

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 100**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2011 PCT/US2011/001773**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2012 WO12054077**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2011 E 11834753 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2629795**

54 Título: **Anticuerpos humanos y diagnósticos y usos terapéuticos de los mismos para el tratamiento de la enfermedad neurológica**

30 Prioridad:

19.10.2010 US 455363 P

13.10.2011 US 201161546634 P

21.09.2011 US 201161537392 P

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

05.04.2018

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.0%)
200 First Street S.W.
Rochester, MN 55905, US**

72 Inventor/es:

**RODRIGUEZ, MOSES;
WARRINGTON, ARTHUR E. y
PEASE, LARRY R.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 662 100 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).

Anticuerpos humanos y diagnósticos y usos terapéuticos de los mismos para el tratamiento de la enfermedad neurológica

Descripción

5

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a anticuerpos, anticuerpos naturales humanos particularmente anticuerpos recombinantes derivados de los mismos y fragmentos de los mismos, que son capaces de unirse a y reconocer las neuronas en el SNC y provocar respuestas en las neuronas del SNC. Estos anticuerpos son útiles en el diagnóstico y tratamiento de afecciones asociadas con daños en los nervios, lesiones o degeneración, enfermedades neurodegenerativas, lesiones o daños crónicos en los nervios y lesiones o daños repentinos a los nervios. Los anticuerpos, regiones variables o secuencias de dominio CDR de los mismos, y fragmentos de los mismos de la presente invención también pueden usarse en terapia en combinación con agentes quimioterapéuticos, inmunomoduladores o agentes neuroactivos y/o con otros anticuerpos o fragmentos de los mismos. Esta invención se refiere en general a la modulación del crecimiento neural en el sistema nervioso central, y más particularmente a los métodos y agentes asociados, construcciones y composiciones para mejorar el crecimiento neuronal del SNC.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La neuroregeneración se refiere a la regeneración o reparación de tejidos, células o productos celulares nerviosos. Dichos mecanismos pueden incluir remielinización, generación de nuevas neuronas, glía, axones, mielina o sinapsis. La neuroregeneración difiere entre el Sistema Nervioso Periférico (SNP) y el Sistema Nervioso Central (SNC) tanto por los mecanismos funcionales involucrados como por el alcance y la velocidad de la regeneración.

[0003] La regeneración de Axon en el sistema nervioso central de mamífero maduro (SNC) es muy limitada después de la lesión. En consecuencia, los déficits funcionales persisten después de la lesión de la médula espinal (LME), lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular y las afecciones relacionadas que implican la desconexión axonal. Esta situación difiere de la del sistema nervioso periférico de mamíferos (PNS), donde la regeneración axonal a larga distancia y la recuperación funcional sustancial pueden ocurrir en el adulto. Tanto las moléculas extracelulares como la capacidad de crecimiento intrínseca de la neurona influyen en el éxito regenerativo.

[0004] El sistema nervioso central (SNC), los axones no se regeneran de forma espontánea después de una lesión en los mamíferos adultos. Por el contrario, los axones del sistema nervioso periférico (SNP) se regeneran fácilmente, lo que permite la recuperación de la función después del daño del nervio periférico. Aguayo y sus colegas demostraron que al menos algunas neuronas maduras del SNC conservan la capacidad de regenerarse cuando se les proporciona un injerto de nervio periférico permisivo (Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ (1980) Nature 284: 264-265; Richardson PM, Issa VM, Aguayo AJ (1984) J Neurocytol 13: 165 - 182; David S, Aguayo AJ (1981) Science 214: 931 - 933; Benfey M, Aguayo AJ (1982) Nature 296: 150 - 152). Este trabajo sugirió que el entorno de SNP es estimulante y/o que el entorno del SNC inhibe el crecimiento de axones. Estudios posteriores identificaron factores promotores del crecimiento en el SNP y factores inhibidores del crecimiento en el SNC. Los inhibidores de la regeneración incluyen proteínas específicas en la mielina del SNC y moléculas asociadas con la cicatriz astrogliar. Además, un aclaramiento de residuos más lento en el sistema nervioso central con respecto al SNP puede impedir el crecimiento axonal. La comprensión de los factores que influyen en el crecimiento del axón es fundamental para el desarrollo de terapias para promover la regeneración del SNC.

[0005] Después de la lesión del nervio periférico, los axones se regeneran fácilmente. La porción distal del axón, que está desconectada del cuerpo celular, sufre degeneración walleriana. Este proceso activo da como resultado la fragmentación y la desintegración del axón. Los restos son eliminados por las células gliales, predominantemente macrófagos. Los axones proximales pueden regenerar y re-inervar sus objetivos, permitiendo la recuperación de la función.

[0006] Las dos clases principales de inhibidores de la regeneración del SNC son los inhibidores asociados a la mielina (MAIS) y los proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPGs). Estas moléculas limitan la regeneración del axón y, al interferir con su función, se logra cierto grado de crecimiento en el sistema nervioso central del adulto. Los factores autónomos celulares también son determinantes importantes de la falla de regeneración del SNC. Las neuronas del SNC no regulan al alza los genes asociados al crecimiento en la misma medida que las neuronas del SNP. En consecuencia, su capacidad de regeneración es limitada incluso en ausencia de inhibidores. El aumento de la capacidad de crecimiento intrínseco de las neuronas permite una moderada regeneración de axones dentro del SNC (Bomze HM y col. (2001) Nat Neurosci 4: 38-43; Neumann S, Woolf CJ (1999) Neuron 23: 83-91).

[0007] Los MAI son proteínas expresadas por oligodendrocitos como componentes de la mielina del SNC. Los MAI deterioran el crecimiento de neuritas in vitro y se cree que limitan el crecimiento de axones in vivo después del daño al SNC. Los MAI incluyen Nogo-A (Chen EM y col. (2000) Nature 403: 434-439; GrandPre T y col. (2000) Nature 403: 439-44), glicoproteína asociada a mielina (MAG) (McKerracher L y cols. (1994) Neuron 13: 805-811), glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (OMgp) (Kottis V y col. (2002) J Neurochem 82: 1566-1569), ephrin-B3

(Benson MD y col. (2005) Proc Nat Acad. LME. EE.UU. 102: 10694 -10699) y Semaforina 4D (Sema4D) (Moreau-Fauvarque C y col. (2003) J Neurosci 23: 9229-9239). Tres de estos (Nogo-A, MAG y OMgp) interactúan con un receptor neuronal Nogo-66 1 (NgR1) para limitar el crecimiento de axones. Estos tres ligandos estructuralmente no relacionados también muestran afinidad por un segundo receptor inhibitor del crecimiento de axones, receptor emparejado tipo B de inmunoglobulina (PirB) (Atwal JK y col. (2008) Science 322: 967 - 970).

[0008] Se han identificado varias moléculas de reconocimiento que actúan como señales moleculares bajo promoción y/o inhibición del crecimiento de neuritas subyacente. Entre las moléculas de reconocimiento de promoción de neuritas, la molécula de adhesión L1 de las células la juega un papel destacado en la mediación del crecimiento de neuritas (Schachner M (1990) Seminars in the Neurosciences 2: 497-507). El crecimiento de neuritas dependiente de L1 está mediado por la interacción homófila. L1 potencia la excrecencia de neuritas en neuritas que expresan L1 y células de Schwann, y fibroblastos transfectados en L1 (Bixby et al (1982) Proc Natl Acad. LME. EE.UU. 84: 2555-2559; Chang et al (1987) J Cell Biol 104: 355-362 Lagenaur y otros (1987) Proc Natl Acad. LME. EE.UU. 84: 7753 - 7757; Seilheimer y col. (1988) J Cell Biol 107: 341 - 351; Kadmon y col. (1990) J Cell Biol 110: 193 - 208; Williams et al (1992) J Cell Biol 119: 883 - 892).

[0009] Las lesiones del sistema nervioso afectan a más de 90.000 personas cada año, y un número mucho mayor cuando se incluyen eventos cerebrovasculares tales como apoplejía. Se estima que las lesiones de la médula espinal por sí solas afectan a 10.000 cada año. Como resultado de esta alta incidencia de lesiones neurológicas, la regeneración y reparación de nervios, un subcampo de la ingeniería de tejidos neurales, se está convirtiendo en un campo en rápido crecimiento dedicado al descubrimiento de nuevas formas de recuperar la funcionalidad nerviosa después de una lesión. El sistema nervioso se divide en dos partes: el sistema nervioso central, que consiste en el cerebro y la médula espinal, y el sistema nervioso periférico, que consiste en nervios craneales y espinales junto con sus ganglios asociados. Si bien el sistema nervioso periférico tiene una capacidad intrínseca de reparación y regeneración, el sistema nervioso central tiene, de forma comparativa y en su mayor parte, restringida su capacidad de autorreparación y regeneración. Actualmente no existe un tratamiento aceptado y aprobado para recuperar la función del nervio humano después de una lesión en el sistema nervioso central.

[0010] La protección y reparación del axón después de una lesión de la médula espinal (LME) tienen un gran potencial como una estrategia efectiva para prevenir la pérdida de la neurona motora y la discapacidad permanente. La protección de neuronas se ha logrado utilizando factores tróficos específicos para prevenir daños y promover la reparación de axones después de una lesión. Estas moléculas se identificaron predominantemente usando estrategias de selección basadas en sistemas *in vitro* que se centraron en seleccionar factores neurotróficos de molécula pequeña específicos. Mientras que estas moléculas demostraron resultados neuroprotectores en modelos preclínicos, los resultados de los ensayos clínicos han sido menos favorables.

