clonan y se exploran adicionalmente por características deseables, incluyendo el crecimiento robusto del hibridoma, alta producción de anticuerpos y características deseables de los anticuerpos, como se trata posteriormente. Los hibridomas se pueden cultivar y expandir in vivo en animales singénicos, en animales que carecen de sistema inmunitario, por ejemplo, ratones desnudos, o en un cultivo celular in vitro. Los métodos de selección, clonación y expansión de hibridomas se conocen bien por los expertos en la técnica. En una realización preferida, los hibridomas son hibridomas de ratón, como se ha descrito anteriormente. En otra realización preferida, los hibridomas se producen en una especie no humana, no ratón tal como ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado bovino o caballos. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos, en los que se fusiona un mieloma no secretor humano con una célula humana que expresa un anticuerpo anti-NgR.

La presente divulgación también describe anticuerpos recombinantes que se generan a partir de linfocitos únicos aislados utilizando un proceso al que se hace referencia en la técnica como el método de anticuerpos linfocítico seleccionado (SLAM), como se describe en Pat. de EE. UU. Nº 5.627.052, Publicación PCT WO 92/02551 y Babcock, J. S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843- 7848. En este método, las células únicas que secretan anticuerpos de interés, por ejemplo, linfocitos derivado de cualquier animal inmunizado, se exploran utilizando un ensayo de placa hemolítico específico de un antígeno, en el que el antígeno NgR, o un fragmento del mismo, se acopla con glóbulos rojos de oveja utilizando un enlazador, tal como biotina, y que se utiliza para identificar las células únicas que secretan anticuerpo con especificidad para el NgR. Después de la identificación de las células que secretan anticuerpo de interés, se rescatan los ADNc de región variable de cadenas pesada y ligera por PCR de transcripción inversa, y estas regiones variables se pueden expresar luego, en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (por ejemplo, regiones constantes humanas), en células huésped de mamífero, tal como células COS o CHO. Las células huésped transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, derivadas de linfocitos seleccionados in vivo, se pueden someter entonces a análisis adicionales y a selección in vitro, por ejemplo, por selección de células transfectadas para aislar las células que expresan anticuerpos contra NgR.

Anticuerpos generados *in vitro*

También se pueden utilizar métodos in vitro para producir los anticuerpos descritos en la presente divulgación, en los que se explora una biblioteca de anticuerpos para identificar un anticuerpo que tienen la especificidad de unión deseada. Los métodos para dicha exploración de bibliotecas de anticuerpos recombinantes se conocen bien en la técnica.

La biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto inmunizado con NgR, o una parte de NgR. De manera alternativa, la biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto intacto, es decir, que no ha sido inmunizado con NgR, tal como una biblioteca de anticuerpos humanos de un sujeto humano que no se ha inmunizado con NgR humano. Los anticuerpos de la presente solicitud se seleccionan explorando la biblioteca de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende el NgR humano (por ejemplo, un péptido que se corresponde con una parte del hNgR) para seleccionar de esta manera los anticuerpos que reconocen al NgR. Los métodos para llevar a cabo dicha exploración y selección se conocen bien en la técnica, tal como los que se describen en las referencias del párrafo anterior. Para seleccionar anticuerpos de la presente divulgación que tengan afinidades de unión particulares para hNgR, tal como las que se disocian del NgR humano con una tasa de la constante k_{off} particular, se puede utilizar la resonancia de plasmones superficiales que se conoce en la técnica para seleccionar anticuerpos que tengan la tasa de constante k_{off} deseada. Para seleccionar los anticuerpos de la presente divulgación que tengan una actividad neutralizante particular para hNgR, tal como los que tengan una CI50 particular, se pueden utilizar métodos convencionales conocidos en la técnica para evaluar la inhibición de la actividad de hNgR.

50 Características de los anticuerpos

El mAb 50 y mAb 51 de la presente invención, o la parte de unión al antígeno de los mismos, se unen a NgR humano, y se disocia del NgR humano con una tasa de la constante k_{off} de aproximadamente $0,1 \text{ s}^{-1}$ o menos, preferentemente $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ o menos, más preferentemente $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, incluso más preferentemente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos, más preferentemente $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menos según se determina por resonancia de plasmones superficiales. La expresión "resonancia de plasmones superficiales", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real por detección de alteraciones en las concentraciones proteicas en una matriz de biosensor, por ejemplo utilizando un sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, véase Jönsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jönsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; y Johnsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277.

Tabla 1. Parámetros individuales de la tasa cinética de Biacore

(Antígeno: quimera hNgR-Fc)				
Anticuerpo capturado	Isotipo	Tasa On (M-1 s-1)	Tasa Off (s-1)	Kd (M)
mAb 50	IgG2a,k	$3,51 \times 10^5$	$4,97 \times 10^{-5}$	$1,41 \times 10^{-10}$
mAb 51	IgG2a,k	$5,44 \times 10^5$	$5,88 \times 10^{-5}$	$1,08 \times 10^{-10}$

El término “K_{on}”, como se utiliza en el presente documento, se pretende que hace referencia a la tasa de constante on para la asociación de un anticuerpo al antígeno para formar el complejo anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica.

El término “K_{off}” como se utiliza en el presente documento, se pretende que hace referencia a la tasa de la constante off para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica. El término “K_d”, como se utiliza en el presente documento, se pretende que hace referencia a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular como se conoce en la técnica.

De manera alternativa, el anticuerpo mAb 50 y mAb 51 de la presente invención, o la parte de unión al antígeno de los mismos, puede inhibir la actividad del NgR humano con una CI50 de aproximadamente 1×10^{-6} M o menos, preferentemente 1×10^{-7} M o menos, preferentemente 1×10^{-8} M o menos, más preferentemente 1×10^{-9} M o menos, más preferentemente 1×10^{-10} M o menos, y más preferentemente 1×10^{-11} M o menos. El término CI50 como se utiliza en el presente documento, se pretende que haga referencia a la concentración de un anticuerpo que compite por la unión del ligando Nogo66 con NgR.

Anticuerpos de fusión e inmunoadhesinas

La presente divulgación también describe un anticuerpo de fusión o inmunoadhesina que se puede producir que comprenden todo o una parte de un anticuerpo anti-receptor 1 de Nogo de la presente divulgación unido a otro polipéptido. En algunas realizaciones, solo la región variable del anticuerpo anti-receptor 1 de Nogo se une al polipéptido. En otras realizaciones, el dominio VH de un anticuerpo anti-receptor 1 de Nogo de la presente solicitud se une a un primer polipéptido, mientras que el dominio VL del anticuerpo se une a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de manera que permite que los dominios VH y VL interactúen entre ellos para formar un sitio de unión al antígeno del anticuerpo. En otras realizaciones, el dominio VH está separado del dominio VL por un enlazador que permite a los dominios VH y VL interactuar entre ellos (véase posteriormente en Anticuerpos de cadena sencilla). El anticuerpo VH-enlazador-VL se une entonces a un polipéptido de interés. El anticuerpo de fusión es útil para dirigir un polipéptido a una célula o tejido que expresa el ligando del receptor-1 de Nogo. El polipéptido de interés puede ser un agente terapéutico tal como una toxina, o puede ser un agente diagnóstico, tal como una enzima; que pueden visualizarse fácilmente, tal como una peroxidasa de rábano rústicano. Además, pueden crearse anticuerpos de fusión en los que dos (o más) anticuerpos de cadena sencilla se unen entre ellos. Esto es útil si se quiere crear un anticuerpo divalente o polivalente en una cadena sencilla de polipéptido, o si se quiere crear un anticuerpo biespecífico.

Una realización proporciona una proteína de unión marcada en la que un anticuerpo o una parte del anticuerpo de la presente divulgación se derivan o une a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de unión marcada de la presente invención se puede derivar por la unión funcional de un anticuerpo o una parte de anticuerpo de la presente divulgación (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente u otra) a una o más entidades moleculares, tales como un ácido nucleico, otro anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede intervenir en la asociación del anticuerpo o parte de anticuerpo con otra moléculas (tal como una región central de estreptavidina o un marcador de polihistidina).

Los agentes detectables útiles con los que se puede derivar un anticuerpo o parte de anticuerpo de la presente divulgación incluyen compuestos fluorescentes. Agentes fluorescentes detectables ejemplares incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficocitrina, y similares. Un anticuerpo se puede derivar también de enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano rústicano, glucosa oxidasa y similares. Cuando se deriva un anticuerpo con una enzima detectable, se detecta añadiendo reactivos adicionales que utiliza la enzima para producir un producto de la reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente la peroxidasa de rábano rústicano, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina da lugar a un producto de la reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo se puede derivar también con un ácido nucleico, biotina y se detecta por medio de la medición indirecta de la unión con avidina o estreptavidina.

Otra realización de la presente divulgación proporciona una proteína de unión cristalizada. El término “cristalizada” como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo, o la parte de unión al antígeno del mismo, que

5 existe en forma de un cristal. Los cristales son una forma del estado sólido de la materia, que es distinta de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales están compuestos por matrices regulares, repetidas, tridimensionales de átomos, iones, moléculas (por ejemplo, proteínas tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (por ejemplo complejos antígeno/anticuerpo). Estas matrices tridimensionales están
 10 dispuestas de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que se entienden bien en el campo. La unidad fundamental, o bloque de construcción, que se repite en un cristal se denomina unidad asimétrica. La repetición de unidades fundamentales en una disposición que conforma una simetría cristalográfica determinada bien definida proporciona la "célula unitaria" del cristal. La repetición de la célula unitaria por traducciones regulares en las tres dimensiones proporciona el cristal. Véase Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2ª ed., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999).

15 Preferentemente, la presente divulgación describe cristales de anticuerpos anti-NgR completos y fragmentos de los mismos como se desvela en el presente documento, y formulaciones y composiciones que comprenden dichos cristales. En una realización la proteína de unión cristalizada tiene una mayor semivida in vivo que la equivalente soluble de la proteína de unión. En otra realización la proteína de unión mantiene la actividad biológica tras la cristalización.

La proteína de unión cristalizada de la divulgación se puede producir según los métodos conocidos en la técnica.

20 Anticuerpos de cadena sencilla

La presente divulgación incluye un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) que se une a un NgR inmunogénico de la invención. Para producir el scFv, el ADN que codifica VH y VL se une operativamente al ADN que codifica un
 25 enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácido (GLY4-Ser), de manera que las secuencias de VH y VL se pueden expresar como contiguos en una proteína de cadena sencilla, que tienen las regiones VL y VH unidas por un enlazador 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) 348: 552-554). El anticuerpo de cadena sencilla puede ser monovalente, si solamente se utiliza una VH y VL, bivalente si se utilizan dos VH y VL, o polivalente si se utilizan más de dos VH y VL.

30 Anticuerpos quiméricos

La presente divulgación incluye además un anticuerpo biespecífico o un fragmento de unión al antígeno del mismo en el que una especificidad es para un polipéptido del receptor 1 de Nogo inmunogénico de la presente divulgación.
 35 Por ejemplo, se puede generar un anticuerpo quimérico que se une específicamente a un polipéptido NgR inmunogénico de la divulgación por medio de un dominio de unión y a una segunda molécula por un segundo dominio de unión. La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de regiones variables de cadena pesada y ligera de una especie y secuencias de región constante de otra especie, tales como los anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murinas unidas a regiones
 40 constantes humanas. El anticuerpo quimérico se puede producir por medio de técnicas de biología molecular recombinante, o se pueden conjugar físicamente. 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 la disminución del colapso de crecimiento de conos mediado por mielina y la inhibición del crecimiento y brotes de neuritas. Dichos anticuerpos biespecíficos se pueden generar utilizando técnicas que se conocen bien, por ejemplo, Fanger et al. *Immunol Methods* 4: 72-81 (1994) y Wright y Harris, 20 (supra). En algunas realizaciones, los anticuerpos quiméricos se preparan utilizando una o más de las regiones variables de un anticuerpo de la divulgación. En otra realización, el anticuerpo quimérico se prepara utilizando una o más regiones
 45 CDR de dicho anticuerpo. La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadenas pesada y ligeras de una especie no humana (por ejemplo, un ratón) pero en el que al menos una parte de la secuencia de VH y/o VL se ha alterado 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 con injerto de CDR en el que las secuencias CDR humanas se introducen en secuencias VH y VL no humanas para sustituir las secuencias CDR no humanas correspondientes.

55 Anticuerpos humanizados

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que se unen a antígenos deseados que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de especies no humanas y regiones marco conservadas de una molécula de inmunoglobulina humana. Se conocen secuencias de Ig humanas
 60 en la técnica. Dichas secuencias importadas se pueden utilizar para reducir la inmunogenicidad, aumentar o modificar la unión, afinidad, tasa on, tasa off, especificidad, semivida, o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica.

Los restos de la región marco conservada en las regiones marco conservadas humanas se pueden sustituir con el resto correspondiente de la CDR del anticuerpo donante para alterar, preferentemente mejorar, la unión con el
 65 antígeno. Estas sustituciones de la región marco conservada se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, modelando las interacciones de los restos de CDR y región marco conservada para identificar

los restos de la región marco conservada importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar restos de la región marco conservadas inusuales en posiciones particulares (véase, por ejemplo, Queen et al., Pat. de EE. UU. N° 5.585.089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)). Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles comúnmente y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas de computadora que ilustran y presentan probables estructuras de conformación tridimensional de secuencias candidatas de inmunoglobulina seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel más probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que tienen influencia en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos FR se pueden seleccionar y combinar a partir de secuencias de consenso e importadas de manera que se consigue la característica deseada del anticuerpo, tal como el aumento de afinidad por el antígeno(s) diana. En general, los restos de CDR están implicados directamente y más sustancialmente en influenciar la unión al antígeno. Los anticuerpos se pueden humanizar utilizando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, tal como pero sin limitarse en las descritas en 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).