[0011] Los anticuerpos monoclonales autorreactivos naturales han demostrado funciones biológicas beneficiosos en las células del SNC usando múltiples modelos de lesión y la enfermedad. La promoción mediada por anticuerpos de la supervivencia neuronal, la regeneración axonal y la recuperación funcional se ha demostrado *in vivo* usando la IgM monoclonal de ratón, IN-1 (Bregman BS y col. (1995) Nature 378 (6556): 498-501; Caroni P, Schwab ME (1988) Neuron 1 (1): 85 - 96). Se obtuvieron resultados similares usando la inmunización del homogenato de la médula espinal (SCH) antes del daño en el SNC (Ellezam B, Bertrand J, Dergham P, McKerracher L (2003) Neurobiol Dis 12 (1): 1-10; Huang DW et al (1999) Neuron 24 (3): 639 - 647).

[0012] La esclerosis múltiple (EM) es un sistema nervioso central (SNC) crónico, frecuentemente progresivo, inflamatorio, caracterizado patológicamente por desmielinización primaria, habitualmente sin daño axonal inicial. La etiología y la patogénesis de la EM son desconocidas. Varias características inmunológicas de la esclerosis múltiple y su asociación moderada con ciertos alelos complejos de histocompatibilidad mayor, han llevado a la especulación de que la esclerosis múltiple es una enfermedad mediada por el sistema inmune. Una hipótesis autoinmune está respaldada por el modelo experimental de encefalomiелitis (EAE) autoinmune (alérgica), donde la inyección de ciertos componentes de mielina en animales genéticamente susceptibles conduce a la desmielinización del SNC mediada por células T. Sin embargo, los autoantígenos específicos y las células T reactivas a la mielina patógenas no se han identificado definitivamente en el SNC de los pacientes con EM, ni la EM está asociada con otras enfermedades autoinmunes. Una hipótesis alternativa, basada en datos epidemiológicos, es que un factor ambiental, tal vez un virus no identificado, precipita una respuesta inflamatoria en el SNC, lo que conduce a la destrucción directa o indirecta (mielógena) de la mielina, potencialmente con un componente autoinmune inducido. Esta hipótesis está respaldada por la evidencia de que varias infecciones virales naturales, tanto en humanos como en animales, pueden causar desmielinización. Un modelo viral experimental comúnmente utilizado está inducido por el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV) (Dal Canto, MC, y Lipton, HL, Am. J. Path., 88: 497-500 (1977)).

[0013] La eficacia limitada de las terapias actuales para EM y otras enfermedades desmielinizantes o neurodegenerativas ha estimulado interés en nuevas terapias para mejorar estas enfermedades. Sin embargo, debido a la etiopatogenia aparentemente compleja de estas enfermedades, que potencialmente involucra factores tanto ambientales como autoinmunes, aún existe la necesidad de un tratamiento efectivo de estos desórdenes desmielinizantes.

[0014] En el caso de la EM, la desmielinización en última instancia resulta en la muerte de las células nerviosas. Sin embargo, la muerte del axón después de la desmielinización no es inmediata. Si se proporcionan moléculas o células de soporte apropiadas, el sistema nervioso tiene una capacidad significativa de reparación. Proteger los axones del SNC promete ser una estrategia efectiva para limitar la pérdida de axones supervivientes y prevenir la discapacidad permanente. La neuroprotección se puede lograr modulando el entorno inflamatorio potencialmente neurotóxico en las lesiones. Los reactivos diseñados para limitar la excitotoxicidad, inhibir el óxido nítrico o bloquear los canales iónicos se están estudiando como métodos para proteger a los axones en peligro (Pitt, D., P. Werner y CS Raine (2000) Nat Med 6: 67-70; Okuda, Y y col. (1997) Journal of neuroimmunology 73: 107 - 116; Waxman, SG (2002). J Rehabil Res Dev 39: 233 - 242). Muchos de estos reactivos son moléculas pequeñas con toxicidad demostrada y actúan sistémicamente en todas las células.

[0015] Autoanticuerpos monoclonales humanos han sido identificados que presentan actividad en el sistema nervioso central, y que se asocia particularmente con la estimulación de la remielinización. Sería deseable identificar, caracterizar y desarrollar anticuerpos monoclonales humanos con actividad en el SNC, particularmente anticuerpos recombinantes con estas actividades, y con la capacidad de promover la regeneración neuronal y/o proteger a las neuronas de enfermedades, lesiones, daños y/o muerte. La presente invención se dirige hacia el logro de ese objetivo.

[0016] Rodriguez et al. (2009) Neurology 72: 1269-1276 describe autoanticuerpos naturales humanos en el tratamiento de enfermedad neurológica. Warrington y otros (2004) Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 63 (5): 461-473 describe que los anticuerpos monoclonales humanos que se unen a neuronas soportan la extensión de neuritas del sistema nervioso central. El documento WO 2006/004988 describe el anticuerpo que se une a B7-DC. El documento US 2009/274690 describe anticuerpos IgM humanos, y usos diagnósticos y terapéuticos de los mismos, particularmente en el sistema nervioso central. Wright et al. (2009) Arch Neurobiol. 66: 1456-9 describe mecanismos celulares de reparación del sistema nervioso central por anticuerpos monoclonales autorreactivos naturales.

[0017] La cita de referencias en el presente documento no se interpretará como una admisión de que tal es técnica anterior a la presente invención.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0018] La invención proporciona un anticuerpo IgM humano aislado o fragmento del mismo que se une específicamente a neuronas y protege a las neuronas de la muerte celular y que no promueve la remielinización, en la que el anticuerpo o fragmento comprende la variable de aminoácidos de cadena pesada de secuencias de dominio CDR CDR1 GGSVSLYY (SEQ ID NO: 31), CDR2 GYIYSSGST (SEQ ID NO: 32) y CDR3 ARSASIRGWFD (SEQ ID NO: 33), y las secuencias CDR de cadena ligera CDR1 QSISSY (SEQ ID NO: 34), CDR2 AAS (SEQ ID NO: 35) y CDR3 QQSYHTPW (SEQ ID NO: 36), para uso en el tratamiento o mejora de una enfermedad o afección en un mamífero en el que los nervios están comprometidos, lesionados o están en riesgo, en el que dicha enfermedad o afección se selecciona de: lesión de la médula espinal (LME), lesión cerebral traumática (LCT), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM) y enfermedad de Alzheimer.

[0019] La invención proporciona además un kit para uso en el tratamiento o mejora de lesión de la médula espinal (LME), lesión cerebral traumática (LCT), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM) y la enfermedad de Alzheimer en un sujeto animal, que comprende una forma de dosificación farmacéutica de un anticuerpo IgM humano aislado o fragmento del mismo que se une específicamente a neuronas y protege a las neuronas de muerte celular y que no promueve la remielinización, donde el anticuerpo o fragmento comprende las secuencias de dominio de CDR de aminoácidos de cadena pesada CDR1 GGSVSLYY (SEQ ID NO: 31), CDR2 GYIYSSGST (SEQ ID NO: 32) y CDR3 ARSASIRGWFD (SEQ ID NO: 33), y secuencias CDR de cadena ligera CDR1 QSISSY (SEQ ID NO: 34), CDR2 AAS (SEQ ID NO: 35) y CDR3 QQSYHTPW (SEQ ID NO: 36), y una forma de dosificación farmacéutica separada que comprende uno o más agentes neuroactivos adicionales o agente terapéutico, antiinflamatorio, agente modulador de la liberación de neurotransmisores, ligando de neuroreceptores o agonista o antagonista, agente de canal calcio, modulador inmune u otro anticuerpo reactivo del SNC.

[0020] La invención se refiere a agentes neuromoduladores con especial eficacia en el SNC, cuyos agentes comprenden un material seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo del subtipo IgM, fragmentos activos de los mismos, monómeros de los mismos, agonistas de los mismos y combinaciones de los mismos. Los agentes neuromoduladores o anticuerpos de la invención tienen una o más de las siguientes características: protegen y/o estabilizan las neuronas; se dirigen a sitios en el SNC o daño, compromiso o lesión de las células nerviosas; reducen o bloquean la muerte celular, por ejemplo, muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno.

[0021] La invención proporciona neurona de unión a anticuerpos monoclonales con la capacidad para promover la extensión de neuritas, para actuar en neuroregeneración, y/o para proteger las neuronas del daño para los propósitos de diagnóstico y terapéuticos en el sistema nervioso central. En particular, se proporcionan anticuerpos recombinantes específicos, en los que dichos anticuerpos reconocen y son capaces de unirse a neuronas, que incluyen neuronas corticales, neuronas hipocámpales, células granulares cerebelares y células ganglionares de la

retina. En este documento se proporcionan anticuerpos recombinantes completamente humanos. Los anticuerpos de la presente invención tienen un uso diagnóstico y terapéutico en afecciones o enfermedades asociadas con compromiso nervioso, daño o lesión.

5 **[0022]** En un aspecto general, la presente memoria describe anticuerpos dirigidos contra y capaz de unirse uno o más epítomos sobre las neuronas, incluyendo neuronas corticales, las neuronas del hipocampo, las células granulares de cerebelo y células ganglionares de la retina. En un aspecto amplio, en el presente documento se describe un miembro de unión específico aislado, particularmente un anticuerpo o fragmento del mismo, que incluye un anticuerpo humano recombinante, que reconoce, se une y/o se dirige a neuronas. Aquí se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo humano, particularmente un anticuerpo IgM, que se une específicamente a las neuronas y protege a las neuronas de la muerte celular y que no promueve la remielinización. El anticuerpo tiene uso en el tratamiento o la mejora de enfermedades o afecciones en mamíferos en los que los nervios están comprometidos, lesionados o están en riesgo, incluso en lesión de la médula espinal (LME), lesión cerebral traumática (LCT), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Alzheimer, apoplejía, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, anoxia prenatal/isquemia perinatal, parálisis cerebral, encefalopatía, mielopatía o enfermedades de las neuronas motoras, y particularmente en la protección, supervivencia o mantenimiento de neuronas y capacidad neurológica en estas enfermedades. En un aspecto particular, en el presente documento se describe un anticuerpo o fragmento del mismo, que es el anticuerpo 12 ó 42, particularmente el IgM12 o IgM42 recombinante o derivado del suero.

20 **[0023]** Se describe aquí un anticuerpo de unión a neurona recombinante o sintético que comprende las secuencias de CDR de región variable expuestas en la Figura 5 y/o 6. El anticuerpo 12 comprende secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 GGSVSLYY (SEQ ID NO: 31), CDR2 GYIYSSGST (SEQ ID NO: 32) y CDR3 ARSASIRGWFD (SEQ ID NO: 33), y las secuencias CDR de cadena ligera CDR1 QSISSY (SEQ ID NO: 34), CDR2 AAS (SEQ ID NO: 35) y CDR3 QQSYHTPW (SEQ ID NO: 36), como se establece en la Figura 5. El anticuerpo 42 comprende secuencias CDR de cadena pesada CDR1 GFTFSTYA (SEQ ID NO: 37), INVGGVTT CDR2 (SEQ ID NO: 38) y CDR3 VRRSGPDRNSSPADF (SEQ ID NO: 39) y secuencias CDR de cadena ligera CDR1 QGIG (SEQ ID NO: 40), CDR2 TTS (SEQ ID NO: 41) y CDR3 QKYNSAPRT (SEQ ID NO: 42), como se establece en la Figura 6. Por consiguiente, los anticuerpos recombinantes que se basan en las CDR del/de los anticuerpo(s) identificados en este documento serán útiles para dirigir y proteger neuronas, particularmente neuronas susceptibles, comprometidas, dañadas o lesionadas en enfermedades o en cánceres.

35 **[0024]** La invención proporciona de este modo el anticuerpo aislado humano IgM(s) o fragmento(s) del mismo que se une específicamente a las neuronas y protege a las neuronas de la muerte celular y que no promueve la remielinización, en que el anticuerpo o fragmento comprende: (a) las secuencias de dominio CDR de aminoácidos de cadena pesada variable CDR1 GGSVSLYY (SEQ ID NO: 31), CDR2 GYIYSSGST (SEQ ID NO: 32) y CDR3 ARSASIRGWFD (SEQ ID NO: 33), y secuencias CDR de cadena ligera CDR1 QSISSY (SEQ ID NO: 34), CDR2 AAS (SEQ ID NO: 35) y CDR3 QQSYHTPW (SEQ ID NO: 36), tal como se establece en la Figura 5 para uso en el tratamiento o la mejora de enfermedades o afecciones en mamíferos donde los nervios están comprometidos, lesionados o dañados o en riesgo, en donde dicha enfermedad o afección se selecciona de: lesión de la médula espinal (LME), lesión cerebral traumática (LCT), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM) y enfermedad de Alzheimer.

45 **[0025]** En un aspecto particular adicional, el anticuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 12 incluyendo lo señalado en la Figura 5. Anticuerpo recombinante IgM12 de la presente invención comprende la secuencia de cadena pesada variable (SEQ ID NO: 1) y secuencia de cadena ligera (SEQ ID NO: 11) como se expone en la Figura 5. El anticuerpo IgM42 recombinante de la presente descripción comprende la secuencia de cadena pesada variable (SEQ ID NO: 17) y la secuencia de cadena ligera (SEQ ID NO: 27) como se ha expuesto en la Figura 6. En un aspecto particular de la invención, los anticuerpos recombinantes son anticuerpos recombinantes completamente humanos, que comprenden la región variable de la cadena pesada humana, la región constante y la cadena J humana. Se proporcionan anticuerpos IgM12 recombinantes completamente humanos que comprenden cadena pesada de inmunoglobulina humana que comprende la región variable (SEQ ID NO: 1), o sus CDR, una región constante humana, particularmente una secuencia kappa (SEQ ID NO: 3, 5, 7 y 9) y cadena J humana (SEQ ID NO: 15) como se expone en la Figura 5.

55 **[0026]** En un aspecto adicional, la presente memoria describe un anticuerpo aislado o fragmento del mismo capaz de unirse a un antígeno, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende un dominio de unión a polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se establece en el presente documento y en la Figura 6. En este documento se describe un anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo capaz de unirse a neuronas, donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 17), o las CDR de la misma, y región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 27), o la CDRS de la misma, o que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se establece aquí y en la Figura 6.

65 **[0027]** En un aspecto adicional, la presente memoria se da a conocer un anticuerpo completamente humano aislado o un fragmento del mismo capaz de unirse a un antígeno, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo

comprende un dominio de unión a polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se establece en el presente documento y en la Figura 5. En este documento se describe un anticuerpo completamente humano aislado o fragmento del mismo capaz de unirse a neuronas, donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 1) o las CDR de la misma y región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 11), o sus CDR, o que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se expone aquí y en la Figura 5. Aquí se describe un anticuerpo IgM humano aislado o fragmento activo del mismo, que comprende las secuencias CDR1 del dominio CDR de aminoácidos de cadena pesada variable. GGSVSLYY (SEQ ID NO: 31), CDR2 GYIYSSGST (SEQ ID NO: 32) y CDR3 ARSASIRGWFD (SEQ ID NO: 33), y secuencias CDR de cadena ligera CDR1 QSISSY (SEQ ID NO: 34), CDR2 AAS (SEQ ID NO: 35) una CDR3 QQSYHTPW (SEQ ID NO: 36), como se expone en la Figura 5. En un aspecto particular, en el presente documento se describe un anticuerpo IgM recombinante completamente humano o fragmento activo del mismo, que comprende las secuencias de dominio CDR de aminoácidos de cadena pesada CDR1 GGSVSLYY (SEQ ID NO: 31), CDR2 GYIYSSGST (SEQ ID NO: 32) y CDR3 ARSASIRGWFD (SEQ ID NO: 33), y secuencias CDR de cadena ligera CDR1 QSISSY (SEQ ID NO: 34), CDR2 AAS (SEQ ID NO: 35) y CDR3 QQSYHTPW (SEQ ID NO: 36), una región constante humana y una secuencia de cadena J humana como se expone en SEQ ID NO: 15.

[0028] En aspectos adicionales, el presente documento da a conocer un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido o anticuerpo de unión a neurona como se define anteriormente, y métodos de preparación de polipéptidos o anticuerpos que comprenden la expresión de dichos ácidos nucleicos en condiciones para llevar a cabo la expresión de dicho polipéptido o anticuerpo, y la recuperación del polipéptido o anticuerpo. En uno de tales aspectos, se proporciona un ácido nucleico que codifica una secuencia de la región variable del anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos expuestas en las Figuras 5 o 6 o se describe un anticuerpo que tiene secuencias del dominio CDR como se expone en las Figuras 5 o 6. En un aspecto, se proporciona un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de la Figura 5 o 6. En un aspecto adicional, se proporciona una región variable de cadena pesada VH o un ácido nucleico que codifica VL de región variable de cadena ligera como se establece en la Figura 5 o 6. La presente descripción también se refiere a una molécula de ADN recombinante o un gen clonado, o una variante degenerada del mismo, que codifica un anticuerpo; preferiblemente una molécula de ácido nucleico, en particular una molécula de ADN recombinante o gen clonado, que codifica el anticuerpo VH y VL, particularmente las secuencias de la región CDR, que tiene una secuencia o es capaz de codificar una secuencia mostrada en la Figura 5 o 6. Aquí se describe un ácido nucleico que codifica la secuencia de la cadena pesada (SEQ ID NO: 2) y de la región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO: 12) de IgM12 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera que codifica el ácido nucleico (SEQ ID NO: 18) (SEQ ID NO: 28) de IgM42. En la presente se describe un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende las secuencias del dominio de CDR de aminoácidos de cadena pesada variables CDR1 GGSVSLYY (SEQ ID NO: 31), CDR2 GIISYSGST (SEQ ID NO: 32) y CDR3 ARSASIRGWFD (SEQ ID NO: 33), y secuencias de CDR de cadena ligera CDR1 QSISSY (SEQ ID NO: 34), CDR2 AAS (SEQ ID NO: 35) y CDR3 QQSYHTPW (SEQ ID NO: 36). En un aspecto adicional, el ácido nucleico codifica adicionalmente una región constante humana y una cadena J humana, particularmente la cadena J de SEQ ID NO: 15. Se describe un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende las secuencias del dominio CDR de aminoácidos de cadena pesada variable CDR1 GFT-FSTYA (SEQ ID NO: 37), INVGGVTT CDR2 (SEQ ID NO: 38) y CDR3 VRRSGPDRNSSPADF (SEQ ID NO: 39) y secuencias CDR de cadena ligera CDR1 QGIG (SEQ ID NO: 40), CDR2 TTS (SEQ ID NO: 41) y CDR3 QKYNSAPRT (SEQ ID NO: 42). En un aspecto adicional, el ácido nucleico codifica adicionalmente una región constante humana y una cadena J humana, particularmente la cadena J de la SEQ ID NO: 15.

[0029] Los anticuerpos, fragmentos de los mismos y anticuerpos recombinantes que comprenden las secuencias de región variable de acuerdo con la divulgación se pueden usar en un método de tratamiento, prevención o diagnóstico del cuerpo humano o animal, tal como un método de neuroprotección en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de los anticuerpos, fragmentos de los mismos y anticuerpos recombinantes. Los anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos que comprenden las secuencias de la región de dominio CDR según la descripción pueden usarse en un método de neuroprotección en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de los anticuerpos, fragmentos de los mismos y anticuerpos recombinantes.