Anticuerpos derivados y marcados

Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la presente divulgación se pueden derivar o unir con otra molécula (por ejemplo, otro péptido o proteína). En general, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se deriva de manera que la unión a un polipéptido inmunogénico de la divulgación no está afectada adversamente por la derivación o marcado. Por ejemplo, un anticuerpo o parte de anticuerpo de la presente divulgación puede unirse funcionalmente (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación covalente u otra) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o diacuerpo), un reactivo de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que pueden intervenir en la asociación del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o un marcador de polihistidina). Aún más, un anticuerpo o parte de unión al antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión mayor, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o parte de anticuerpo con una o más de otras o diferentes proteínas o péptidos. Ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de estreptavidina para producir una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) y el uso de un resto de cisteína, un péptido marcador y un marcador polihistidina del extremo C para producir moléculas de scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov et al. (1994) Molecular Immunology 31:1047-1058). Las partes de anticuerpo, tal como Fab y F(ab')₂ respectivamente, se pueden preparar a partir de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, los anticuerpos, partes de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión se pueden obtener utilizando técnicas convencionales de ADN recombinante.

Un anticuerpo derivado se puede producir entrecruzando dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Los agentes de entrecruzamiento adecuados incluyen los que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos reactivos distintos separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Dichos enlazadores están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.

Un anticuerpo derivado puede ser también un anticuerpo marcado. Por ejemplo, los agentes de detección con los que se puede derivar un anticuerpo o parte de anticuerpo de la divulgación son compuestos fluorescentes, que incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, fósforos lantánidos y similares. Un anticuerpo también se puede marcar con enzimas que son útiles para la detección, tal como la peroxidasa de rábano rústico, galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. En realizaciones que se marcan con una enzima detectable, el anticuerpo se detecta añadiendo reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de la reacción detectable. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano rústico con peróxido de hidrógeno y diaminobencidina. Un anticuerpo se puede marcar también con biotina, y detectarse por medición indirecta de la unión con avidina o estreptavidina. Un anticuerpo también se puede marcar con un epítipo polipeptídico predeterminado reconocido como un indicador secundario (por ejemplo, un par de secuencias de leucina en cremallera, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión con metales, epítipo: marcadores). Un anticuerpo anti-receptor 1 de Nogo o un fragmento de antígeno del mismo también se pueden marcar con un aminoácido radiomarcado. El radiomarcador se puede utilizar tanto con fines diagnósticos como terapéuticos. El anticuerpo anti-receptor 1 de Nogo radiomarcado se puede utilizar de manera diagnóstica, por ejemplo, para determinar los niveles de receptor-1 de Nogo en un sujeto. Además, el anticuerpo anti-receptor-1 de Nogo radiomarcado se puede utilizar terapéuticamente para tratar la lesión de la médula espinal.

Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes radioisótopos o radionúclidos ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁷⁷Lu, ¹⁶⁶Ho, ¹⁵³Sm. Un anticuerpo anti-receptor-1 de Nogo o un fragmento de antígeno del mismo también se puede derivar con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo carbohidrato. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por

ejemplo, para aumentar la semivida o el aumento de unión tisular. También, un marcador para polipéptidos puede incluir un ácido nucleico, por ejemplo, ADN para detección por PCR, o aumento de la expresión genética, o ARNip para suprimir la expresión genética en células o tejidos que albergan NgR.

5 La clase y subclase de anticuerpos anti-receptor-1 de Nogo se puede determinar por cualquier método conocido en la técnica. En general, la clase y subclase de un anticuerpo se puede determinar utilizando anticuerpos que son específicos para una clase o subclase particular de anticuerpo. Dichos anticuerpos están disponibles en el mercado. La clase o subclase se puede determinar por ELISA, transferencia de Western, así como por otras técnicas. De manera alternativa, la clase y subclase se puede determinar secuenciando todas o una parte de los dominios
10 constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de varias clases y subclases de inmunoglobulinas, y determinando la clase y subclase de los anticuerpos.

Inhibición de actividad de NgR por anticuerpos anti-NgR

15 Los anticuerpos anti-receptor-1 de Nogo de la presente divulgación, o un fragmento de unión al antígeno, inhiben la unión de un ligando a NgR. La CI50 de dicha inhibición se puede medir por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por ELISA, RIA, o antagonismo funcional. La CI50 puede variar entre 0,01 y 100 nM. Preferentemente, la CI50 está entre 1 y 10 nM. Más preferentemente, la CI50 de los anticuerpos anti-receptor-1 de Nogo de la
20 presente invención, está entre 0,1 nM y 1 nM. Más preferentemente, la CI50 está por debajo de 0,1 nM.

Anticuerpos con dominio variable dual

25 Las proteínas de unión con dominio variable dual (DVD) como se utilizan en el presente documento, son proteínas que comprenden dos o más sitios de unión al antígeno y son proteínas de unión tetravalentes o multivalentes. La expresión "proteína de unión multivalente" se utiliza en la presente memoria descriptiva para denotar una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión al antígeno, y generalmente no es un anticuerpo de origen natural. La expresión "proteína de unión multiespecífica" se refiere a una proteína de unión capaz de unirse a dos o más dianas relacionadas o no relacionadas. Dichos DVD pueden ser monoespecíficos, es decir, capaces de unirse a un
30 antígeno, o multiespecíficos, es decir, capaces de unirse a dos o más antígenos. Las proteínas de unión DVD comprenden dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos DVD de 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 implicadas en la unión al antígeno por sitio de unión al antígeno. Las proteínas de unión DVD y los métodos para producir proteínas de unión DVD se desvelan en la Solicitud de Patente de EE. UU: N°
35 11/507.050 (presentada como documento US 7.612.181 B1). Se tiene la intención de que la presente divulgación comprenda la proteína de unión DVD que comprende proteínas de unión capaces de unirse a NgR. Preferentemente la proteína de unión DVD es capaz de unirse a NgR y una segunda diana. La segunda diana se selecciona de entre el grupo que consiste en la molécula de guía repulsiva (RGM), Nogo-A, MAG, OMgp, CSPG. Entre las CSPG se pueden escoger de entre agregcan, brevican, versican, neurocan, fosfacan o Te38. Por lo tanto, estos ejemplos
40 comprenden inhibidores derivados de mielina, así como co-receptores neuronales de NgR conocidos.

Anticuerpos específicos duales

45 La presente divulgación también describe tecnología de "anticuerpos específicos duales". Los anticuerpos específicos duales pueden funcionar como agonistas, antagonistas, o ambos en combinaciones diferentes. El término "agonista" como se utiliza en el presente documento, se refiere a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, produce un aumento en la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función que se observa en ausencia del agonista. El término "antagonista" o "inhibidor", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un modulador que, cuando
50 se pone en contacto con una molécula de interés produce una disminución en la magnitud de una cierta actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función que se observa en ausencia del antagonista. Los antagonistas particulares de interés incluyen los que bloquean o modulan la actividad biológica de Nogo-66. Los antagonistas e inhibidores de Nogo-66 pueden incluir, pero no se limitan a cualquiera de las moléculas, preferentemente anticuerpos monoclonales que interactúan con el receptor de Nogo-66 (NgR). Se debería señalar que la interacción con NgR puede dar como resultado la unión y neutralización del receptor u otros
55 ligandos/componentes de la membrana celular, y puede ser útil para al funcionamiento aditivo o sinérgico contra múltiples enfermedades.

60 La presente divulgación también describe anticuerpos NgR combinados con co-receptores NgR, como NgR y P75, NgR y TROY, NgR y LINGO-1. También comprende anticuerpos que tiene reacción cruzada entre NgR y su ligando y NgR y factores inhibidores derivados de mielina. Estos pueden comprender anticuerpos de reacción cruzada entre NgR y la molécula de guía repulsiva (RGM), NgR y Nogo-A, NgR y MAG, NgR y OMgp, NgR y CSPG. Entre las CSPG se pueden escoger de entre agregcan, brevican, versican, neurocan, fosfacan o Te38. Por lo tanto, estos ejemplos comprenden inhibidores derivados de mielina, así como co-receptores neuronales conocidos de NgR.

65

La presente divulgación también describe anticuerpos específicos duales entre NgR y receptores del factor de crecimiento que incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor estimulantes de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), neurotrofinas, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO), miostatina (GDF-8), factor 9 de diferenciación de crecimiento (GDF-09), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF o FGF2), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF).

Usos de los anticuerpos

Debido a su capacidad de unión al NgR humano, los anticuerpos neutralizantes de la presente divulgación, o partes de los mismos, se pueden utilizar para detectar el NgR humano (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero o plasma), utilizando un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica tisular. La presente divulgación proporciona un método para detectar un NgR humano en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo, o una parte de anticuerpo, de la invención y detectar o el anticuerpo (o parte del anticuerpo) unido al NgR humano o el anticuerpo no unido (o parte del anticuerpo), para detectar de esta manera el NgR humano en la muestra biológica. El anticuerpo está marcado directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano rústicano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriacilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y ejemplos de material radioactivo adecuado incluye ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , ^{153}Sm .

Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la presente divulgación son capaces preferentemente de neutralizar la actividad de NgR humano tanto in vitro como in vivo. En consecuencia, dichos anticuerpos y partes de anticuerpo de la divulgación se pueden utilizar para inhibir la unión de Nogo-66 a NgR o la actividad resultante.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un método para reducir la actividad de Nogo-66 o la actividad de NgR en un sujeto, ventajosamente de un sujeto que padece una enfermedad o trastorno en el que la actividad de NgR es perjudicial. La presente divulgación presenta un anticuerpo o partes de anticuerpo de la presente invención para su uso en métodos para reducir la actividad en un sujeto que padece de dicha enfermedad o trastorno, cuyo método comprende la administración al sujeto de un anticuerpo o partes de anticuerpo de la presente invención de manera que se reduce la actividad de NgR. Preferentemente, el NgR es humano y el sujeto es un sujeto humano. De manera alternativa, el sujeto puede ser un mamífero que expresa un NgR al que el anticuerpo de la invención es capaz de unirse. Aún más, el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido un NgR. Un anticuerpo de la presente invención es para su uso en terapia y se puede administrar a un sujeto humano. Además, un anticuerpo de la presente invención es para su uso en terapia veterinaria y se puede administrar a un mamífero no humano que expresa un NgR con el que el anticuerpo es capaz de unirse con fines veterinarios o como un modelo animal de una enfermedad humana. Con respecto al último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, ensayo de dosificaciones y cursos de administración).

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "un trastorno en el que la actividad de NgR es perjudicial" tiene la intención de incluir enfermedades y otros trastornos en los que la presencia de NgR o la actividad resultante en un sujeto que padece el trastorno ha demostrado que es o es sospechoso de ser el responsable de la patofisiología del trastorno o un factor que contribuye al empeoramiento del trastorno. En consecuencia, un trastorno en el que la actividad de NgR es perjudicial es un trastorno en el que se espera que la reducción de la actividad de NgR alivie los síntomas y/o progresión del trastorno. Ejemplos no limitantes de trastornos que se pueden tratar utilizando los anticuerpos de la invención incluyen los trastornos expuestos en la sección posterior que pertenece a las composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención.

Se reconoce que el NgR tiene un papel importante en la patología asociada con una variedad de enfermedades que implican enfermedades neurológicas asociadas con neurodegeneración o inhibición de los procesos neurorregenerativos, que dan lugar a parálisis. Esto incluye esclerosis lateral Amiotrófica, lesión del plexo braquial, lesión cerebral, incluyendo la lesión cerebral traumática, parálisis cerebral, ataxia de Friedrich, síndrome de Guillain-Barré, leucodistrofias, esclerosis múltiple, post polio, espina bífida, lesión de la médula espinal, atrofia muscular espinal, tumores de médula espinal, ictus, mielitis transversa. Además se reconoce que el NgR tiene un papel en la demencia, demencia senil, disfunción cognitiva leve, demencia relacionada con el Alzheimer, corea de Huntington, disquinesia tardía, hiperquinesias, manía, morbus Parkinson, síndrome de Steel-Richard, síndrome de Down, miastenia gravis.

El NgR y sus ligandos también pueden estar implicados en la generación o desarrollo de estados inflamatorios o autoinmunitarios que implican elementos inflamatorios conocidos (Teng y Tang, 2005; Fontoura y Steinmann, 2006). Estas enfermedades incluyen pero no se limitan a artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, Lyme artritis, artritis psoriásica, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico,

enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad intestinal inflamatoria, diabetes mellitus dependiente de insulina, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis esclerodérmica, enfermedad del injerto contra el huésped, rechazo de trasplante de órganos, enfermedad inmunitaria asociada con el trasplante de órganos aguda o crónica, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, Granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveítis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, síndrome séptico, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversal aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ictus, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, tumores malignos, fallo cardíaco, infarto de miocardio, enfermedad de Addison, esporádica, deficiencia poliglandular tipo I y deficiencia poliglandular tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de disfunción respiratoria del adulto (aguda), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriásica, artropatía cólica ulcerativa, sinovitis enteropática, artropatía asociada a clamidias, yersinias y salmonelas, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa /arterioesclerosis, alergia atópica, enfermedad autoinmunitaria bullosa, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad IgA lineal, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia hemolítica Coombs positiva, anemia adquirida perniciosa, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica /Royal Free Enfermedad, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmunitaria criptogénica, Síndrome de enfermedad de Inmunodeficiencia Adquirida, Enfermedades Relacionadas con la Inmunodeficiencia Adquirida, Hepatitis B, Hepatitis C, inmunodeficiencia variable común (hipogammaglobulinemia variable común), cardiomiopatía dilatada, infertilidad femenina, fallo ovárico, fallo ovárico prematuro, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrosante criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial post-inflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada a enfermedad del tejido conjuntivo, enfermedad pulmonar asociada a enfermedad mixta de tejido conjuntivo, enfermedad pulmonar intersticial asociada a esclerosis sistémica, artritis reumatoide asociada a enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad pulmonar asociada a lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar asociada a dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada a enfermedad de Sjogren, enfermedad pulmonar asociada a espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar vasculítica difusa, enfermedad pulmonar asociada a hemosisiderosis, enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármacos, fibrosis, fibrosis por radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar linfocítica infiltrativa, enfermedad pulmonar intersticial post-infecciosa, artritis por gota, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria tipo-1 (hepatitis autoinmunitaria clásica o lupoide), hepatitis autoinmunitaria tipo-2 (hepatitis de anticuerpos anti-LKM), hipoglucemia autoinmunitaria mediada, resistencia a insulina tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmunitaria aguda asociada con trasplante de órganos, enfermedad inmunitaria crónica asociada con trasplante de órganos, osteoartritis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis tipo 1, psoriasis tipo 2, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmunitaria, enfermedad renal NOS, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discoide, infertilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad espermática, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmía simpática, hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad del tejido conjuntivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, enfermedad/artritis de Takayasu, trombocitopenia autoinmunitaria, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, hipertiroidismo, hipotiroidismo gotoso autoinmunitario (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo autoinmunitario atrófico, mixedema primario, uveítis facogénica, vasculitis primaria, enfermedad hepática aguda con vitíligo, enfermedades hepáticas crónicas, cirrosis alcohólica Inducida por fármacos, lesión hepática inducida por alcohol, colestasis, enfermedad hepática idiosincrática, hepatitis, esteatohepatitis no alcohólica, alergia y asma, infección por estreptococos grupo B (GBS), trastornos mentales (por ejemplo, depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas Tipo T2 y Tipo T1, dolor agudo y crónico (diferentes formas de dolor), y cánceres tales como cáncer de pulmón, mama, estómago vejiga, colon, páncreas, ovárico, próstata y rectal y neoplasias malignas hematopoyéticas (leucemia y linfoma). Los anticuerpos humanos y partes de anticuerpo de la presente invención son para su uso en métodos para tratar seres humanos que padecen enfermedades autoinmunitarias, en particular las asociadas con inflamación, incluyendo la espondilitis reumatoide, alergia, diabetes autoinmunitaria, uveítis autoinmunitaria.