[0030] Los agentes de la descripción, en particular los anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos se pueden usar como agentes neuroprotectores en métodos para la prevención, tratamiento o mejora de lesión del nervio, daño o compromiso y complicaciones que pueden, o resultan en daño en el SNC. Los métodos de tratamiento o prevención son aplicables cuando la pérdida de estructura, función o supervivencia de las neuronas está involucrada o asociada, incluyendo lesión o trauma cerebral, lesión de la médula espinal (LME), lesión nerviosa, lesión en la cabeza, condiciones donde se reduce o compromete el suministro de sangre al cerebro o enfermedades infecciosas del cerebro, enfermedades neurodegenerativas. Ejemplos de tales enfermedades o condiciones para el tratamiento, prevención o mejora incluyen lesión de la médula espinal (LME), lesión cerebral traumática (LCT), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, anoxia prenatal/isquemia perinatal y/o parálisis cerebral, encefalopatía, mielopatía y enfermedades de las neuronas motoras. La presente descripción se refiere por lo tanto a métodos para tratar o mejorar enfermedades o afecciones en mamíferos donde los nervios están comprometidos,

lesionados o escenarios donde los nervios o neuronas son susceptibles o en riesgo de compromiso, lesión o daño que comprende administrar un anticuerpo recombinante o completamente humano o fragmento del mismo seleccionado de IgM12 e IgM42.

- 5 **[0031]** Los anticuerpos, fragmentos de los mismos y anticuerpos recombinantes que comprenden las secuencias de región variable de acuerdo con la divulgación, pueden ser utilizados en métodos o se administran en composiciones para la mejora o la estabilización de la función neurológica o de la función motora en los casos, enfermedades o condiciones en las que los nervios están comprometidos, lesionados o dañados o escenarios donde los nervios o las neuronas son susceptibles o en riesgo de compromiso, lesión o daño. En un aspecto particular, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se utilizan o se administran en etapas tempranas o iniciales de una enfermedad o afección, o se repiten a lo largo del curso o duración de una enfermedad o afección, para facilitar o mantener la mejora o la estabilización de la función neurológica o la función motora, que incluye o se selecciona del movimiento, como caminar o la función cognitiva, como la recuperación o el reconocimiento.
- 10
- 15 **[0032]** Los métodos pueden comprender la administración de más de un anticuerpo o fragmento, que incluye combinaciones de anticuerpos IgM12 y 42. Se describen métodos que comprenden administrar uno o más anticuerpos o fragmentos de los mismos, donde un anticuerpo comprende (a) las secuencias de dominio de CDR de aminoácidos de cadena pesada variables CDR1 GGSVSLYY (SEQ ID NO: 31), CDR2 GYIYSSGST (SEQ ID NO: 32) y CDR3 ARSASIRGWF (SEQ ID NO: 33), y secuencias de CDR1 de cadena ligera CDSISY (SEQ ID NO: 34), CDR2 AAS (SEQ ID NO: 35) y CDR3 QQSYHTPW (SEQ ID NO: 36) o (b) las secuencias de dominio de CDR de aminoácidos de cadena pesada variables CDR1 GFTFSTYA (SEQ ID NO: 37), INVGGVTT de CDR2 (SEQ ID NO: 38) y CDR3 VRRSGPDRNSSPADF (SEQ ID NO: 39), y secuencias de CDR de cadena ligera CDR1 QGIG (SEQ ID NO: 40), CDR2 TTS (SEQ ID NO: 41) y CDR3 QKYNSAPRT (SEQ ID NO: 42). En un método adicional de este tipo, uno o más anticuerpos IgM12 y/o anticuerpos IgM42 se pueden combinar con otro anticuerpo activo del SNC, que incluye particularmente uno o más de los anticuerpos rHlgM22 y/o rHlgM46. El anticuerpo rHlgM22 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 43 y 44, o las CDR de estas SEQ ID. El anticuerpo rHlgM46 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 45 y 46, o las CDR de estas SEQ ID. Por lo tanto, uno o más anticuerpos IgM12 y/o anticuerpos IgM42 se pueden combinar con uno o más anticuerpos remielinizantes que comprenden (a) CDRs de región variable de cadena pesada que comprenden secuencia CDR1 SSGMH secuencia CDR2 V(I)ISYDGSRKYYADSVKG y secuencia CDR3 GVTGSPRLDY, y CDR de región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de CDR1 SGSSNIGNNFVS secuencia de CDR2 DITKRPS y secuencia de CDR3 G(E)TWDSLSAV V; o (b) CDRs de la región variable de la cadena pesada que comprenden secuencia CDR1 SGFTF-SSYW secuencia CDR2 IKKDGSEK y secuencia CDR3 ARPNCGGDCYLPWYFD, y secuencia CDR1 que comprende CDR de cadena ligera variable QSVLYSSNNKNY secuencia CDR2 YWAS y secuencia CDR3 QQYYNTPQA. Las combinaciones de anticuerpos se pueden administrar colectivamente o en serie, y en diversos momentos y diversas cantidades o concentraciones. Se pueden utilizar anticuerpos bi o multiespecíficos. En un aspecto particular de este tipo, el anticuerpo 12 y/o 42 se administra en combinación con el anticuerpo 22 y/o 46 y/o un anticuerpo que tiene la región CDR secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de IgM22 o IgM46, mediante administración combinada o en serie, separadas por un corto período de tiempo o por un período de tiempo más largo, incluso por horas, días o semanas. En un aspecto particular, el anticuerpo 12 y/o 42 se administra en combinación con el anticuerpo 22 y/o 46, mediante administración combinada o en serie para el tratamiento de la mejora de una enfermedad o afección que implica neurodegeneración, y que incluye particularmente desmielinización. En un aspecto adicional, el anticuerpo 12 y/o 42 se administra en combinación con el anticuerpo 22 y/o 46, mediante administración combinada o en serie para el tratamiento de la mejora de una enfermedad o condición desmielinizante. En un aspecto particular, el anticuerpo 12 y/o 42 se administra en combinación con el anticuerpo 22 y/o 46, mediante administración combinada o en serie para el tratamiento de la mejora de la esclerosis múltiple. En uno de estos aspectos, la remielinización y la neuroprotección se logran para los efectos combinados, incluidos los efectos sinérgicos, en un aspecto clínico mensurable de la enfermedad de la EM.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50 **[0033]** En vista de las capacidades neuroprotectoras y/o neurodegenerativas de los agentes de la descripción, la presente divulgación se refiere además a métodos *in vitro* de producción y estimulación de la proliferación de las neuronas, incluyendo la proliferación de las neuronas corticales, las neuronas del hipocampo, células granulares cerebelares y células ganglionares de la retina. Dichas neuronas proliferadas pueden ser adecuadas para trasplantes y protocolos y métodos terapéuticos de células nerviosas.
- 55
- 60 **[0034]** La utilidad de diagnóstico de la presente descripción se extiende al uso de los anticuerpos en los ensayos y métodos para caracterizar la lesión del nervio del SNC o daños o para detectar o evaluar la enfermedad o condiciones que implican lesiones del nervio, daños o muerte (incluyendo la muerte necrótica o apoptótica), incluidos los ensayos de diagnóstico e imagen *in vitro* e *in vivo*. En un inmunoensayo, se puede preparar y marcar una cantidad de control de los anticuerpos o similares con una enzima, una pareja de unión específica, ligando, un colorante, una etiqueta fluorescente y/o un elemento radiactivo, y luego se puede introducir en una muestra celular después de que el material etiquetado o su(s) compañero(s) de unión hayan tenido la oportunidad de reaccionar con sitios dentro de la muestra, la masa resultante puede examinarse mediante técnicas conocidas, que pueden variar según la naturaleza de la etiqueta adjunta. En una aplicación de diagnóstico o formación de imágenes *in vivo*, el anticuerpo o un fragmento de unión a la neurona del mismo se puede preparar y marcar con una enzima, una pareja de unión específica, ligando, un colorante, una etiqueta fluorescente y/o un elemento radiactivo, y puede ser
- 65

introducido en un animal. Después de que el material marcado o su(s) compañero(s) de unión hayan tenido la oportunidad de reaccionar con sitios dentro del animal, el animal puede examinarse mediante técnicas conocidas, que pueden variar según la naturaleza de la etiqueta adjunta.

5 **[0035]** Los miembros de unión específica radiomarcados, particularmente anticuerpos y fragmentos de los mismos, son útiles en técnicas de diagnóstico *in vitro* y en técnicas de obtención de radioimágenes *in vivo*. En un aspecto
10 adicional, los miembros de unión específica radiomarcados, particularmente anticuerpos y fragmentos de los mismos, particularmente radioinmunoconjugados, son útiles en radioinmunoterapia, particularmente como anticuerpos radiomarcados para la reparación de lesiones nerviosas, recuperación neurodegenerativa, cáncer o
15 terapia de tumores SNC, o alternativamente para la ablación de tejido nervioso dañado o neuronas en ciertos casos. En un aspecto *in vivo*, el anticuerpo o fragmento de unión a neurona del mismo se marca y se administra al animal antes, durante o después de la cirugía o una técnica quirúrgica, incluida una técnica estereotáxica o mínimamente invasiva, con el fin de localizar lesiones nerviosas o evaluar el resto del tejido neural dañado o lesionado. En uno de tales aspectos, los miembros de unión específica radiomarcados, particularmente anticuerpos y fragmentos de los
20 mismos, son útiles en técnicas de cirugía radioinmunogénica, en las que pueden identificar e indicar la presencia y/o localización de células nerviosas o neuronas comprometidas, dañadas, lesionadas o moribundas o tejido nervioso, antes, durante o después de la cirugía para identificar, o eliminar tales células.

20 **[0036]** Los inmunoconjugados o proteínas de fusión de anticuerpos se incluyen, en los que los miembros de unión específica, particularmente anticuerpos y fragmentos de los mismos, se conjugan o se unen a otras moléculas o agentes incluyen adicionalmente, pero no se limitan a los miembros de unión conjugados con un fármaco neuroactivo, agente de ablación química, toxina, inmunomodulador, citoquina, agente citotóxico, agente quimioterapéutico o fármaco.

25 **[0037]** En la presente memoria se da a conocer un sistema de ensayo que puede prepararse en forma de un kit de prueba para el análisis cuantitativo de la extensión de la presencia de, por ejemplo, neuronas dañadas, comprometidas o lesionadas o para cuantificar neuronas en una muestra. El sistema o kit de prueba puede comprender un componente marcado preparado por una de las técnicas radiactivas y/o enzimáticas discutidas en este documento, acoplamiento de una etiqueta al anticuerpo, y uno o más reactivos inmunológicos adicionales,
30 opcionalmente al menos uno de los cuales es un componente inmovilizado libre o su(s) compañero(s) vinculante(s).