También se sabe que el NgR interactúa con otras proteínas que incluyen pero no se limitan a proteínas relevantes con la adhesión celular, migración celular, seguimiento celular, hallazgo de ruta de axón, y proteínas de la matriz extracelular. Una combinación terapéutica potencial comprendida en la presente divulgación puede incluir anticuerpos contra NgR y semaforinas (en particular Sema-1a, 1b; Sema-2a; Sema-3A, B, C, D, E, F; Sema 4A, D; Sema 5A; Sema 6D; Sema 7A, Sema VA), plexinas (Plexina-A1-4, Plexina-B1-3, Plexina-C1, Plexina D-1, Tim-2); neuropilinas (neuropilina-1 y neuropilina-2), cadherinas (E-cadherinas y N-cadherinas), netrinas (netrina-1), efrinas (EphA3, 4, 6, 7, 8; B2, B3), receptores Eph, ligandos Eph, Ig CAM, tenascina-C, CSPG, tenascina, Sema 3A, fibronectina, laminina-1, colágeno (por ejemplo, colágeno-IV), Robo, Abl, N-Cadherina, L1, NCAM.

Se ha descrito que el NgR también interactúa con fragmentos de proteína precursora de amiloide extracelular (A β). Por lo tanto, la presente divulgación comprende una combinación entre anticuerpos contra NgR y especies de A β (A β 1-40, A β 1-42, oligómeros de A β , multímeros de A β , globulómeros de A β). Este tipo de combinación puede ser interesante en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. La combinación puede traducirse en un efecto dual sobre el crecimiento/neuroprotección de neuritas y en el alivio de la carga de lacas y la actuación cognitiva en pacientes de EA. La pérdida axonal y dendrítica es un distintivo temprano de la enfermedad de Alzheimer y una

combinación para su uso en el tratamiento puede ser muy eficaz.

También, como se ha tratado anteriormente, se pueden utilizar anticuerpos específicos duales entre cualquiera de las parejas descritas anteriormente. Dichas preparaciones de anticuerpo que se han descrito anteriormente pueden ser útiles para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, lesión de médula espinal, lesión cerebral traumática, esclerosis múltiple, lesión de nervios periféricos, esquizofrenia, depresión, ansiedad, así como crecimiento y plasticidad de nueritas y enfermedades relacionadas con neurotoxicidad mencionadas anteriormente.

Los anticuerpos de la presente divulgación también se pueden combinar con péptidos que permitan la transferencia transmembrana para incluir proteínas diana intracelulares. Dichas secuencias peptídicas pueden incluir, pero no se limitan a, tat, antenapedia, poli-arg, algunos péptidos anti-microbianos. Dichos péptidos pueden permitir la transferencia a través de membranas, incluyendo membranas plasmáticas celulares, y también membranas epiteliales o endoteliales, incluyendo, la barrera hematoencefálica, mucosa intestinal, meninges y otras.

Dichos péptidos también pueden permitir la entrada de inhibidores de señalización en las células, que pueden incluir anticuerpos o moléculas pequeñas contra las moléculas de señalización de NgR, incluyendo ROCK, GTPasas pequeñas, actina y estabilizador de mielina.

Un anticuerpo o parte de anticuerpo, de la presente invención también es para su uso en la administración con uno o más agentes terapéuticos de molécula pequeña adicionales útiles en el tratamiento de trastornos en los que está implicada la actividad de NgR como se ha tratado en los párrafos anteriores. Se debería entender que los anticuerpos de la presente invención o parte de unión al antígeno de los mismos se proporcionan para su uso solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, siendo seleccionado dicho agente adicional por el experto según su fin pretendido. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica como que es útil para tratar la enfermedad o afección que se va a tratar por administración del anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que dé lugar a un atributo beneficioso a la composición terapéutica, por ejemplo, un agente que afecte a la viscosidad de la composición. Las combinaciones preferidas pueden incluir, aunque no se limitan a, agentes antipsicóticos, tales como, pero sin limitarse a Risperidona, Olanzapina, Quetiapina, Fenotiacinas (Clorpromacina, Flufenacina, Levomepromacina, Pericianina, Perfenacina, Proclorperacina, Promacina, Tioridacina, Trifluoperacina), Butirofenonas (Benperidol, Haloperidol), Zotepina, Loxapina, Aripiprazol, Sertolina, Ziprasidona, inhibidores moleculares pequeños de la actividad de Rho cinasa (ROCK), incluyendo compuestos como fasudil, dimetilfasudil o cualquier otro inhibidor ROCK, ligandos de receptor pequeños contra receptor GABA A o receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR), fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), anti-inflamatorios corticosteroides tales como metilprednisolona.

Composiciones farmacéuticas de la invención

Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la presente invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y por periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéutica eficaz del anticuerpo o parte de anticuerpo puede determinarla un experto en la técnica y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o parte de anticuerpo para dar lugar a una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es la que los efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo o parte de anticuerpo están superados por los efectos terapéuticos beneficiosos. "Cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y por los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, aunque la dosis profiláctica se utiliza en sujetos antes o en un estadio temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Normalmente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares, que son compatibles fisiológicamente. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tampón fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes (tales como manitol, sorbitol), o cloruro sódico en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además pequeñas cantidades de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que aumentan la vida propia o efectividad del anticuerpo o parte del anticuerpo.

Las composiciones de la presente invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semi-sólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo soluciones inyectables y para infusión), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios.

La forma preferida depende del modo de administración que se pretenda y la aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones inyectables o para infusión, tales como las composiciones similares a las que se utilizan para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. El modo preferido de administración es el parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular. En una realización preferida, el anticuerpo es para su uso en la administración por infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo es para su uso en la administración por inyección intramuscular o subcutánea. Otra realización preferida incluye el anticuerpo para su uso en aplicación intratecal.

Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables en condiciones de manipulación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración del fármaco. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el principio activo (es decir, el anticuerpo o parte de anticuerpo) en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes que se enumeraron anteriormente, según sea necesario, seguido por una esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el principio activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y otros ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos liofilizados estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado al vacío y secado por pulverización que da lugar a un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo. La fluidez adecuada de una solución se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato o gelatina.

Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la presente invención son para su uso en la administración por una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/modo de administración preferidos es la inyección subcutánea, inyección o infusión intravenosa. El experto en la técnica apreciará que la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo se puede preparar con un vehículo que proteja el compuesto de la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos o sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biocompatibles biodegradables, tales como acetato de etileno vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o se conocen en general por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Robinson, ed., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

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

50 Ejemplos

La presente invención se clarificará adicionalmente por los siguientes ejemplos, que solo tienen la intención de ilustrar la presente invención y no limitar su alcance de ninguna manera.

50 Ejemplo 1. Producción de anticuerpos

Se inmunizaron ratones A/J (The Jackson Laboratories, Bar Harbor Me) con proteína NgR recombinante humana y de rata (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente). Los ratones se inmunizaron 4 veces por vía subcutánea con 50 ug de proteína NgR recombinante humana o de rata en un adyuvante completo de Freund para la primera inyección e Immnoeasy™ (Qiagen) para las tres últimas inmunizaciones. Cuatro días antes de la fusión, se inyectó a los ratones 10 ug de antígeno por vía intravenosa. Para la fusión, las células esplénicas de los animales inmunizados se fusionaron con células de mieloma SP2/0-Ag14 con una relación de 5:1 utilizando las técnicas convencionales de Kohler y Milstein (Kohler G y Milstein C; Nature Vol. 256, páginas 495-497 (1975). De siete a diez días tras la fusión, cuando se observaban las colonias de hibridoma macroscópicamente, se ensayaron los sobrenadantes por ensayo ELISA. Se revistieron las placas de ELISA con proteína(s) recombinante NgR humana o de rata a 1 ug/ml en PBS durante una noche a 4 °C y se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente. Los sobrenadantes diluidos se incubaron y se detectó la unión con un Fc de Ig de cabra anti-ratón conjugada con HRP. Las células de hibridoma que producían anticuerpos positivos en el ELISA se subieron de escala y se subclonaron por dilución limitante. El isotipo del anticuerpo se determinó utilizando el kit de isotipado EIA de Zymed.

Se han establecido diferentes formatos de ELISA y se utilizan de manera rutinaria como una primera exploración para identificar anticuerpos que se unen a NgR humano, de ratón o de rata. Los anticuerpos que reaccionan en los ensayos ELISA se pueden entonces ensayar por unión a células HEK o CHO que expresan establemente NgR recombinante humano o NgR recombinante de rata, y no a las células no transfectadas o de control. Para el formato

5 ELISA, se produjeron los receptores solubles (véase anteriormente). Para los estudios FACS, se expresaron las proteínas NgR de longitud completa en líneas celulares recombinantes. Los resultados para mAb 50 SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO:4 y mAb 51 SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6 en la unión ELISA y ensayos FACS se muestran en la Tabla 2.

10

Tabla 2. Resumen de las propiedades de unión de mAb 50 y mAb 51

Anticuerpo Monoclonal	Unión ELISA	Unión ELISA	Unión FACS	Unión FACS	Unión FACS	Unión FACS	Isotipo
	HuNgR 6X His	NgR6xHis de Rata	HEK293 NGR	HEK293 de Control	CHO K1 NGR de Rata	CHO K1 de Control	
mAb 50	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	IgG2a,k
mAb 51	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	IgG2a,k

Se obtuvieron anticuerpos adicionales mAb 1, mAb 52, mAb 53, mAb 54, mAb 55, mAb 56, mAb 57, mAb 58, mAb 59, mAb 60, mAb 61, y mAb 62 utilizando el mismo protocolo experimental.

15 Ejemplo 2. Determinación de la especificidad y afinidad de unión del anticuerpo por ELISA

Para determinar la especificidad de los anticuerpos monoclonales producidos en el Ejemplo 1, se llevó a cabo un ELISA utilizando NgR-Fc (una proteína de fusión que comprende los aminoácidos Met 1 a Ser 447 del NgR humano y un fragmento Fc humano (R&D Systems)) y NgR de rata (SEQ ID NO. 2). Ambos ligandos se inmovilizaron en placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc Maxisorb; 0,2 µg /pocillo). Como reactivo de bloqueo se utilizó albúmina de suero bovino al 2 % (BSA) en Tris-HCl, pH 7,2 durante 2 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos monoclonales se utilizaron en concentraciones comenzando a 10.000 ng/ml. Los anticuerpos unidos se detectaron con un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano rusticano (Sigma) y se desarrollaron utilizando un sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB, Pierce) en condiciones convencionales. mAb 50 y mAb

20 51 se unían específicamente a NgR humano. Cuando se utilizaban 0,2 µg de NgR-Fc humano/pocillo se apreciaba un 50 % de unión para ambos anticuerpos monoclonales a concentraciones de menos de 20 ng/ml (Figura 1A). En experimentos similares, mAb 50 y mAb 51 también se unían específicamente a un polipéptido que consistía en los aminoácidos del NgR de rata. Cuando se utilizaban 0,2 µg de NgR de rata/pocillo de una placa de microtitulación de

25 96 pocillos se veía una unión del 50 % para ambos anticuerpos monoclonales a concentraciones de menos de 20 ng/ml (Figura 1B). El resto de los anticuerpos monoclonales (mAb) de la presente invención también se unían al NgR humano o de rata. Las diferencias de las señales obtenidas en cada anticuerpo sugerían diferencias en las afinidades de unión (véase la Tabla 3).

30

Tabla 3. Resumen de los valores de CE50 para los mAb utilizando NgR humano o de rata

mAb	EC50	
	NgR humano ng/ml	NgR de rata ng/ml
1	10	10
4	8	>100
52	3	4
53	3	2
54	5	4
55	2	10
56	8	20
57	20	>100
58	5	15
59	15	15
60	2	5
62	10	7

35

Ejemplo 3. Caracterización de la unión de anticuerpo a NgR humano y de rata solubles utilizando transferencias de puntos y transferencias de Western

Para las transferencias de puntos, se aplicaron puntualmente 2 µl de proteína a diferentes concentraciones en tampón TTBS en una membrana de nitrocelulosa. Para las transferencias de Western se empaparon papel de filtro y nitrocelulosa durante 10 min en tampón de transferencia Novex con un 20 % de metanol. La transferencia se consiguió en una cámara Novex con una corriente constante (100 mA) durante 2 h a temperatura ambiente.

La cantidad de proteína añadida por punto era:

- a) 100 µg/ml ≈ 200 ng/punto
- b) 50 µg/ml ≈ 100 ng/punto
- c) 10 µg/ml ≈ 20 ng/punto
- d) 5 µg/ml ≈ 10 ng/punto
- e) 1 µg/ml ≈ 2 ng/punto
- f) 500 ng/ml ≈ 1 ng/punto

Tras la aplicación puntual de las sondas, la membrana se secó durante 10 min a temperatura ambiente antes de comenzar el protocolo de inmunodetección.

Todos los anticuerpos monoclonales ensayados se unieron a NgR humano y de rata. Las diferencias entre las señales que se obtenían con los diferentes anticuerpos sugerían diferencias en la afinidad de unión. (mAb 61 mostraba un alto fondo en los puntos en las condiciones utilizadas por los inventores para sondear las membranas de nitrocelulosa). La unión era dependiente del anticuerpo ya que la omisión de los anticuerpos dirigidos contra el NgR "control" no se mostraba señal alguna.

Los anticuerpos monoclonales reaccionaban de manera diferente al NgR desnaturalizado en las transferencias de Western. Solo el mAb 1 mostraba señales prominentes contra el NgR humano así como de rata. Como control de la capacidad de unión de los puntos de anticuerpos que contenían NgR no desnaturalizado humano y NgR no desnaturalizado de rata se aplicaron puntualmente en la membrana de nitrocelulosa después de que las proteínas se transfirieran de los geles SDS. Estos puntos funcionaban como controles positivos confirmando la unión de todos los anticuerpos monoclonales a las proteínas no desnaturalizadas en la misma membrana de nitrocelulosa. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Análisis de transferencia de puntos y transferencia de Western.

anticuerpo	Transferencia de puntos		Transferencia de Western	
	hNgR	rNgR	hNgR	rNgR
MAB1	+++	++	+++	++
MAB 52	+++	+++	-	-
MAB 53	+++	++	~	-
MAB 54	++	+	-	-
MAB 55	+++	++	~	-
MAB 56	++	+	-	-
MAB 57	++	~	-	-
MAB 58	++	+	-	-
MAB 59	+++	++	~	-
MAB60	+++	++	~	-
MAB61	++	+	-	-
MAB62	+++	++	~	-

anticuerpo	Transferencia de puntos		Transferencia de Western	
	hNgR	rNgR	hNgR	rNgR
+++ : señal muy fuerte; ++ : señal fuerte; + : señal; - : no señal; ~ : señal no relevante.				

Ejemplo 4. Competición por la unión de AP-Nogo66 al receptor de Nogo humano soluble (hNgR-Fc)

Para caracterizar adicionalmente los anticuerpos monoclonales se utilizó un ensayo de competición similar al ensayo de unión del Ejemplo 2 para ensayar la capacidad de los mAb producidos en el Ejemplo 1 para inhibir la unión de AP-Nogo66 al NgR-Fc humano. Se inmovilizó el NgR-Fc humano (0,2 µl/pocillo) en placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc Maxisorb) en 50 mM de tampón Na-carbonato pH 9 durante una noche a 4 °C seguido por una etapa de bloqueo de 2 h con un 2 % de BSA en Tris-HCl, pH 7,2 a temperatura ambiente. Los pocillos recibieron una concentración constante de AP-Nogo66 (con una concentración final de 0,15 nM en Tris-HCl, pH 7,2 con un 0,1 % de BSA) y concentraciones crecientes de mAb. Las placas se incubaron durante 90 min a temperatura ambiente. Durante cada etapa de incubación se lavaron las placas con tampón de lavado (10 mM Tris-HCl, pH 7,2 y un 0,05 % de Tween 20). La unión de AP-Nogo66 se detectó con sustrato AttoPhos (Roche) y se midieron las unidades de fluorescencia en el instrumento Poarstar (BMG). La Figura 2 muestra las unidades de fluorescencia relativas (RFU) para las mediciones tomadas a los 0 min y 30 min para el mAb 50 y mAb 51. La unión se bloqueó completamente por mAb 50 y mAb 51, y se necesitaba un exceso molar de 10 veces de ambos anticuerpos para inhibir un 50 % de unión de AP-Nogo66 a NgR-Fc. Los restantes anticuerpos, mAb 53, mAb 54, mAb 55, mAb 56, mAb 57, mAb 58, mAb 59, mAb 60, mAb 61, mAb 62 excepto el mAb 1, bloqueaban la unión de AP-Nogo66 al receptor de Nogo soluble, en un intervalo de concentración similar al que se veía por mAb 50 y mAb 51.

Ejemplo 5. Competición por la unión de AP-Nogo66 a NgR humano y de rata en células HEK293F por mAb 50 y mAb 51

Para caracterizar adicionalmente la unión y las propiedades competitivas de los mAb producidos como se describe en el Ejemplo 1, se utilizó una suspensión de células HEK293F que expresaban transitoriamente NgR humano o de rata. 48 h después de la transfección las células se colocaron en placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc Maxisorb) y se lavaron con tampón de solución salina tampón fosfato (PBS que contenía un 1 % de BSA). Se añadió 1 µg/200 µl de AP-Nogo66 (con una concentración final de 40 nM) y concentraciones variables de anticuerpos monoclonales (20 µg, 4, 0,8 y 0,16 µg/200 µl) y se incubaron durante 1 h a 4 °C. Se utilizó un anticuerpo monoclonal con el mismo isotipo como control negativo. Se detectó la unión de AP-Nogo66 con un anticuerpo anti-fosfatasa alcalina (Sigma), que se marcó con Alexa Fluor utilizando el kit de marcado con IgG2a de ratón Zenon (Invitrogen). El anticuerpo secundario se incubó durante 1 h a 4 °C. Al final de la incubación, se lavaron las células con PBS y se sometieron al análisis FACS. A la concentración de 20 µg/200 µl (con un exceso molar de 20 veces) el anticuerpo policlonal anti-NgR y el NgR-Fc (ambos de R&D Systems) bloqueaban la unión de AP-Nogo66 entre un 60 % y un 70 %, mientras que el mAb 50 y mAb 51 bloqueaban la unión de AP-Nogo66 aproximadamente un 90 %. El isotipo de anticuerpo de control se muestra en la Figura 3a para el mAb 50 y mAb 51 en NgR humano y rata a una concentración de 20 µg. El isotipo de anticuerpo de control se muestra como líneas negras (la señal más a la izquierda) y la unión de AP-Nogo66 en ausencia de cualquier anticuerpo se muestra como líneas rojas (la señal más a la derecha). El NgR tanto humano como de rata se unía a AP-Nogo66 igual de bien. La fluorescencia de AP-Nogo66 cambiaba a intensidades menores (sombreado; área verde) en presencia de ambos anticuerpos en células HEK293F que expresaban NgR humano y de reata. Utilizando concentraciones diferentes de anticuerpos se veía una CI50 con un exceso molar de 2 veces de anticuerpos monoclonales 50 y 51 frente a AP-Nogo66 para ambos NgR humano y de rata según se determinó por el ensayo del Kolmogorov-Smirnov (K-S).

La Figura 3b muestra los resultados con concentraciones variables de mAb 50 y mAb 51, es decir, 20,0 µg, 4,0, 0,8 y 0,16 µg/200 µl. Los otros mAb de la divulgación bloqueaban la unión de AP-Nogo66 al receptor de Nogo expresado en células HEK293F, en un intervalo de concentraciones similar al que se veía para el mAb 50 y 51. Véase la Tabla 5, que indica la cantidad de anticuerpo necesariamente para una competición de la unión al 50 % de AP-Nogo66 a NgR humano expresado en células HEK293F.

Tabla 5. Competición de AP-Nogo66 a NgR humano y de rata en células HEK293F

mAb	50 % Competición (µg)
50	0,5
51	0,5
52	3
53	3
54	0,8
55	0,6
56	0,8

mAb	50 % Competición (µg)
57	0,2
58	0,2
59	3
60	0,8
62	0,3

Ejemplo 6. Neutralización de la inhibición del crecimiento de neuritas inducida por AP-Nogo66 por los mAb 50 y mAb 51 en células Ntera2

- 5 Se estudiaron los anticuerpos de la presente invención con respecto a sus efectos sobre el crecimiento de neuritas en un sistema funcional estrechamente parecido a la situación in vivo utilizando células Ntera-2 humanas y tipos celulares de roedores (neuronas corticales de ratón, neuronas corticales de rata y neuronas del gránulo cerebelar de rata), y AP-Nogo66 y mielina como ligandos.
- 10 Las células Ntera-2 (una línea celular de teratocarcinoma humano) se pueden diferenciar en células tipo neuronas utilizando ácido retinoico, que expresan ARNm de NgR (PCR) y proteína de superficie celular como se muestra por la modesta unión de un anticuerpo policlonal a NgR (unión por FACS). La expresión de NgR natural humano por las células Ntera-2 en la superficie celular se detectó por análisis FACS utilizando un isotipo de anticuerpo de control (área no sombreada) y mAb 50 y mAb 51 (área sombreada), respectivamente (Figura 4). La unión de ambos anticuerpos al NgR expresado en la superficie de las células Ntera-2 se muestra en las áreas sombreadas.

15 El análisis del crecimiento de neuritas o el colapso de crecimiento de conos en estas células diferenciadas es un sistema in vitro lo más cercano posible a la neurona humana. Las células Ntera-2 (del Centro de Recursos Nacional Alemán para biológicos, DMSZ, Braunschweig) se descongelaron y se colocaron en placas en matraces de cultivo de 175 cm² (Greinerbio-one nº 660175) con medio DMEM (Gibco nº 31966-021 + un 10 % de suero fetal bovino (FCS) + un 5 % de suero equino (PS)). Después de varios días de cultivo las células se volvieron a colocar en placas. Para esto, las células se lavaron una vez con PBS (Gibco nº 14190-094), se lavó con tripsina/EDTA (Gibco nº 25300-054) y se incubó con tripsina/EDTA durante 5 minutos. Para la diferenciación, las células se re-suspendieron, se colocaron en placas 2,5 x 10⁶ células en matraces de 175 cm² en DMEM (Gibco 31966-021, Lote Nº 3092594) más un 10 % de FCS + un 5 % de PS, más un 1 % de Penicilina/estreptomocina (5000/5000 unidades/ml), más ácido retinoico (SIGMA nº R2625) a una concentración final de 10 µM).

20 Para la diferenciación, se añadió ácido retinoico (SIGMA nº R2625) a una concentración final de 10 µM dos veces a la semana a las células Ntera-2 durante un periodo de tres semanas. Tras 21 días de diferenciación las células se volvieron a colocar en placas. Para esto, las células se lavaron una vez con PBS, se lavaron con tripsina/EDTA y se incubaron con tripsina/EDTA durante 5 minutos. Las células se re-suspendieron, se dividieron 1:6 y se colocaron en placas en seis matraces de 175 cm² en DMEM (Gibco 31966-021, Lote Nº 3092594) + un 10 % de FCS + un 5 % PS + un 1 % PenEstrep durante 2-3 días. Tras 2-3 días se lavaron las células con PBS, se despegaron físicamente, se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 rpm, se re-suspendieron en medio Neurobasal (Gibco nº 21103-049) más 2 mM de L-Glutamina (Gibco nº 25030-024) más Penicilina/estreptomocina más suplemento B27) y se pre-agregaron en un matraz Erlenmeyer (Corning nº 431143). De esta manera se añadieron 10⁶ células/ml a 2x 15 ml de medio de agregación (medio neurobasal (Gibco nº 21103-049) más 2 mM de L-Glutamina (Gibco nº 25030-024) más Penicilina/estreptomocina más Suplemento B27)), se agitó suavemente durante una noche a 37 °C, con un 5 % de CO₂ y se colocaron en placas en placas de 96 pocillos (Biocoat Poly-D-Lysin Cellware 96-Well Black/Clear Plate Becton Dickinson nº 35 4640 (35 6640)) pre-revestidas con sustratos inhibidores y de control. Para los sustratos inhibidores la mitad de la placa de 96 pocillos se pre-revistió con 100 µl de AP-Nogo66 (la concentración de AP-Nogo66 era de 15 µg/ml) más laminina (Sigma, L-2020, Lot 014K4060, (solución de reserva 1 mg/ml)) en PBS estéril; con una cantidad final de Laminina por pocillo de 20 µg. Para el sustrato permisivo la segunda mitad de la placa se revistió con 100 µl de Laminina (20 µg). Tras una incubación de 2 horas las placas se lavaron dos veces con PBS y 50 µl de la suspensión pre-agregada se colocaron en placas en cada pocillo, suplementado con 40 µl de medio. Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 horas, y finalmente se añadieron 10 µl de una solución de mAb 50 y mAb 51 pre-diluidos para dar una concentración final de anticuerpos entre 1 y 100 µg/ml. Las células se incubaron una noche a 37 °C, con un 5 % de CO₂, al día siguiente se fijaron con paraformaldehído al 2 % (SIGMA nº P-6148) y se almacenaron a 4 °C para análisis posteriores. El análisis de crecimiento de neuritas se llevó a cabo con el software AxioVision LE Rel. 4.1, en el que se utilizaron los parámetros de evaluación convencionales (área de agregado, y área de agregado y área de crecimiento de neuritas).

25 El crecimiento de neuritas de los agregados de Ntera-2 se cuantificó con el método descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 5, se puede observar una mejoría significativa del crecimiento de neuritas a 2 µg/ml para mAb 50 y a 1 µg/ml para mAb 51. Significación frente al tratamiento con Nogo66: * = valor p < 0,05; *** = valor de p < 0,001.

30 La mejora de la inhibición del crecimiento de neuritas también se obtuvo con los anticuerpos mAb 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 y 62. El mAb 1 y mAb 4 no mejoraban la inhibición del crecimiento de neuritas por AP-Nogo66.