[0038] Los anticuerpos de la presente divulgación, y, en una realización particular, anticuerpo(s) recombinante(s) que comprende(n) las secuencias de cadena pesada y/o ligera presentadas en la Figuras 5 y 6 en el presente documento, o fragmentos activos de los mismos, y de cadena única, anticuerpos recombinantes o sintéticos
35 derivados de la misma, que comprenden particularmente las secuencias de la región CDR representadas en las Figuras 5 y 6, puede prepararse en composiciones farmacéuticas, que incluyen un vehículo, portador o diluyente adecuado, para administración en casos en los que la terapia es apropiada, como tratar o mejorar afecciones o enfermedades implica compromiso neuronal, daño, lesión o muerte. Tales composiciones farmacéuticas también pueden incluir métodos para modular la vida media de los anticuerpos o fragmentos por métodos conocidos en la técnica tales como pegilación. Tales composiciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente anticuerpos
40 adicionales o agentes terapéuticos.

[0039] Se describen aquí anticuerpos y fragmentos de los mismos, que están unidos de forma covalente o asociados de otro modo con otras moléculas o agentes. Estas otras moléculas o agentes incluyen, pero no se limitan
45 a moléculas (incluyendo anticuerpos o fragmentos de anticuerpos) con características de reconocimiento distintas, toxinas, ligandos, agentes neuroactivos y agentes quimioterapéuticos. En un aspecto adicional, los anticuerpos o fragmentos pueden usarse para dirigir moléculas terapéuticas u otros agentes, por ejemplo, para dirigir moléculas o agentes a neuronas, por ejemplo a neuronas corticales, neuronas hipocámpales, células ganglionares de la retina o células granulares cerebelosas, incluyendo en sitios de heridas, sitios isquémicos, sitios tumorales, áreas inflamatorias o lesiones neurodegenerativas.
50

[0040] Otros objetos y ventajas serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a los siguientes dibujos ilustrativos, y las reivindicaciones acompañantes.
55

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0041]

60 **FIGURA 1: IgM humanas se unen a la superficie de múltiples tipos de neuronas.** sHIgM42 (A) y rHIgM12 (C) se unen a la superficie de neuronas corticales vivas que coexpresan neurofilamentos (NF) (B y D). Las células se mantuvieron en hielo durante una incubación de 10 minutos con IgM a 10 µg/ml en medios. Las células se fijaron, se lavaron, y se detectó IgM humana con un anticuerpo secundario Fab'2-FITC de la cadena mu humana. La NF interna está presente como un patrón segmentado característico. Las células corticales se cultivaron durante 6 días en medio Neurobasal B27 sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos de poliornitina. No
65 todas las neuronas corticales expresan NF todavía, pero las IgM se unen a todas las neuronas en el cultivo.

rHlgM12 (E verde) y sHlgM42 (F verde) se unen a la superficie de las neuronas del hipocampo del ratón vivo que coexpresan el neurofilamento (NF, rojo). Las neuronas hipopólicas se cultivaron durante 1 semana en medios Neurobasal B27 sobre plástico revestido con polilisina. Las células aisladas de una resección del lóbulo temporal humano se cultivaron en DMEM/F12/N2/B27 durante 21 días. rHlgM12 se unió a la superficie de las células (G) que también eran positivas para β III tubulina (F, anti- β III de Promega).

FIGURA 2. Las IgM humanas etiquetan la superficie de las células granulares del cerebelo en distintos patrones. Se incubaron células granulares de cerebelo de rata 1 día en cultivo con 10 μ g/ml de IgM derivada de suero humano, sHlgM12 o sHlgM42, en medio de cultivo durante 15 minutos en hielo. Después del lavado y la fijación con paraformaldehído al 4%, las células se incubaron a temperatura ambiente con un anticuerpo de cadena mu antihumana conjugada con FITC y se obtuvieron imágenes usando un microscopio de inmunofluorescencia. El patrón de etiqueta de la membrana neuronal que usa estos dos anticuerpos es diferente. Las áreas cortas de membrana de neurita están unidas por sHlgM12 lo que da como resultado un patrón claramente punteado. Las áreas más grandes de la membrana de neurita están unidas por sHlgM42 dando como resultado un patrón segmentado. La ampliación es 400x.

FIGURA 3. Las IgM humanas que se unen a neuronas, rHlgM12 y sHlgM42 protegen a las neuronas corticales en cultivo de la muerte celular inducida por peróxido. Neuronas de ratón a los 3 días en cultivo se trataron con 500 nM H_2O_2 o solución salina con o sin 10 μ g/ml de IgM humanos durante 30 min. Las células se lavaron con medio Neurobasal B27 reciente y 24 horas después se detectó la expresión de caspasa-3 en 96 pocillos tratados utilizando un kit de ensayo caspasa-3 FLICA (Immunochemistry Technologies 935). Las barras indican el % de protección de la activación de la caspasa 3.

FIGURA 4 representa un vector amplificable para producir anticuerpo recombinante. Este es un mapa del vector utilizado para generar anticuerpos recombinantes basados en sHlgM22 (rHlgM22), que se modificó para la producción de IgM12 e IgM42 recombinantes. Para la expresión en células CHO, el promotor VH se reemplazó con el promotor E1A. La región constante de la cadena ligera de C λ se reemplazó por una región constante de la cadena ligera kappa Ck.

FIGURA 5 representa el aminoácido del anticuerpo IgM12 y la secuencia de ácido nucleico, en el vector recombinante. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y la secuencia de ácido nucleico codificante está en gris y cada una de las secuencias de la región Vh y constante CH1, CH2, CH3 y CH4 se proporcionan e indican. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y la secuencia de ácido nucleico codificante están en púrpura y están indicadas tanto las secuencias VL variables como las constantes CL (kappa). Se observan las secuencias de la región CDR para las regiones variables de la cadena pesada y ligera. La cadena J humana está indicada en la secuencia de aminoácidos y ácidos nucleicos.

FIGURA 6 representa el aminoácido del anticuerpo IgM42 y la secuencia de ácido nucleico en el vector recombinante. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y la secuencia de ácidos nucleicos codificantes están en gris y cada una de las secuencias de la región Vh y CH1, CH2, CH3 y CH4 están proporcionadas e indicadas. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y la secuencia de ácido nucleico codificante están en púrpura y están indicadas tanto las secuencias VL variables como las constantes CL (kappa). Se observan las secuencias de la región CDR para las regiones variables de la cadena pesada y ligera.

FIGURA 7. El rHlgM12 recombinante mejora los déficits en ratones con enfermedad inducida por TMEV. La actividad nocturna espontánea media por hora (cuando los ratones están normalmente activos) se altera a las 3 semanas después de una única dosis i.p. de 100 μ g de sHlgM12. Grupos de 5 ratones SJL a los 90 días después de la infección con TMEV se trataron con rHlgM12 (barras rojas) o una IgM humana de control (barras negras) y se controlaron durante 3 días semanalmente como grupos en cajas de monitorización de actividad AccuScan. La \pm SEM media de la actividad horizontal nocturna por hora durante 3 periodos nocturnos se comparó con la actividad nocturna durante las 3 noches previas al tratamiento con IgM. Un aumento en la actividad nocturna en comparación con los niveles previos al tratamiento estuvo presente entre las 3 semanas y 7 semanas después del tratamiento con una dosis única de rHlgM12 ($P < 0,01$), pero no después del tratamiento con control. Los niveles de actividad de los ratones apareados envejecidos no infectados se representan gráficamente para comparación (barra verde).

FIGURA 8. Espectros MRS recogidos en el tallo cerebral del ratón. Los paneles superiores indican el vóxel del que se recogió la señal. El posicionamiento de esta región de interés utilizó hitos anatómicos. Se usa una exploración MRI muy corta para obtener las imágenes en tres planos ortogonales para colocar el cubo de 2,5 mm³ sobre el tallo cerebral (panel superior). Un espectro de 300MHz, 1H del tronco encefálico del ratón (panel inferior). Los picos de colina (Cho), creatina (Cr) y N-acetilo-aspartato (NAA) se identifican fácilmente. El espectro se refiere al agua a 4,7 ppm.

FIGURA 9. La disminución de los niveles de NAA en el tallo cerebral se correlaciona con el aumento de la pérdida de axones. Se estudiaron 10 ratones SJL prospectivamente de 0 a 270 días después de la infección con TMEV. La MRS se obtuvo en el tronco encefálico de cada ratón y se determinó la concentración de NAA (arriba). Se registró una disminución gradual de NAA en todos los ratones que alcanzó una caída estadísticamente significativa a los 90 días después de la infección por el virus, el punto en el que se muestra que los axones grandes se pierden por conteo directo en secciones transversales (2). Los niveles de NAA permanecieron deprimidos durante la duración de la enfermedad. Los axones absolutos se contaron (abajo) en el nivel T6 de ratones no infectados (barra negra), 90 días (gris) y 270 días (blanco) después de la infección.

FIGURA 10. NAA en el tallo cerebral después de una dosis única de IgM humanas. Grupos de 10-15 ratones SJL a los 90 días después de la infección por TMEV, el momento en que los niveles de NAA comienzan a caer y la gran pérdida de axones es detectable recibieron una única dosis de 100 μ g de sHlgM12, sHlgM42,

una IgM humana de control o solución salina (PBS) i.p. MRS en el tallo cerebral se recolectó antes y a las 5 y 10 semanas después del tratamiento. Los niveles de NAA se calcularon a partir de estos espectros. En los grupos tratados con sHlgM12 y sHlgM42, la NAA aumentó en comparación con los niveles previos al tratamiento después de 5 semanas ($P = 0,005$, $P = 0,029$) y a las 10 semanas ($P < 0,001$, $P = 0,037$). En grupos de ratones tratados con reactivos de control se establecieron o descendieron. El gráfico representa la media \pm SEM de los niveles de voxel NAA del tallo cerebral.