Ejemplo 7. Mutantes de eliminación del hNgR: expresión, purificación y unión de los anticuerpos

El hNgR se expresaba como una proteína soluble por eliminación de los aminoácidos del extremo C para evitar la formación del enlazador GPI (los 450 últimos aminoácidos) y la unión con la membrana y utilizando una señal de secreción para aumentar potencialmente la cantidad de proteína secretada. El sistema de expresión que se utilizaba se basaba en una transfección transitoria de plásmidos de expresión en células HEK293F. Las proteínas marcadas con His secretadas se capturaban utilizando perlas Ni-NTA (ácido níquel-nitriloacético). Las proteínas eluidas se analizaron en cuanto a la pureza y tamaño por PAGE y transferencia de Western utilizando una proteína marcada con his no relacionada (RGM A-His) como control negativo. Para ajustar mejor la proteína NgR en estas preparaciones, la cantidad de NgR se midió por transferencias de puntos utilizando un anticuerpo policlonal (AF1208) contra el hNgR que se esperaba que detectaría todos los mutantes de eliminación. Se llevaron a cabo las transferencias de puntos que utilizan la cantidad ajustada de proteína para los diferentes mutantes NgR de eliminación. Las transferencias de puntos se utilizaron para la inmunodetección con los anticuerpos enumerados.

La unión de los anticuerpos a los NgR mutantes de eliminación se caracterizó adicionalmente utilizando los sobrenadantes de los cultivos de células 293F que expresaban NgR mutantes de eliminación como fuente de NgR no purificados

(i) Generación de NgR mutantes de eliminación de acuerdo con Fournier et al. (Truncated Soluble Nogo Receptor Binds Nogo-66 and Blocks Inhibition of Axon Growth by Myelin; Alyson E. Fournier, Graham C. Gould, Betty P. Liu, Stephen M. Strittmatter; The Journal of Neuroscience, Octubre 15, 2002, 22(20):8876-8883). Se habían descrito siete (7) mutantes de eliminación del NgR humano en la bibliografía (Fournier et al.). Las siete construcciones mutantes se generaron a partir de pSecTag2A IgK/hNgR 27-450/Myc/His. Esta construcción contenía la región codificante para los aminoácidos 27-450 del NgR humano fusionada con un péptido IgK líder y un marcador Myc e His en el extremo C en un vector pSecTag2A. Se generaron las siguientes construcciones:

- pSecTag2AigK/hNgR 27-450/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR 58-450/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 58-106/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 106-155/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 155-202/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 203-250/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 260-310/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR 27-310/Myc/His

Todas las construcciones excepto pSecTag2AigK/27-310/Myc/His se generaron utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange II XL (Stratagene, nº 200521) y se llevaron a cabo las transformaciones en células de E. coli XL10 Gold. Para pSecTag2AigK/27-310/Myc/His la región correspondiente de la secuencia codificante se amplificó y se clonó en pSecTag2A. Se utilizaron los siguientes cebadores de mutagénesis y amplificación para eliminar las diferentes partes de la región codificante de NgR.

1. pSecTag2AigK/hNgR 58-450/Myc/His

Mey 1008 : cebador en sentido

*GCCAGGCGCGCCGTACGAAGCTTATGCGCCAGCCAGCGCATCTTCCTGC
ACGGC*

secuencia del vector secuencia del hNgR comenzando en el aminoácido A58

Mey 1009 : cebador antisentido

*GCCGTGCAGGAAGATGCGCTGGCTGGCGCATAAGCTTCGTACGGCGCGC
CTGGC*

secuencia del vector secuencia del hNgR comenzando en el aminoácido A58

2. pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 58-106/Myc/His

Mey 1014 : cebador en sentido

*GCTGTGCCCCGTGGGCATCCCTGCTGCCCTCCTGGAGCAGCTGGACCTCAGCGATAAT
GC*

secuencia del hNgR hasta el aminoácido A58 secuencia del hNgR comenzando desde el aminoácido

L106

Mey 1015 : cebador antisentido

GCATTATCGCTGAGGTCCAGCTGCTCCAGGAGGGCAGCAGGGATGCCACGGGCACA
GC

5

secuencia del hNgR hasta el aminoácido A58 secuencia de hNgR comenzando desde el aminoácido L106

3. pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 106-154/Myc/His

10

Mey 1021 : cebador en sentido

GCGGCTGCCTTCACTGGCCTGGCCGCCCTGCAGTACCTCTACCTGCAGGA
CAACGC

15

secuencia del hNgR hasta el aminoácido A105 secuencia del hNgR comenzando desde el aminoácido A155

Mey 1022 : cebador antisentido

GCGTTGTCCTGCAGGTAGAGGTACTGCAGGGCGGCCAGGCCAGTGAAGGC
AGCCGC

20

secuencia del hNgR hasta el aminoácido A105 secuencia del hNgR comenzando desde el aminoácido A155

4. pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 155-202/Myc/His

25

Mey 1023 : cebador en sentido

CGGGGCTGTTCCGCGGCCCTGGCTAGCCTCGACCGTCTCCTACTGCACCAG
AACCGC

30

secuencia del hNgR hasta el aminoácido A154 secuencia del hNgR comenzando desde el aminoácido S203

Mey 1024 : cebador antisentido

35

GCGGTTCTGGTGCAGTAGGAGACGGTTCGAGGCTAGCCAGGCCGCGGAACA
GCCCGC

secuencia del hNgR hasta el aminoácido A154 secuencia del hNgR comenzando desde el aminoácido S203

40

5. pSecTag2AigK/hNgR27-450/Δ 203-250/Myc/His

Mey 1025 : cebador en sentido

GAGCGCGCCTTCCGTGGGCTGCACGCCCTGCAGTACCTGAGGCTCAACG
ACAACC

45

secuencia del hNgR hasta el aminoácido H202 secuencia del hNgR comenzando desde el aminoácido A251

Mey 1026 : cebador antisentido

50

GGTTGTCGTTGAGCCTCAGGTACTGCAGGGCGTGCAGCCCACGGAAGGC
GCGCTC

secuencia del hNgR hasta el aminoácido H202 secuencia del hNgR comenzando desde el aminoácido A251

55

6. pSecTag2AigK/hNgR27-450/ Δ 260-310/Myc/His

Mey 1027 : cebador en sentido

GCGTGCCCTGCAGTACCTGAGGCTCAACGACGTGGCCACCGGCCCTTACCAT
 CCCATCTG

secuencia del hNgR hasta el aminoácido D259 secuencia del hNgR comenzando desde el aminoácido V311

Mey 1028 : cebador antisentido

CAGATGGGATGGTAAGGGCCGGTGGCCACGTGCTTGAGCCTCAGGTAAGTCA

secuencia del hNgR hasta el aminoácido D259 secuencia del hNgR comenzando desde el aminoácido V311

7. pSecTag2AigK/hNgR27-310/Myc/His

Mey 1016 : cebador en sentido CCCCAAGCTTATGCCAGGTGCCTGC secuencia del hNgR comenzando desde el aminoácido C27

Mey 1030 : cebador antisentido CCCCGAATTCCAGCGCAGCCCTGCAGGTC secuencia del hNgR hasta el aminoácido A310. Véase una representación esquemática en la Figura 6.

(ii) Expresión de los NgR mutantes de eliminación

La eliminación de los aminoácidos de extremo C del NgR humano da lugar a la pérdida de las propiedades del ancla de membrana y a la presencia de un receptor proteico soluble en el sobrenadante celular. En el extremo N el péptido de señal de hNgR (aminoácidos 1-27) se sustituía por el péptido de señal codificado en el vector. Por lo tanto una variante de eliminación en el extremo N y el extremo C que comenzaba en el aminoácido 27 del hNgR y terminaba en el aminoácido 450 del hNgR (hNgR 27-450) se utilizó como base para todos estos mutantes para hacer posible la presencia de proteínas solubles en los sobrenadantes celulares. Adicionalmente, estos mutantes contenían un marcador de aminoácidos corto para permitir la purificación de estas proteínas. El ADN de los hNgR mutantes se expresaron transitoriamente en células 293F. Se recolectaron los sobrenadantes celulares por centrifugación tras 72 h. La purificación de las proteínas se hizo por los métodos posteriores. Las transfecciones se hicieron con los siguientes ADN codificantes para los 7 mutantes diferentes del NgR humano.

- pSecTag2AigK/hNgR 27-450/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR 58-450/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/ Δ 58-106/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/ Δ 106-155/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/ Δ 155-202/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/ Δ 203-250/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR27-450/ Δ 260-310/Myc/His
- pSecTag2AigK/hNgR 27-310/Myc/His

El ADN de los mutantes hNgR se expresó transitoriamente en células 293F.

(iii) Purificación de las NgR proteicos utilizando afinidad por quelato de Ni (Ni-NTA)

Se utilizaron perlas superflow Ni-NTA (Qiagen, Qiagen n° 1018611). Se lavaron las perlas 3 veces en PBS (solución salina tampón fosfato, Invitrogen) por centrifugación de la suspensión de perlas a 13500 rpm, desechando los sobrenadantes, re-suspendiendo las perlas en PBS nuevo. Se utilizaron 200 μ l de suspensión de perlas por cada 30 ml de sobrenadante de cultivo celular. Las perlas se incubaron con los sobrenadantes del cultivo celular durante una noche a 4 °C en un rotador, 60 rpm) y se centrifugaron tras la incubación (10 min, 3000 rpm) para aglomerar las perlas. Se desechó el sobrenadante y las perlas se lavaron 3 veces con PBS. Las proteínas unidas se eluyeron de las perlas utilizando 250 μ l de tampón de elución (PBS, 160 mM de NaCl, 150 mM de imidazol). Tras 30 minutos de incubación en un rotador a temperatura ambiente, las perlas se aglomeraron por centrifugación a 13.500 rpm durante 3 min. Se tomó el sobrenadante. La proteína eluida se congeló a -20 °C para análisis adicionales.

Los datos de los experimentos de la transferencia de puntos con los mutantes de eliminación del hNgR se resumen en la tabla 6.

Tabla 6.

Anticuerpos	Mutantes							
	1	2	3	4	5	6	7	8
AF1208	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++
MAB1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	~
MAB4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	~
MAB 50	++	-	-	-	-	+++	-	~
MAB 51	++	-	-	-	-	+++	-	~
MAB 52	++	-	-	-	-	+++	-	++
MAB 53	++	-	-	-	-	+++	-	++
MAB 54	+	-	-	-	-	+	-	~
MAB 55	+	-	-	-	-	+	-	~
MAB 57	~	-	-	-	-	-	-	-
MAB 58	++	-	-	-	~	++	-	~
MAB 59	++	-	-	-	~	++	-	~
MAB60	+++	-	-	-	~	++	-	+
MAB61	+	-	-	-	-	+	-	+
MAB62	+		-	-	~	+	-	~

+++ : señal muy fuerte; ++ : señal fuerte;
+ : señal; - : no señal; ~ : señal no relevante.

Ejemplo 8 A. Competición con la unión de MAG-Fc a NgR-Fc

5 Para caracterizar adicionalmente los anticuerpos monoclonales se utilizó un ensayo de competición similar al ensayo de unión del Ejemplo 2 para ensayar la capacidad de los dos mAb producidos en el Ejemplo 1 para inhibir la unión de MAG-Fc al NgR-Fc humano. Los inventores inmovilizaron el NgR-Fc (0,2 µg/pocillo, R&D Systems) en placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc Maxisorb) en 50 mM de tampón carbonato-Na pH 9 durante una noche a 4 °C seguido por una etapa de bloqueo de 2 h con un 2 % de BSA en Tris-HCl, pH 7,2 a temperatura ambiente. Se marcó la MAG-Fc (quimera MAG-Fc recombinante de rata de R&D Systems, nº de catálogo 538-MG) con peroxidasa de rábano rusticano con el kit de marcado de IgG humana Zenon (Molecular Probes). Los pocillos recibieron una concentración constante de MAG-Fc marcado (a una concentración final de 50 ng/ml en Tris-HCl, pH 7,2 con un 0,1 % de BSA) y las concentraciones indicadas de mAb 50 y mAb 51. Se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente y se utilizaron MAG-Fc y NgR-Fc como controles. Durante cada etapa de incubación se lavaron las placas con tampón de lavado (10 mM de Tris-HCl, pH 7,2 y un 0,05 % de Tween-20) La MAG-Fc marcado se desarrolló utilizando el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB, Pierce) en condiciones convencionales. Como se muestra en la Fig. 7, el mAb 50 (triángulos cerrados) y el mAb 51 (triángulos abiertos) no inhibían la unión de MAG-Fc al NgR humano. La MAG-Fc y NgR-Fc competían por la unión de la MAG-Fc marcado (círculos cerrados) a NgR-Fc humana (una proteína de fusión que comprendía del aminoácido Met 1 a la Ser 447 del NgR humano y un fragmento Fc humano (R&D Systems); cuadrados cerrados). Por lo tanto, el mAb 50 y mAb 51 no compiten con MAG por la unión a NgR en estas condiciones (Figura 7). Ninguno del resto de otros anticuerpos competía con MAG por la unión a NgR en estas condiciones.

Ejemplo 8 B. Competición de OMgp a NgR-Fc

25 Para caracterizar adicionalmente los anticuerpos monoclonales se utilizó un ensayo similar al ensayo de unión del Ejemplo 8A para ensayar la capacidad de los dos mAb producidos en el Ejemplo 1 para inhibir la unión de OMgp a NgR-Fc humano. Se inmovilizó el NgR-Fc (0,2 µg/pocillo, R&D Systems) en placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc Maxisorb) en 50 mM de tampón carbonato-Na pH 9 durante una noche a 4 °C seguido por una etapa de bloqueo de 2 h con un 2 % de BSA en Tris-HCl, pH 7,2 a temperatura ambiente. Los pocillos recibieron una concentración constante de OMgp humano (R&D Systems/1673-OM; a una concentración final de 500 ng/ml en Tris-HCl, pH 7,2 con un 0,1 % de BSA) y las concentraciones indicadas de mAb 50 y mAb 51. La mezcla se incubó durante 60 min a temperatura ambiente. Se detectó la unión de OMgp con un anticuerpo anti-His marcado con peroxidasa de rábano rusticano (Roche). Durante cada etapa de incubación se lavaron las placas con tampón de lavado (10 mM de Tris-HCl, pH 7,2 y un 0,05 % de Tween 20). El anticuerpo anti-His marcado se desarrolló

utilizando el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB, Pierce) en condiciones convencionales.

5 Como se muestra en la Tabla 7, el mAb 50 y mAb 51 bloqueaban parcialmente la unión de OMgp a NgR humano (con un intervalo del 30-40 %). Los demás anticuerpos, excepto mAb 52 y mAb 59, también bloqueaban parcialmente la unión de OMgp a NgR humano, incluso a concentraciones de hasta 80 µg/ml que es un exceso molar de más de 100 veces (Tabla 7).

Tabla 7.

mAb	Competición máxima (%)
1	26
4	9
50	33
51	36
52	0
53	27
54	23
55	35
56	37
57	17
58	32
59	0
60	5
62	22

10 **Ejemplo 9. Neutralización de la inhibición del crecimiento de neuritas inducida por AP-Nogo66 por mAb 50 y mAb 51 en células DRG de rata**

Se utilizaron los ganglios dorsales (DRG) de crías de rata de 3-6 días post-natales para investigar la acción de los anticuerpos anti-NgR sobre el crecimiento de las neuritas.

15 Para la generación de DRG, se decapitaron 6-8 crías de rata con unas tijeras quirúrgicas. Se diseccionó la médula espinal de la parte ventral retirando los órganos ventrales y las vértebras. Luego, se abrió la columna vertebral longitudinalmente con ayuda de unas tijeras finas. Las médulas espinales se retiraron junto con los DGR adheridos y se transfirieron a placas de Petri de 10 cm que contenían PBS. Se liberaron por disección los DRG de la médula
20 espinal y las fibras nerviosas de conexión utilizando dos pinzas finas y se transfirieron a una placa de Petri de 35 mm que contenía 1 ml de PBS. Tras recolectar todos los DRG, se añadieron 1,5 ml de solución de colagenasa (4 mg/ml colagenasa Tipo 1, Worthington nº CLS-1) en PBS y se incubaron los DRG durante 20-30 min a 37 °C. Se añadieron 0,5 ml de una solución de tripsina (un 0,5 % de tripsina (SERVA nº 37290) en PBS) y se incubaron los DRG durante otros 15-25 min a 37 °C. Se transfirieron los DRG a un tubo de 15 ml y se añadieron 10 ml de medio
25 (DMEM Nut Mix F12 (Gibco nº 31330-038), más un 5 % de FCS (Gibco, inactivado por calor) más un 5 % de suero equino (Sigma, inactivado por calor) más un 1 % de penicilina/estreptomicina (Gibco nº 15140-133)). Tras el asentamiento del os DRG al fondo del tubo se desechó el sobrenadante. Se disociaron los DRG en un 2 ml de medio por 3-5 pasajes a través de una pipeta Pasteur seguido por 2-3 pasajes adicionales a través de una pipeta Pasteur con apertura reducida. Tras el asentamiento del agrupamiento celular, el sobrenadante que contenía células
30 disociadas se transfirió a un nuevo tubo. Las células se recolectaron por centrifugación durante 5 min a 1000 rpm, se re-suspendieron en 2 ml de medio, se contaron, y se diluyeron a la densidad celular deseada en un medio suplementado con factor de crecimiento nervioso (NGF; a una concentración final de 62,5 µg/ml, Roche nº 1014331). Se colocaron en placas 4000-7000 células en un volumen de 80 µl por pocillo de una placa de 96 pocillos revestidos con poli-lisina (por ejemplo, Becton Dickinson nº 356640), que se habían revestido adicionalmente con
35 100 µl de solución de revestimiento (1 vial de laminina (1 mg/ml Sigma nº L-2020) diluida con 50 ml de agua estéril), seguido por un periodo de incubación de 3 h a 37 °C. La colocación en placas de las células continuó con la adición de concentraciones crecientes de anticuerpo en un volumen de 10 µl. Tras la incubación durante 2 h en una incubadora con CO₂ a 37 °C se añadieron 10 µl de AP-Nogo66. Las células se cultivaron durante 18-30 h y se fijaron con la adición de 100 µl de una solución de paraformaldehído al 4 % en PBS (solución salina tampón fosfato; Gibco
40 nº 14190-094), seguido por una incubación a 4 °C durante al menos 12 h. Como alternativa a las placas de 96 pocillos, se utilizaron placas de 24 pocillos (por ejemplo, Falcon nº 353047) en conjunción con portaobjetos revestidos de poli-lisina (por ejemplo, Becton Dickinson nº 354085) y se revistieron aplicando 500 µl de solución de revestimiento. Se visualizó el crecimiento de neuritas por inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo anti-tubulina βIII (por ejemplo, de Abcam nº ab14545) en conjunción con un 2º anticuerpo conjugado con Cy3 (por
45 ejemplo, Jackson ImmunoResearch nº 715-165-151). Se tiñeron los núcleos por adición de Bisbencidina (H33258) al 21 anticuerpo. Se tomaron las fotos microscópicas a una magnificación 10x en un BDTM Pathway Bioimager (Becton Dickinson) y se determinó la longitud de las neuritas utilizando el software AttoNO (Beckton Dickinson). El

crecimiento de neuritas se normalizó con el número de DRG por foto. La Figura 8 muestra la neutralización de la inhibición del crecimiento de neuritas inducida por AP-Nogo66 con el mAb 50 como ejemplo. La Figura 9 muestra los resultados de un experimento utilizando los anticuerpos mAb 50 y mAb 51, respectivamente. La aplicación de AP-Nogo66 reduce fuertemente la longitud del crecimiento de neuritas (2ª columnas) en comparación con las condiciones de control sin AP-Nogo66 (1ª columnas). Ambos anticuerpos neutralizaban la inhibición del crecimiento de neuritas inducida por AP-Nogo66 de una manera dependiente de la dosis. La longitud de neuritas normalizada con el número de DRG llegaba ser estadísticamente diferente a 50 µg/ml (últimas columnas) para ambos anticuerpos en comparación con la aplicación de AP-Nogo66 sin los anticuerpos (2ª columna). La mejoría de la inhibición del crecimiento de neuritas también se obtenía con los anticuerpos mAb 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 y 62. El mAb 1 y mAb 4 no mejoraban la inhibición del crecimiento de neuritas por el AP-Nogo66.

A partir de estos resultados se puede concluir que dichos anticuerpos tienen el potencial de estimular el crecimiento de neuritas en un ambiente inhibitor del crecimiento.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ABBVIE, INC.
- 20 <120> ANTICUERPOS MONOCLONALES NEUTRALIZANTES CONTRA EL RECEPTOR DE NOGO-66 (NGR) Y USOS DE LOS MISMOS
- <130> 8217EPO1
- 25 <150> EP 07854735.3
- <151> 21-11-2007
- <150> PCT/US2007/085349
- <151> 21-11-2007
- 30 <150> 60/860.256
- <151> 21-11-2006
- <160> 10
- 35 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 495
- 40 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

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 Val Arg Ser
 20 25 30

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

Ser Cys Pro Gln Gln Gly Leu Gln Ala Val Pro Val Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

45

ES 2 609 924 T3

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

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

Ser Asn Val Leu Ala Arg Ile Asp Ala Ala Ala Phe Thr Gly Leu Ala
100 105 110

Leu Leu Glu Gln Leu Asp Leu Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg Ser Val
115 120 125

Asp Pro Ala Thr Phe His Gly Leu Gly Arg Leu His Thr Leu His Leu
130 135 140

Asp Arg Cys Gly Leu Gln Glu Leu Gly Pro Gly Leu Phe Arg Gly Leu
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gln Tyr Leu Tyr Leu Gln Asp Asn Ala Leu Gln Ala Leu
165 170 175

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

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

His Ser Leu Asp Arg Leu Leu Leu His Gln Asn Arg Val Ala His Val
210 215 220

His Pro His Ala Phe Arg Asp Leu Gly Arg Leu Met Thr Leu Tyr Leu
225 230 235 240

Phe Ala Asn Asn Leu Ser Ala Leu Pro Thr Glu Ala Leu Ala Pro Leu
245 250 255

Arg Ala Leu Gln Tyr Leu Arg Leu Asn Asp Asn Pro Trp Val Cys Asp
260 265 270

Cys Arg Ala Arg Pro Leu Trp Ala Trp Leu Gln Lys Phe Arg Gly Ser
275 280 285

Ser Ser Glu Val Pro Cys Ser Leu Pro Gln Arg Leu Ala Gly Arg Asp
290 295 300

Leu Lys Arg Leu Ala Ala Asn Asp Leu Gln Gly Cys Ala Val Ala Thr
305 310 315 320

Gly Pro Tyr His Pro Ile Trp Thr Gly Arg Ala Thr Asp Glu Glu Pro
325 330 335

Leu Gly Leu Pro Lys Cys Cys Gln Pro Asp Ala Ala Asp Lys Ala Ser

ES 2 609 924 T3

340 345 350

Val Leu Glu Pro Gly Arg Pro Ala Ser Ala Gly Asn Ala Leu Lys Gly
 355 360 365

Arg Val Pro Pro Gly Asp Ser Pro Pro Gly Asn Gly Ser Gly Pro Arg
 370 375 380

His Ile Asn Asp Ser Pro Phe Gly Thr Leu Pro Gly Ser Ala Glu Pro
 385 390 395 400

Pro Leu Thr Ala Val Arg Pro Glu Gly Ser Glu Pro Pro Gly Phe Pro
 405 410 415

Thr Ser Gly Pro Arg Arg Arg Pro Gly Cys Ser Arg Lys Asn Arg Thr
 420 425 430 435

Arg Ser His Cys Arg Leu Gly Gln Ala Gly Ser Gly Gly Gly Thr
 435 440 445

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

Ser Thr Val Ala Ala Ala Arg Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 465 470 475 480

Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 485 490 495

<210> 2
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 2

5

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 609 924 T3

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Gln Asn His Val Ala Arg Val His Pro His Ala Phe Arg Asp
 210 215 220

Leu Gly Arg Leu Met Thr Leu Tyr Leu Phe Ala Asn Asn Leu Ser Met
 225 230 235 240

Leu Pro Ala Glu Val Leu Val Pro Leu Arg Ser Leu Gln Tyr Leu Arg
 245 250 255

Leu Asn Asp Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys Arg Ala Arg Pro Leu Trp
 260 265 270

Ala Trp Leu Gln Lys Phe Arg Gly Ser Ser Ser Glu Val Pro Cys Asn
 275 280 285

Leu Pro Gln Arg Leu Ala Gly Arg Asp Leu Lys Arg Leu Ala Ala Ser
 290 295 300

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

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

Gln Pro Asp Ala Ala Asp Lys Ala Ser Val Leu Glu Pro Gly Arg Pro
 340 345 350

Ala Ser Ala Gly Asn Ala Leu Lys Gly Arg Val Pro Pro Gly Asp Thr
 355 360 365

Pro Pro Gly Asn Gly Ser Gly Pro Arg His Ile Asn Asp Ser Pro Phe

ES 2 609 924 T3

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

- <210> 4
- <211> 114
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Clon de anticuerpo 50 VL sintético
- 10 <400> 4

ES 2 609 924 T3

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

Gln Lys Val Ile Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
 20 25 30

Asn Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

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

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

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

His Tyr Thr Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

Lys Arg

- <210> 5
- <211> 119
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: clon de anticuerpo 51 VH sintético

10 <400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Trp Met His Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

ES 2 609 924 T3

35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Ser Asn Val Leu Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

- 5 <210> 6
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: clon de anticuerpo 51 VL sintético
- 10 <400> 6

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

Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

His Tyr Thr Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Glu Leu Lys
100 105 110

Arg

- 15 <210> 7
- <211> 631
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial

ES 2 609 924 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: construcción de la proteína AP-Nogo-66 sintética

<400> 7

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

Tyr Glu Ala Tyr Val Arg Ser Ser Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu
          35          40          45

Asn Pro Asp Phe Trp Asn Arg Glu Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala
 50          55          60

Lys Lys Leu Gln Pro Ala Gln Thr Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe
65          70          75          80

Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu
          85          90          95

Lys Gly Gln Lys Lys Asp Lys Leu Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met
100          105          110

Asp Arg Phe Pro Tyr Val Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys
115          120          125

His Val Pro Asp Ser Gly Ala Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val
130          135          140

Lys Gly Asn Phe Gln Thr Ile Gly Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn
145          150          155          160

Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg
165          170          175

Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val
180          185          190

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

Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Val Pro Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys
210          215          220

Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Ile Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile
225          230          235          240