FIGURA 11. Las IgM humanas que se unen a las neuronas no alteran la desmielinización, la remielinización o la inflamación. Grupos de 5 ratones crónicamente infectados con TMEV se trataron con una única dosis de 100 μ g de IgM humanos. Todos los grupos contienen el mismo grado de inflamación de la médula espinal (barras negras) y desmielinización (barras rojas) a las 10 semanas después del tratamiento. Como se esperaba, los ratones tratados con la IgM de unión a oligodendrocitos, rHlgM22, mostraron una remielinización mayor (barras verdes). sHlgM12 y sHlgM42 no promueven la remielinización de la médula espinal. Esto sugiere que puede haber múltiples formas de proteger los axones in vivo.

FIGURA 12. Vida media en suero de neuronas que se unen a IgM humanas en la circulación de ratones CD-1 después de la inyección intravenosa. ELISA de sandwich se utilizó para cuantificar la descomposición de la cadena mu humana de los sueros de ratón durante más de 48 horas. La media de la OD405 del sustrato de fosfatasa alcalina (Sigma 104) obtenida de los medios. Sueros de 3 ratones por grupo y error estándar son graficados.

FIGURA 13. rHlgM12 etiquetado con ^{35}S entró en el cerebro y la médula espinal de ratones SJL infectados y no infectados con TMEV. rHlgM12 etiquetado con ^{35}S se administró i.p. a ratones SJL infectados con TMEV y no infectados ajustados por edad durante 5 meses. 4 horas más tarde se perfundió un par de ratones con solución salina, se recogieron los tejidos de forma aguda, se pesaron, se picaron con una máquina de afeitar y se mezclaron con 10 ml de fluido de centelleo (Ultima Gold LSC). Lo mismo se repitió a las 24 h. Después de 48 horas, permitiendo que el tejido se solubilizara, los viales se contaron durante 1 minuto en un contador de centelleo Beckman. Se grafican los recuentos totales de todo el cerebro y la médula espinal de cada ratón. Los recuentos de fondo sin tejido en los viales fueron 12 recuentos.

FIGURA 14. Las IgM humanas que se unen a neuronas se dirigen in vivo a las lesiones de la médula espinal. A los ratones con desmielinización medular inducida por TMEV crónica se les administró 1,0 mg por vía intraperitoneal de sHlgM42 (A), rHlgM12 (B) o IgM monoclonal humana de control (C). 4 horas más tarde, los ratones se perfundieron con paraformaldehído al 4%, se extrajeron las médulas espinales, se seccionaron en congelación y se inmunomarcaron usando fragmentos Fab'2 conjugados con FITC dirigidos contra la cadena mu humana (Jackson Immnoresearch). Las médulas espinales de los ratones que recibieron sHlgM42 o rHlgM12 contenían IgM humana en las lesiones. Se encontró poco control de IgM humana en las lesiones. Los paneles inferiores son tinciones H/E para visualizar células y lesiones inflamatorias. Concluimos que ciertas IgM humanas pueden cruzar el BBB en el modelo TMEV.

FIGURA 15. Las IgM humanas que se unen a la neurona se localizan en los axones del neurofilamento + (NF) en las lesiones de la médula espinal. A los ratones con desmielinización medular inducida por TMEV crónica se les administró 1,0 mg por vía intraperitoneal de IgM y se sacrificaron 4 horas más tarde. Las médulas espinales se congelaron en secciones longitudinalmente y se inmunomarcaron con fragmentos de Fab'2 de la cadena mu humana antihumana conjugada con FITC (verde) y anti-NF (SMI-32 y 34, rojo) seguido de un TRITC conjugado secundario. Las imágenes confocales fusionadas confirman la colocalización de sHlgM42 (A) con fibras largas NF+ (B), fusionadas en (C). rHlgM12 (D, verde) también se co-localizó con estructuras NF+ (D, rojo) tales como haces de fibras de axones transversales.

FIGURA 16. rHlgM12 y sHlgM42 no exacerbaban la puntuación clínica de EAE. Grupos de 10 ratones C57BL6 con EAE inducida por péptido MOG recibieron una única dosis i.v. de 100 μ g de rHlgM12, sHlgM42, IgM humana de control o solución salina en el momento en que cada ratón alcanzó una puntuación clínica de 1 (cola flácida) y se monitoreó cada dos días hasta 28 días después de la inmunización. Los gráficos son la media \pm SEM de la puntuación clínica media de cada grupo de tratamiento. ANOVA en rangos de puntuación clínica promedio indicaron que no hubo diferencia entre los grupos ($P = 0,14$).

FIGURA 17. rHlgM12 y sHlgM42 no exacerbaban la patología de la médula espinal EAE. Al final del estudio en la Fig. 13, se extrajeron los cordones espinales, se cortaron en bloques de 1 mm, se cortaron secciones transversales de cada tercer bloque consecutivo y se tiñeron con ericromo para visualizar la patología. 10 secciones transversales por ratón (40 cuadrantes) se clasificaron a ciegas. No hubo diferencias en la inflamación ($P = 0,825$) o desmielinización ($P = 0,766$) entre los grupos.

FIGURA 18. El rHlgM12 promueve el crecimiento de neuritas. Las neuronas del hipocampo E15 se cultivaron en cubreobjetos de vidrio revestido con poli-D-lisina (PDL) (A) o rHlgM12 (B) -nitrocelulosa. 12 horas después de la siembra de las células, estas neuronas se fijaron y se tiñeron con el anticuerpo de β 3-tubulina (A1 y B1, verde) y la faloidina de Texas-red (A2 y B2). A3-B3 son superposiciones de A1-A2 y B1-B2, donde los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). C, D y E muestran la medición del total (C, $p = 0,0056$), el más largo (D, $p < 0,0001$) y el segundo más largo (E, $p = 0,0782$) longitudes de neurita. Las neuronas que crecen en rHlgM12 tienen menos neuritas (F, $p < 0,0001$) y la mayoría son neuronas en etapa 3 (G) en comparación con las neuronas sembradas en sustratos de PDL de control (72% frente a 18%) que tienen neuritas simétricas múltiples. Los análisis estadísticos muestran la media de \pm SEM (prueba *t* impar).

FIGURA 19. rHlgM12 impulsa la formación de axones
Las neuronas del hipocampo 12 horas después de la siembra en sustratos de PDL (A), PDL+Laminina (B) o rHlgM12 (C) se tiñeron con Tau1 (A1-C1, verde) o MAP2 (A2-C2, azul). A3-C3 son superposiciones de A1-C1 y

A2-C2, y F-actina (roja) se marcó con faloidina Texas-red. DF muestra la intensidad relativa de Tau1 a lo largo de las neuritas más largas desde el cuerpo celular hasta el cono de crecimiento en **A1-C1** marcado con líneas discontinuas. La tinción de Tau1 se enriquece asimétricamente en la parte distal de la neurita más larga en las neuronas de la etapa 3 cultivadas tanto en sustratos rHlgM12 como laminina.

FIGURA 20. La unión a rHlgM12 reorganiza las membranas neuronales

Las neuronas hipocampales DIV3 se tiñeron tres veces con rHlgM12, toxina B del cólera (CTB, Alexa Fluor 594) y fijación posterior con filipina (**A**). rHlgM12 (**A1**) etiqueta uniformemente la superficie de la neurona, con un patrón similar al de GM1 (**A2**) o colesterol (**A3**) marcado por CTB o filipina, respectivamente. Sin embargo, después del tratamiento con rHlgM12 durante 30 min a 37°C, los agregados de rHlgM12 unidos a la membrana en la superficie de la neurona (**B1-C1**). El tratamiento con rHlgM12 produce una agrupación de colesterol (**B2**) y GM1 (**C2**), que se localiza junto con el rHlgM12 agregado (**B3-C3**). Los paneles inferiores en la parte inferior de **B** y **C** son de mayor aumento de las regiones en caja, que muestran la colocalización de rHlgM12 agregado (verde) con colesterol agrupado (azul) o GM1 (rojo) en la región del cono de crecimiento.

FIGURA 21. rHlgM12 se co-localiza con GM1 en microdominios de membrana neuronal

A. Las neuronas del hipocampo DIV1 se fijaron primero con paraformaldehído al 4% y luego se tiñeron con rHlgM12. rHlgM12 etiqueta estructuras de punctum más pequeñas. **B.** Las neuronas del hipocampo DIV1 vivo se enfriaron a 4°C durante 30 minutos y luego se marcaron con rHlgM12, seguido de tinción con anticuerpo anti β -III-tubulina después de la fijación. rHlgM12 tiñe formaciones punteadas mucho más grandes en la superficie de la neurona. **C.** Las neuronas del hipocampo DIV3 vivo se trataron con metilo- β -ciclodextrina durante 30 minutos a 37°C para reducir el colesterol y luego se enfriaron a 4°C. Las neuronas fijas se tiñeron con rHlgM12 (verde) y toxina B del cólera (roja). rHlgM12 se une a los puntos más grandes que localizan GM1 etiquetados por la toxina B del cólera. El panel inferior muestra un aumento mayor de las regiones enmarcadas.

FIGURA 22. El rHlgM12 se une a balsas lipídicas

Se permitió que las neuronas corticales DIV7 vivas se unieran a rHlgM12 o al anticuerpo IgM de control a 4°C durante 30 min. **A.** Las neuronas se lavaron tres veces después de la unión del anticuerpo y se lisaron en tampón que contiene 0,5% de NP-40. Los lisados se separaron mediante microcentrifugación a 4°C, y tanto los sobrenadantes como los gránulos se transfirieron con anticuerpo secundario IgM antihumano. rHlgM12 se distribuye tanto en el sedimento como en el sobrenadante en comparación con el anticuerpo IgM de control, que no se une a las neuronas y va al lavado. El panel inferior muestra un gel separado con Coomassie cargado con la misma cantidad de proteína. **B.** Las neuronas lisadas en tampón que contiene 1% de Triton X-100 se fraccionaron mediante ultracentrifugación en gradientes de sacarosa a 4°C. Las fracciones resultantes se transfirieron secuencialmente para rHlgM12, caveolina-1, receptor de transferrina, β 3-tubulina (B3-Tub) y beta-actina con anticuerpos específicos. rHlgM12 se localiza en la fracción de baja densidad que contiene caveolina-1 y β 3-tubulina. Las fracciones de mayor densidad contienen receptor de transferrina, β 3-tubulina y actina. Algunos rHlgM12 se localizan en el sedimento insoluble en detergente, que se compone principalmente de proteínas citoesqueléticas enriquecidas en tubulina. La mayoría de la actina se destina a fracciones de mayor densidad solubles en detergente.

FIGURA 23. rHlgM12 se asocia con microtúbulos

A. Las neuronas del hipocampo DIV1 se trataron primero con rHlgM12 durante 30 min a 37°C, luego se fijaron y se extrajeron con tampón que contenía paraformaldehído al 4% y Triton X-100 al 0,1% y seguían tinciones para rHlgM12 (verde), β 3-tubulina (azul) y F-actina (rojo). rHlgM12 se une a las moléculas insolubles en detergente que se colocalizan con los microtúbulos fasciculados a lo largo de los ejes neuríticos (**A 2 y 4**) y en el dominio central del cono de crecimiento, pero no con la F-actina localizada en la periferia del cono de crecimiento (**A 3 y 4**). **B.** Se permitió que las neuronas corticales DIV7 se unieran a rHlgM12 primero, y luego se lisaron en 0,5% de NP-40. Los sobrenadantes se sometieron a coimmunoprecipitación. Tanto rHlgM12 como β 3-tubulina se coimmunoprecipitaron entre sí.

FIGURA 24. Mecanismos propuestos por los que rHlgM12 promueve la formación de axones

A. Las membranas de neurona contienen microdominios en balsas y no en balsas. Los microdominios de balsas, que están distribuidos uniformemente en las membranas neuronales, se segregan en dos grupos. Uno de ellos está asociado con microtúbulos. **B.** La unión de rHlgM12 induce la agrupación de microdominios de balsas, que promueve la estabilización de microtúbulos y el anclaje de membranas neuronales. **C.** Durante el crecimiento de neuritas, los conos de crecimiento exploran el entorno y el grupo de microdominios de balsas al interactuar con rHlgM12. Como resultado, los microtúbulos se estabilizan en los sitios de contacto rHlgM12 y anclan las membranas neuronales, lo que mejora la periferia del cono de crecimiento a la transición al dominio central como se observa en las Figuras 3 y 6 donde el rHlgM12 aplicado en el baño se agrega en el dominio central del cono de crecimiento.

FIGURA 25. rHlgM12 no se asocia con tubulina directamente

A. Las células de neuroblastoma N2A se tiñeron con rHlgM12 (**A1**, verde) y β 3-tubulina (**A2**, rojo). Los

núcleos se marcaron con DAPI (**A3**, azul). Las células N2A son negativas para la tinción de rHlgM12 pero expresan β 3-tubulina. **B**. Los sobrenadantes de los lisados de células N2A se incubaron con rHlgM12 y las moléculas asociadas con rHlgM12 se redujeron por agarosa con proteína L y se sometieron a transferencia Western. rHlgM12 no está asociado con el gránulo. La β 3-tubulina no se redujo por rHlgM12, aunque se detectó en los sobrenadantes.

FIGURA 26. rHlgM12 disminuye la actina, pero no se colocaliza con F-actina

A. Las neuronas del hipocampo vivas DIV1 se tiñeron a 4°C con rHlgM12 (**A1**, verde) primero, y F-actina (**A2**, rojo) se marcó con faloidina Texas-red después de la fijación. En la región del cono de crecimiento, la F-actina se redujo y se enriqueció en el dominio central, mientras que rHlgM12 tiñó uniformemente las estructuras de puntos en la superficie del cono de crecimiento, que marcó el borde mismo del cono de crecimiento. **B**. Una pequeña cantidad de actina fue disminuida por rHlgM12, y ninguno de los tres anticuerpos anti-actina ensayados funcionó en la inmunoprecipitación. La banda en la posición similar a β 3-tubulina es la cadena pesada de IgG indicada por la punta de flecha vacía.

FIGURA 27 (a) Las membranas celulares se reconstituirán en una fina película de oro perforada con miles de nanoporos (200 nm de tamaño). **(b)** La película dorada suspendida está en contacto con una solución de tampón en ambos lados.

FIGURA 28. Un anticuerpo humano que se une a las neuronas promueve la extensión de neuritas. Las neuronas se sembraron en sustratos recubiertos con IgM humana, se dejaron crecer durante 24 horas y se inmunomarcaron con anti-neurofilamento. sHlgM42 indujo un aumento (**A**) en comparación con una IgM humana no permisiva (**B**)

FIGURA 29. Un anticuerpo humano que se une a neuronas agrupa dominios de membrana. El inmunomarcaje uniforme en soma y axones se realizó a 0°C (**A**). Cuando las células se calientan a 15°C durante 15 min, sHlgM42 se localiza en parches más discretos en la superficie celular de los axones (**B**).

FIGURA 30. Extensión de Neurita que promueve objetivos de anticuerpos humanos in vivo en áreas de lesión. A los ratones con LME crónica se les administró anticuerpo i.p., se retiraron las médulas espinales 4 horas más tarde y se detectó IgM humana en las secciones transversales de la médula espinal. Las áreas lesionadas de la médula espinal de un anticuerpo dado de ratón demuestran fibras paralelas que se unen a una IgM antihumana marcada fluorescentemente (**A**). Las áreas lesionadas de la médula espinal de un ratón que recibió una IgM humana de control no contienen IgM humana (**B**).

FIGURA 31. Lesión por aplastamiento de la médula espinal. Las fotomicrografías muestran la apariencia típica de la médula espinal teñida con H y E de los ratones de control (**A**) o los ratones 30 d después de la compresión del clip Fejota de 8 g (**B**). La lesión por compresión está asociada con una infiltración extensa de células inflamatorias, pérdida de motoneuronas.

FIGURA 32. Ejemplo de actividades nocturnas espontáneas de ratones infectados con TMEV. A) Registros originales completos de la actividad horizontal durante el período de 64 días. Las actividades nocturnas altas y las bajas diurnas son fáciles de apreciar. Debido a que los ratones normalmente están activos durante la noche, seleccionamos actividades nocturnas para el análisis (6PM-6AM). Sin embargo, mediante la inspección visual de grabaciones comprimidas no filtradas en actividades horizontales (**B**) o verticales (**C**) puede ser difícil identificar cambios reales a largo plazo.

Figura 33. Una única dosis i.p. de anticuerpo de unión a neuronas (rHlgM12) mejora la actividad horizontal en ratones SJL crónicamente infectados. Se colocaron tres grupos de 5 ratones SJL a 90 dpi en cajas de monitoreo de actividad AccuScan. Las mediciones basales se recogieron durante 8 días. Después del tratamiento, los ratones se controlaron continuamente durante 8 semanas. Los paneles A, C y E corresponden a la actividad horizontal y B, D y F corresponden a la actividad vertical. **A, B**) Las actividades nocturnas promedias presentadas como recipientes para cada día sugirieron la mejora en la actividad horizontal solo en el grupo tratado con rHlgM12; **C**) Filtrado gaussiano (GB = 2 días) y **E**) El ajuste polinómico de sexto orden de valores Z estandarizados proporcionó una mejora clara y distinta en ratones tratados con rHlgM12. **B, D y F**) La actividad vertical no se vio afectada por ningún tratamiento. La actividad (escala vertical) es el número de interrupciones del haz por hora. El parámetro GB se puede interpretar como un valor (en días) del ancho medio del filtro a la mitad de la altura. Con el aumento del valor de GB, la desviación estándar disminuye. Las bandas puntuales de confianza del 95% se dan para cada día.

FIGURA 34. Comparación de tres tratamientos a 90 dpi usando los valores del modelo predicho. El análisis estadístico se realizó para cada día antes y después del tratamiento. La actividad nocturna horizontal de los ratones tratados con rHlgM12 en comparación con los ratones tratados con IgM y solución salina significativamente se divergió/se mejoró el día 7 ($p = 0,045$) y el día 11 ($p = 0,042$) después del tratamiento, respectivamente (indicado por flechas negras). Las bandas puntuales de confianza del 95% se dan para cada día.

FIGURA 35. El rHlgM12 mejora tanto la actividad horizontal como la vertical en ratones SJL cuando se administran temprano en la enfermedad. Se colocaron tres grupos de 5 ratones SJL a 45 dpi en cajas de control de actividad AccuScan. Las medidas basales se recogieron durante 8 días. Después del tratamiento, los ratones se controlaron continuamente durante 8 semanas. Los paneles A, C, E y G corresponden a la actividad horizontal y B, D, F y H corresponden a la actividad vertical. **A, B**) Registros originales sin filtro para actividad horizontal y vertical; **C, D**) Actividades nocturnas promedias presentadas como contenedores para cada día, **E**,

F) Filtrado gaussiano (GB = 2 días) y G, H) Ajuste polinómico de sexto orden de valores Z estandarizados que reveló una mejora en la actividad horizontal y vertical en grupo tratado con rHlgM12. Grupos de control tratados con IgM y salinina mostraron niveles similares de actividad motora a lo largo del estudio. Las bandas de confianza del 95% puntuales se dan para cada día.