Leu Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro
245          250          255

```

ES 2 609 924 T3

Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr Ser Gln Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys
 260 270
 Asn Leu Val Gln Glu Trp Leu Ala Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val
 275 280 285
 Trp Asn Arg Thr Glu Leu Met Gln Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr
 290 295 300
 His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His
 305 310 315 320
 Arg Asp Ser Thr Leu Asp Pro Ser Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala
 325 330 335
 Leu Arg Leu Leu Ser Arg Asn Pro Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu
 340 345 350
 Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala
 355 360 365
 Leu Thr Glu Thr Ile Met Phe Asp Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln
 370 375 380
 Leu Thr Ser Glu Glu Asp Thr Leu Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser
 385 390 395 400
 His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe
 405 410 415
 Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Arg Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu
 420 425 430
 Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro
 435 440 445
 Asp Val Thr Glu Ser Glu Ser Gly Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser
 450 455 460
 Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val
 465 470 475 480
 Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln
 485 490 495
 Thr Phe Ile Ala His Val Met Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr
 500 505 510
 Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro Pro Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His
 515 520 525

ES 2 609 924 T3

Pro Gly Tyr Leu Glu Glu Ala Leu Ser Leu Glu Arg Ile Tyr Lys Gly
 530 535 540

Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp Glu Gly His Pro Phe Arg Ala
 545 550 555 560

Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile Ser Glu Glu Leu Val Gln Lys Tyr
 565 570 575

Ser Asn Ser Ala Leu Gly His Val Asn Cys Thr Ile Lys Glu Leu Arg
 580 585 590

Arg Leu Phe Leu Val Asp Asp Leu Val Asp Ser Leu Lys Ser Leu Glu
 595 600 605

Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val
 610 615 620

Asp His His His His His His
 625 630

<210> 8
 <211> 1488
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
 gacgcggccc agccggccag gcgcgccgta cgaagcttat gccaggtgc ctgcgtatgc 120
 tacaatgagc ccaaggtgac gacaagctgc ccccagcagg gcctgcaggc tgtgcccgtg 180
 ggcateccctg ctgccagcca gcgcatcttc ctgcacggca accgcatctc gcatgtgcca 240
 gctgccagct tccgtgectg ccgcaacctc accatcctgt ggctgcactc gaatgtgctg 300
 gcccgaattg atgcggctgc cttaactggc ctggccctcc tggagcagct ggacctcagc 360
 gataatgac agctccggtc tgtggacctc gccacattcc acggcctggg ccgcctacac 420
 acgctgcacc tggaccgctg cggcctgcag gagctgggcc cggggctggt ccgcggcctg 480
 gctgccctgc agtacctcta cctgcaggac aacgcgctgc aggcactgcc tgatgacacc 540
 ttccgcgacc tgggcaacct cacacacctc ttctgcacg gcaaccgcat ctccagcgtg 600
 cccgagcgcg ccttccgtgg gctgcacagc ctgcaccgtc tctactgca ccagaaccgc 660
 gtggcccatg tgcacccgca tgccctccgt gaccttggcc gcctcatgac actctatctg 720
 ttgccaaca atctatcagc gctgcccact gaggccctgg cccccctgcg tgccctgcag 780
 tacctgaggc tcaacgacaa cccctgggtg tgtgactgcc gggcacgccc actctgggcc 840
 tggctgcaga agttccgcg ctcctctctc gaggtgccct gcagcctccc gcaacgcctg 900
 gctggccgtg acctcaaacg cctagctgcc aatgacctgc agggctgcgc tgtggccacc 960
 ggcccttacc atcccatctg gaccggcagg gccaccgatg aggagccgct ggggcttccc 1020
 aagtgtgcc agccagatgc cgctgacaag gcctcagtac tggagcctgg aagaccagct 1080

10

ES 2 609 924 T3

tcggcaggca atgcgctgaa gggacgcgtg ccgccccggtg acagcccgcc gggcaacggc 1140
 tctggcccac ggcacatcaa tgactcacc tttgggactc tgcttggtc tgctgagccc 1200
 ccgctcactg cagtgcggcc cgagggctcc gagccaccag ggttccccac ctcgggccc 1260
 cgccggaggc caggctgttc acgcaagaac cgcacccgca gccactgccg tctggggccag 1320
 gcaggcagcg ggggtggcgg gactggtgac tcagaaggct cagggtgccct acccagaatt 1380
 ctgcagatat ccagcacagt ggcggccgct cgaggaggcc ccgaacaaaa actcatctca 1440
 gaagaggatc tgaatagcgc cgtcgacat catcatcatc atcattga 1488

<210> 9
 <211> 1497
 <212> ADN
 <213> *Rattus norvegicus*

5

<400> 9

atgaagaggg cgtcctccgg aggaagccgg ctgctggcat ggggtttatg gctacagggc 60
 tggagggtag caacgccctg ccctgggtgcc tgtgtgtgct acaatgagcc caaggtcaca 120
 acaagctgcc cccagcaggg cctgcaggct gtaccactg gcatcccagc ctccagccag 180
 agaatctcc tgcacggcaa ccgaatctct tacgtgccag ccgccagctt ccagtcatgc 240
 cggaatctca ccattcctgtg gctgcactca aatgcgctgg ccgggattga tgccgcggcc 300
 ttcactggtc tgaccctcct ggagcaacta gatcttagtg acaatgcaca gctccgtgtc 360
 gtggaccca ccacgttccg tggcctgggc cacctgcaca cgctgcacct agaccgatgc 420
 ggctgcagg agctggggcc tggcctattc cgtgggctgg cagctctgca gtacctctac 480
 ctacaagaca acaacctgca ggcacttccc gacaacacct tccgagacct gggcaacctc 540
 acgcatctct ttctgcatgg caaccgtatc cccagtgttc ctgagcacgc tttccgtggc 600
 ttgcacagtc ttgaccgtct cctcttgac cagaaccatg tggctcgtgt gcacccacat 660
 gccttccggg accttgccc actcatgacc ctctacctgt ttgccaacaa cctctccatg 720
 ctccccgag aggtcctagt gccctgagg tctctgcagt acctgcgact caatgacaac 780
 ccctgggtgt gtgactgcag ggcacgtccg ctctgggctt ggctgcagaa gttccgaggt 840
 tcctcatccg aggtgccctg caacctacc caacgcctgg caggccgtga tctgaagcgc 900
 ctggctgcca gtgacttaga gggttgtgct gtggcttcgg ggcccttccg tcccttccag 960
 accaatcagc tcaactgatga ggagctgctg ggcctccca agtgctgcca gccggatgct 1020
 gcagacaagg cctcagtact ggaacccggg aggccggcgt ctgctggaaa tgcaactcaag 1080
 ggacgtgtgc ctcccggtag cactccacca ggcaatggct caggcccacg gcacatcaat 1140
 gactctccat ttgggacttt gccgggctct gcagagcccc cactgactgc cctgcggcct 1200
 ggggggttccg agccccggg actgcccacc acgggtcccc gcaggaggcc aggttgttcc 1260
 agaaagaacc gcacccgtag ccaactgccg ctgggccagg caggaagtgg gagcagtgga 1320
 actggggatg cagaaggttc gggggccctg ggaattcggg agggcaattc tgcagatctc 1380
 cagcacagtg gcggccgctc gactctagag ggcccgggt tcgaaggtaa gcctatccct 1440
 aaccctctcc tcggtctcga ttctacgcgt accggtcatc atcaccatca ccattga 1497

10

<210> 10
 <211> 1896
 <212> ADN

15

ES 2 609 924 T3

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: construcción del nucleótido AP-Nogo-66 sintético

5

<400> 10

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgtacg aagcttacgt aagatcttcc      120
ggaatcatcc cagttgagga ggagaacccg gacttctgga accgcgaggc agccgaggcc      180
ctgggtgccg ccaagaagct gcagcctgca cagacagccg ccaagaacct catcatcttc      240
ctgggcgatg ggatgggggt gtctacggtg acagctgcca ggatcctaaa agggcagaag      300
aaggacaaac tggggcctga gatacccctg gccatggacc gttcccata tgtggctctg      360
tccaagacat acaatgtaga caaacatgtg ccagacagtg gagccacagc cacggcctac      420
ctgtgcgggg tcaagggcaa cttccagacc attggcttga gtgcagccgc ccgctttaac      480
cagtgcaaca cgacacgcgg caacgaggtc atctccgtga tgaatcgggc caagaaagca      540
gggaagtcat tgggagtggg aaccaccaca cgagtgcagc acgcctcgcc agccggcacc      600
tacgcccaca cgggtaaccg caactggtac tcggacgccg acgtgcctgc ctcggcccgc      660
caggaggggt gccaggacat cgctacgcag ctcatctcca acatggacat tgacgtgatc      720
ctaggtggag gccgaaagta catgtttcgc atgggaacct cagaccctga gtaccagat      780
gactacagcc aaggtgggac caggctggac gggagaatc tgggagcagg atggctggcg      840
aagcgcaggg gtgcccggta tgtgtggaac cgactgagc tcatgcaggc ttccctggac      900
ccgtctgtga cccatctcat gggctctctt gagcctggag acatgaaata cgagatccac      960
cgagactcca cactggacct ctccctgatg gagatgacag aggctgccct gcgcctgctg     1020
agcaggaacc cccgcggctt cttcctcttc gtggaggggt gtcgcatcga ccatggtcat     1080
catgaaagca gggcttaccg ggcactgact gagacgatca tgttcgacga cgccattgag     1140
agggcggggc agctcaccag cgaggaggac acgctgagcc tcgtcactgc cgaccactcc     1200
cacgtcttct ccttcggagg ctaccccctg cgagggagct ccatcttcgg gctggcccct     1260
ggcaaggccc gggacaggaa ggcctacacg gtctctctat acggaaacgg tccaggctat     1320
gtgctcaagg acggcgcccg gccggatggt accgagagcg agagcgggag ccccgagtat     1380
cggcagcagt cagcagtgcc cctggacgaa gagacccacg caggcgagga cgtggcggtg     1440
ttcgcgcgcg gcccgcaggc gcacctggtt cacggcgtgc aggagcagac ctcatagcg     1500
cacgtcatgg ccttcgccgc ctgcctggag ccctacaccg cctgcgacct ggcgcccccc     1560
gccggcacca ccgacgccgc gcaccgggtt tatctcgagg aagcgtctc tctagaaagg     1620
atatacaagg gtgtgatcca agctatccag aatcagatg aaggccacct attcagggca     1680

tatctggaat ctgaagttgc tatactgtag gagttggttc agaagtacag taattctgct     1740
cttggctcatg tgaactgcac gataaaggaa ctcaggcgcc tcttcttagt tgatgattta     1800
gttgattctc tgaagtctct agaagggccc gaacaaaaac tcatctcaga agaggatctg     1860
aatagcggcg tcgaccatca tcatcatcat cattga                                     1896

```

10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal neutralizante aislado, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que interactúan específicamente al menos con un epítipo del receptor de Nogo-66, donde el anticuerpo monoclonal neutralizante aislado, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende una secuencia que comprende una región variable de cadena pesada (región VH) que comprende SEQ ID NO: 3 y una secuencia que comprende una región variable de cadena ligera (región VL) que comprende SEQ ID NO: 4, o una secuencia que comprende una región variable de cadena pesada (región VH) que comprende SEQ ID NO: 5 y una secuencia que comprende una región variable de cadena ligera (región VL) que comprende SEQ ID NO: 6.
2. El anticuerpo monoclonal neutralizante aislado, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1 donde dicho anticuerpo monoclonal neutralizante aislado disminuye la capacidad de Nogo-66 para unirse a su receptor o donde dicho anticuerpo monoclonal neutralizante aislado es capaz de neutralizar el Nogo-66.
3. El anticuerpo monoclonal neutralizante aislado, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 donde el receptor de Nogo-66 polipeptídico comparte un 90 % de homología con la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
4. El anticuerpo monoclonal neutralizante aislado, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 donde el receptor de Nogo-66 es codificado por un ácido nucleico que comparte un 90 % de homología con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.
5. El anticuerpo monoclonal neutralizante aislado, o fragmentos de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1 que:
- i) tiene una constante de disociación (K_d) que varía de 10^{-7} M a 10^{-13} M; o
 - ii) tiene una tasa on (K_{on}) que varía de 10^3 M⁻¹ s⁻¹ a 10^7 M⁻¹ s⁻¹; o
 - iii) tiene una tasa off (K_{off}) que varía de 10^{-3} s⁻¹ a al menos aproximadamente 10^{-6} s⁻¹; o
 - iv) tiene un valor de CI_{50} que varía de 10^{-6} s⁻¹ a al menos aproximadamente 10^{-12} s⁻¹; o
 - v) se une al NgR humano con una CE_{50} que varía 1×10^{-9} M a 1×10^{-11} M.
6. El anticuerpo monoclonal neutralizante aislado de acuerdo con la reivindicación 1 que se une al NgR humano donde el anticuerpo monoclonal neutralizante aislado está glucosilado.
7. El anticuerpo monoclonal neutralizante aislado o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo monoclonal neutralizante aislado o el fragmento de unión se selecciona de entre el grupo de un anticuerpo de ratón, un anticuerpo quimérico, y un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo quimérico, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂ y un fragmento Fv.
8. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal neutralizante aislado o una parte de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. El anticuerpo monoclonal neutralizante aislado o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la realización 1 o 2 para su uso en el tratamiento de un sujeto para un trastorno asociado con la actividad de NgR administrando solo o en combinación con otros agentes terapéuticos dicho anticuerpo monoclonal neutralizante aislado, donde el trastorno comprende enfermedades neurológicas que se seleccionan de entre el grupo que consiste en esclerosis Amiotrófica lateral, lesión del plexo braquial, lesión cerebral, incluyendo la lesión cerebral traumática, parálisis cerebral, ataxia de Fiedrich, Guillain-Barre, leucodistrofias, esclerosis múltiple, post polio, espina bífida, lesión de médula espinal, atrofia muscular espinal, tumores de médula espinal, ictus, y mielitis transversa, demencia, demencia senil, disfunción cognitiva leve, demencia relacionada con Alzheimer, corea de Huntington, disquinesia tardía, hiperquinesias, manías, Morbus Parkinson, síndrome de Steel-Richard, síndrome de Down, miastenia gravis, traumatismo nervioso, amiloidosis vascular, hemorragia cerebral I con amiloidosis, inflamación cerebral, ataxia de Fiedrich, trastorno de confusión agudo, esclerosis Amiotrófica lateral, glaucoma y enfermedad de Alzheimer.
10. UN anticuerpo monoclonal que se une específicamente al menos a un epítipo de un receptor de Nogo-66, donde dicho anticuerpo monoclonal es el anticuerpo monoclonal secretado por la línea celular de hibridoma con el N° de la ATCC PTA-8383, o el N° de la ATCC PTA-8384.
11. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 10, donde dicho anticuerpo monoclonal es el anticuerpo monoclonal secretado por la línea celular de hibridoma N° de la ATCC PTA-8383 y donde la unión da como resultado la inactivación del receptor de Nogo-66.
12. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 10, donde dicho anticuerpo monoclonal es el anticuerpo monoclonal secretado por la línea celular de hibridoma N° de la ATCC PTA-8384 y donde la unión da como resultado la inactivación del receptor de Nogo-66.

13. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

FIGURA 1A Y 1B

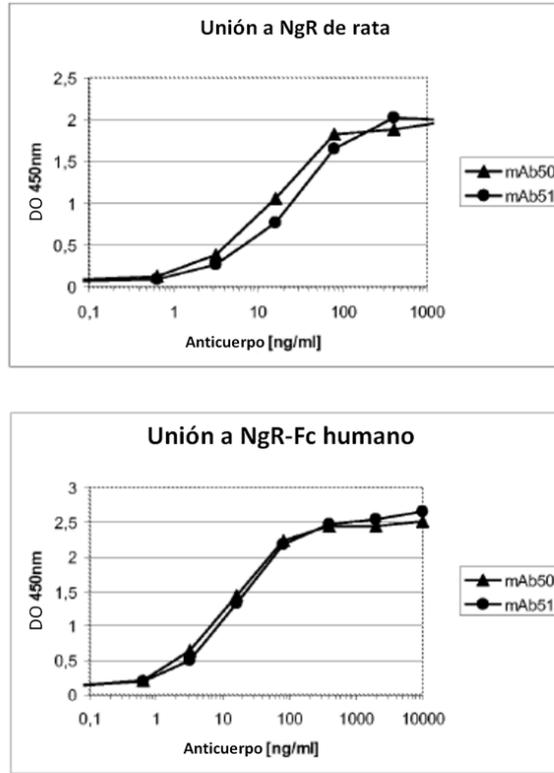


FIGURA 2

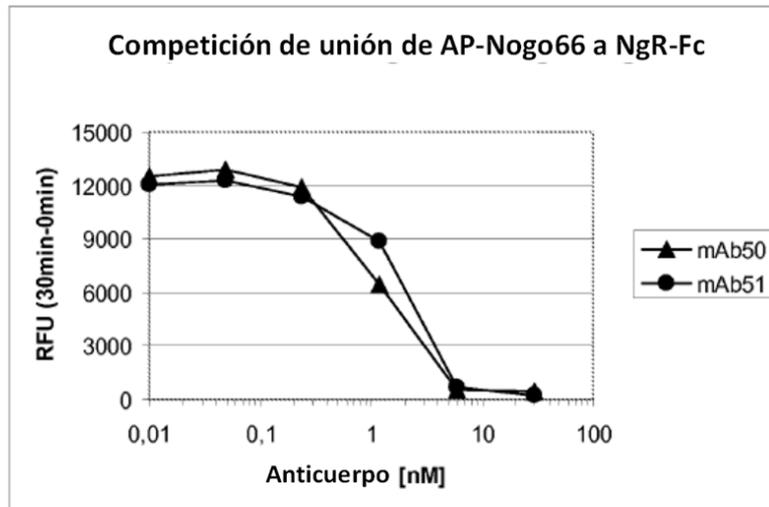
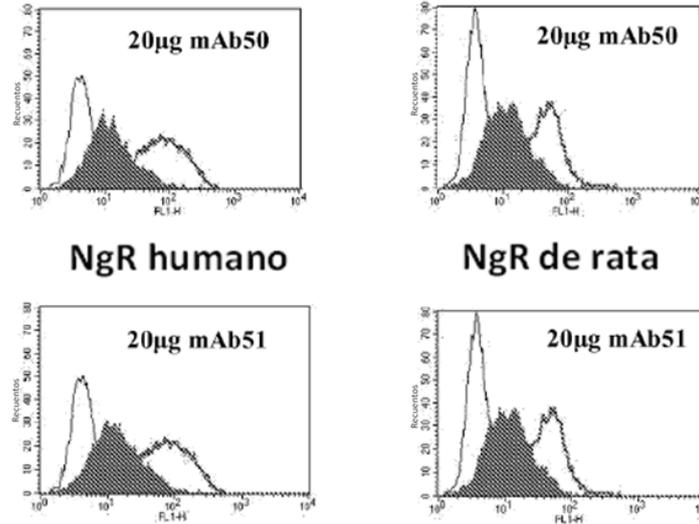


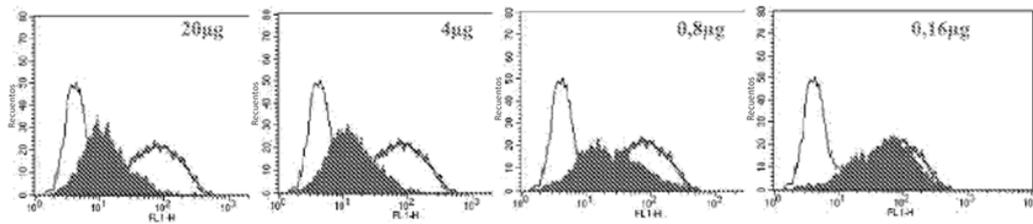
FIGURA 3

A. Competición con la unión de AP-Nogo66 a células HEK293f que expresan NgR recombinante humano y de rata, respectivamente

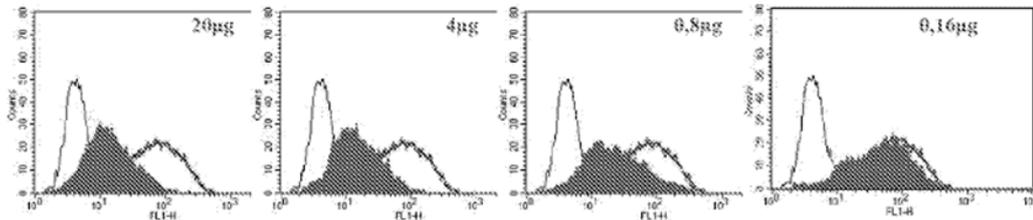


B. Competición con la unión de AP-Nogo66 a células HEK293f que expresan NgR recombinante humano

mAb50: Competición de AP-Nogo66 (1 µg) para NgR humano en células HEK293f



mAb51: Competición de AP-Nogo66 (1 µg) para NgR humano en células HEK293f



Resumen de la Tabla: Los valores indican una competición del 50% de AP-Nogo66 por la unión a células HEK293f que expresan NgR recombinante humano

FIGURA 4

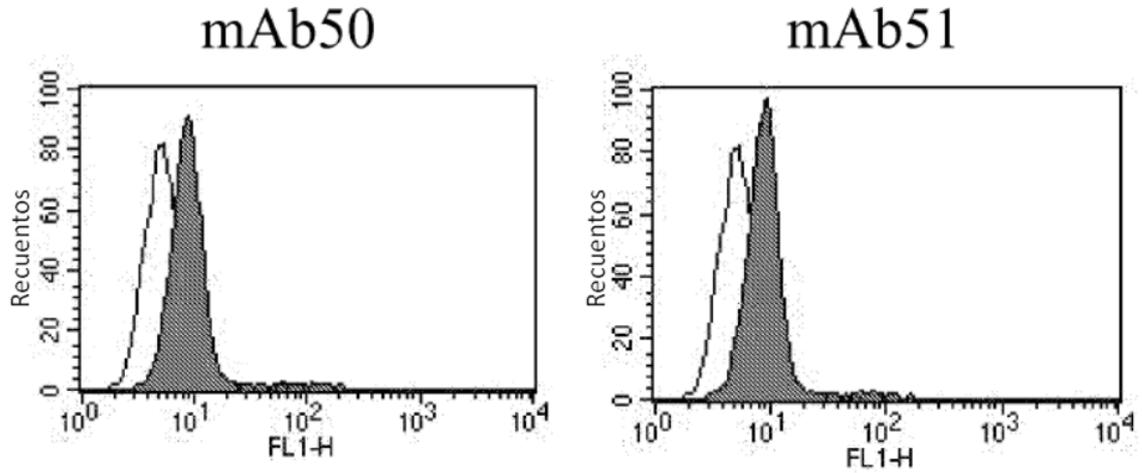


FIGURA 5

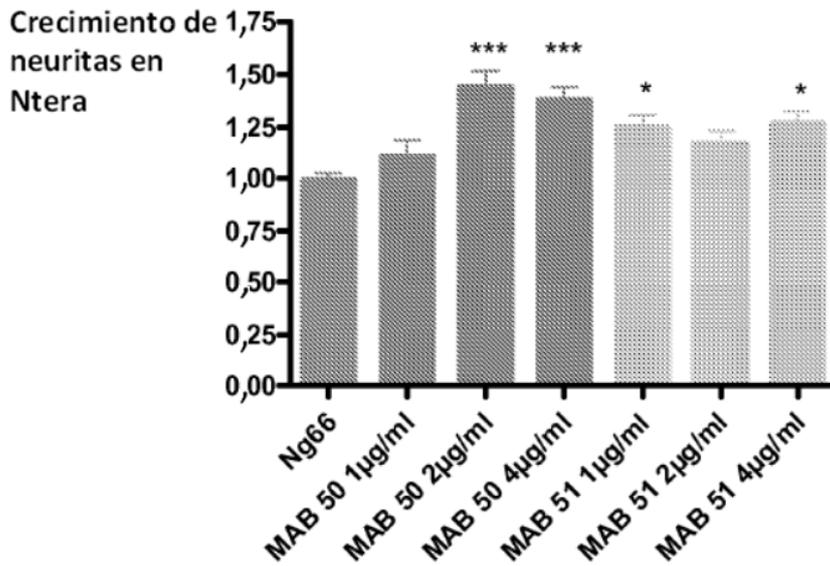
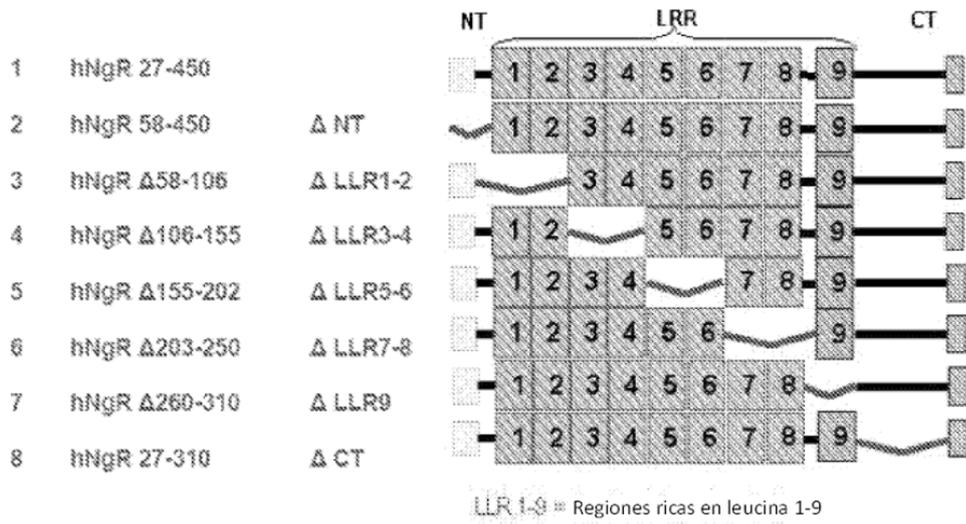


FIGURA 6



Las eliminaciones se simbolizan con un símbolo "Δ"

FIGURA 7

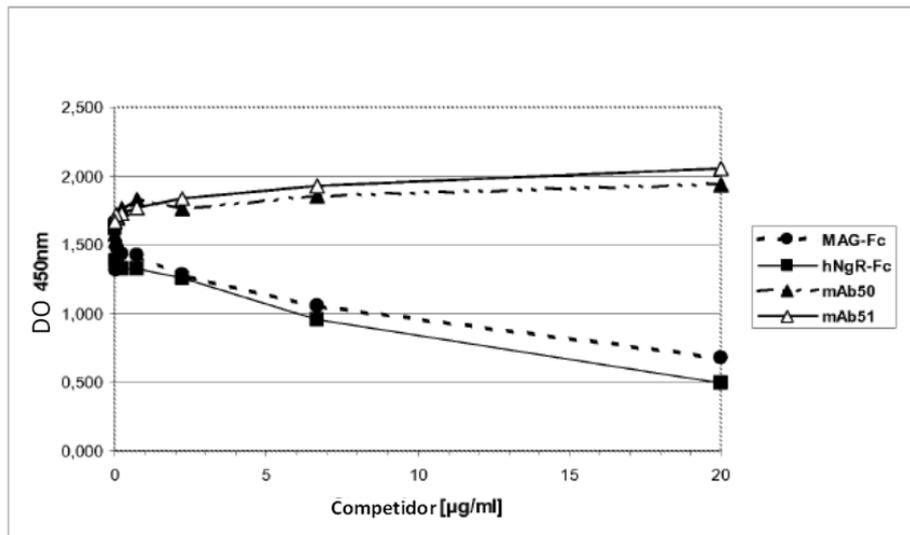


FIGURA 8

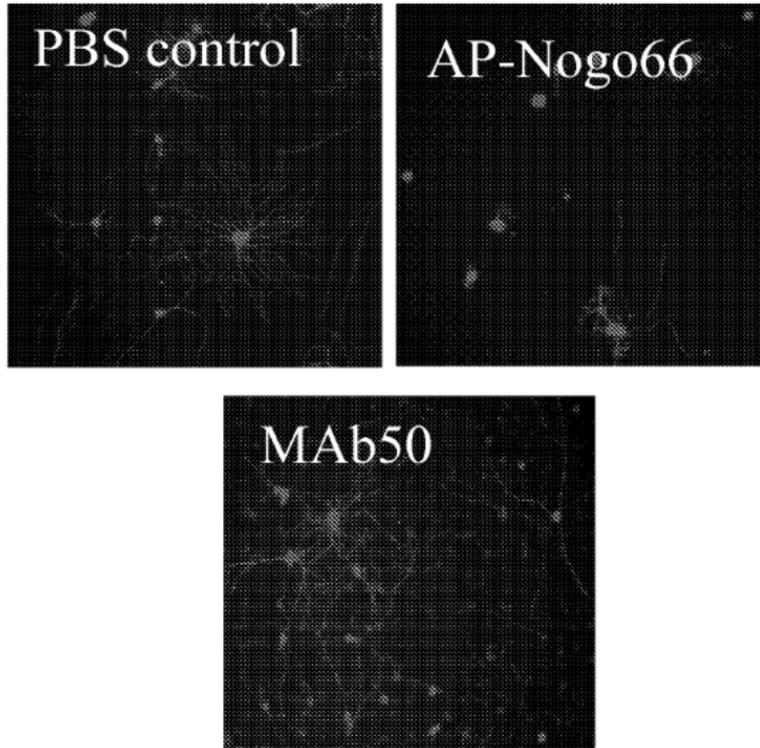


FIGURA 9