FIGURA 36. Comparación de tres tratamientos a 45 dpi utilizando los valores del modelo predicho. El análisis estadístico se realizó para cada día antes y después del tratamiento. **A, C)** La actividad nocturna horizontal de ratones tratados con rHlgM12 en comparación con ratones control tratados con IgM y solución salina se divergió significativamente el día 13 ($p = 0,015$) y el día 9 ($p = 0,036$) después del tratamiento, respectivamente. **B, D)** La actividad vertical de ratones tratados con rHlgM12 se divergió/se mejoró el día 14 ($p = 0,019$) y el día 6 ($p = 0,037$) después del tratamiento, respectivamente. Las flechas negras indican días con inicio de mejora significativa. Las bandas puntuales de confianza del 95% se dan para cada día.

FIGURA 37. Los ratones SJL no infectados normales tienen una actividad espontánea muy variable que no está influenciada por ningún tratamiento. Tres grupos de 5 ratones SJL no infectados se colocaron en cajas de monitoreo de actividad AccuScan. Las mediciones basales se recogieron durante 8 días. Después del tratamiento, los ratones se controlaron continuamente durante 8 semanas. Ninguno de los tratamientos indujo cambios en la actividad horizontal (**A, C, E y G**) o vertical (**B, D, F y H**). Las bandas puntuales de confianza del 95% se dan para cada día.

FIGURA 38. Una sola dosis de anticuerpo humano aumentó la supervivencia en ratones transgénicos mutantes SOD1 G86R. Los ratones se trataron con una dosis única de rHlgM12 o PBS a los 55 días de edad. Algunos ratones no fueron tratados. Los ratones fueron seguidos hasta moribundos y luego sacrificados por patología. Algunos ratones murieron a causa de la enfermedad. Todos los ratones tuvieron una pérdida de peso profunda antes de la muerte. La supervivencia se trazó usando las curvas de Kaplan-Meier y la significación estadística se determinó usando la prueba no paramétrica de Mantel-Cox. Hubo un aumento en la supervivencia en ratones tratados con rHlgM12 en comparación con ratones tratados con PBS o sin tratar, $P = 0,008$. Todos los análisis y el tratamiento se realizaron de forma cegada, de modo que el investigador que tomó la decisión de sacrificar los ratones no tenía conocimiento de los grupos de tratamiento. Un total de 45 ratones se estudiaron en este análisis. Los ratones SOD +/- de tipo salvaje de Littermate tuvieron supervivencia normal y no perdieron peso (datos no mostrados).

FIGURA 39 representa la pérdida de peso en ratones G86R SOD1 como una función del tiempo en ratones a los que se les administró una sola dosis de 200 μg de rHlgM12 a los 50 días de edad en comparación con los ratones de control administrados con PBS. Los ratones administrados con rHlgM12 mostraron menos pérdida de peso durante un período de 60 días después de la inyección única de anticuerpo.

FIGURA 40. Una única dosis de anticuerpo humano disminuyó la degeneración del axón de la médula espinal en ratones transgénicos mutantes SOD1 G86R. Los ratones fueron tratados con una dosis única de 250 μg de rHlgM12 o PBS a los 55 días de edad. Algunos ratones no fueron tratados. El número de espirales de mielina, característicos de los axones degenerados, se contaron en la médula espinal a nivel medio torácico. El número de axones degenerados disminuyó en ratones SOD1 mutantes tratados con rHlgM12 en comparación con ratones tratados con PBS ($P = 0,003$, prueba T) y no tratados. Se ha de tener en cuenta que el número de axones degenerados en la médula espinal de ratones SOD -/- de tipo salvaje es mínimo en comparación con ratones mutantes de SOD1 +/- . En el momento del sacrificio, los ratones se perfundieron con el fijador de Trump (4% de formaldehído, glutaraldehído al 0,1%) y la médula espinal se cortó en bloques de 1 mm. Los bloques se incrustaron en plástico Araldite y las secciones de 1 micra del nivel T6 se tiñeron con parafenilendiamina para visualizar la envoltura de mielina. Se muestran secciones de la médula espinal de SOD -/- de tipo salvaje (arriba a la derecha) y SOD1 +/- mutante (abajo a la derecha).

FIGURA 41. Una dosis única de anticuerpo humano conservó las neuronas del asta anterior y posterior en la médula espinal de ratones transgénicos mutantes SOD1 G86R. Los ratones se trataron con rHlgM12 o PBS a los 55 días de edad. Algunos ratones no fueron tratados. El número de células del asta anterior y posterior, teñidas con un anticuerpo para NeuN que marca específicamente a las neuronas, se contaron en secciones de parafina de la médula espinal a un nivel medio torácico. El número de células del asta anterior y posterior en ratones tratados con rHlgM12 fue significativamente mayor ($P = 0,0025$ y $P = 0,018$ mediante prueba T) que en los ratones tratados con PBS o los que no se trataron. El número de células del asta anterior y posterior en ratones mutantes SOD tratados con rHlgM12 fue similar a las observadas en ratones SOD -/- de tipo salvaje.

FIGURA 42. El anticuerpo humano recombinante, rHlgM12, se une a las neuronas a través de las especies. Las neuronas corticales de ratón (**A, B, C, D**), las neuronas de hipocampo de ratón (**E, F**) y las neuronas corticales humanas (**G, H**) se tiñeron in vivo con rHlgM12 (**A, C, E y G**) y las mismas células co-etiquetadas con anticuerpos contra neurofilamentos (**B, D**) o beta tubulina (**F, G**). rHlgM12 se detectó con un anticuerpo secundario etiquetado fluorescentemente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0042] De acuerdo con la presente invención pueden emplearse biología molecular, microbiología y técnicas de ADN recombinante convencionales dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III [Ausubel, RM, ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volúmenes I-III [JE Celis, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III [Coligan, JE, ed. (1994)];

"Oligonucleotide Synthesis" (MJ Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [BD Hames & SJ Higgins eds. (1985)]; "Transcription and Translation" [BD Hames & SJ Higgins, eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [RI Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells and Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning" (1984).

5 **[0043]** Por lo tanto, si aparecen en el presente documento, los siguientes términos tendrán las definiciones expuestas a continuación.

A. TERMINOLOGÍA

10 **[0044]** El término "miembro de unión específica" describe un miembro de un par de moléculas que tienen especificidad de unión entre sí. Los miembros de un par de unión específico pueden derivarse de forma natural o producirse total o parcialmente sintéticamente. Un miembro del par de moléculas tiene un área en su superficie, o una cavidad, o un componente en su superficie, que se une específicamente y por lo tanto es complementaria a una organización espacial y polar particular del otro miembro del par de moléculas. Por lo tanto, los miembros del par tienen la propiedad de unirse específicamente entre sí. Ejemplos de tipos de pares de unión específica son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando, enzima-sustrato. Esta aplicación se refiere a las reacciones de tipo antígeno-anticuerpo.

20 **[0045]** El término "anticuerpo" describe una inmunoglobulina ya sea natural o producida parcial o totalmente sintéticamente. El término también abarca cualquier polipéptido o proteína que tenga un dominio de unión que sea, o sea homólogo a, un dominio de unión a anticuerpo. Los anticuerpos injertados con CDR también se contemplan con este término. Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, que incluye anticuerpos y fragmentos de la misma, que se une a un epítipo específico. El término abarca anticuerpos policlonales, monoclonales y quiméricos, el último mencionado se describe con más detalle en las patentes de los Estados Unidos números 4.816.397 y 4.816.567. El término "anticuerpo" incluye una molécula de inmunoglobulina (Ig) de tipo salvaje, que comprende generalmente cuatro cadenas polipeptídicas de longitud completa, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o un homólogo de Ig equivalente de las mismas (p. ej., un nanocuerpo de camélido, que comprende solo una cadena pesada); incluyendo mutantes funcionales de longitud completa, variantes o derivados de los mismos, que retienen las características esenciales de unión a epítipo de una molécula de Ig, e incluyen anticuerpos de doble dominio, biespecífico, multiespecífico y de dominio variable doble; Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2). También se incluyen dentro del significado del término "anticuerpo" cualquier "fragmento de anticuerpo".

35 **[0046]** Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula que comprende al menos una cadena de polipéptido que no es de longitud completa, incluyendo (i) un fragmento Fab, que es un fragmento monovalente que consiste de dominios ligero variable (VL), pesado variable (VH), ligero constante (CL) y pesado constante 1 (CH1); (ii) un fragmento F(ab')₂, que es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) una porción de cadena pesada de un fragmento Fab (Fd), que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento de fragmento variable (Fv), que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento de anticuerpo de dominio (dAb), que comprende un solo dominio variable (Ward, E.S. et al., Nature 341, 544 - 546 (1989)); (vi) un anticuerpo camélido; (vii) una región determinante de complementariedad aislada (CDR); (viii) un Fragmento Fv de Cadena Única en el que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird y col., Science, 242, 423-426, 1988; Huston et al, PNAS EE.UU., 85, 5879 - 5883, 1988); (ix) un diacuerpo, que es un anticuerpo biespecífico bivalente en el que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando así que los dominios se emparejen con los dominios de complementariedad de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno (WO94/13804; P. Holliger y col. Proc. Natl. Acad. LME. EE.UU. 906444-6448, (1993)); y (x) un anticuerpo lineal, que comprende un par de segmentos Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera de complementariedad, forman un par de regiones de unión a antígeno; (xi) fragmentos de anticuerpos multivalentes (dímeros scFv, trímeros y/o tetrámeros (Power and Hudson, J Immunol. Methods 242: 193 - 204 9 (2000)), y (xii) otras porciones de longitud no pesada de cadenas pesadas y/o ligeras, o mutantes, variantes o derivados de los mismos, solos o en cualquier combinación.

55 **[0047]** Ya que los anticuerpos pueden modificarse de diversas maneras, el término "anticuerpo" debe interpretarse por cubrir cualquier miembro específico o sustancia de unión que tenga un dominio de unión con la especificidad requerida. Por lo tanto, este término abarca fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión a inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por lo tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o equivalente, fusionado a otro polipéptido. La clonación y la expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023 y en las patentes de los EE.UU. N^{os} 4.816.397 y 4.816.567.

65 **[0048]** Un "sitio de combinación de anticuerpo" es la porción estructural de una molécula de anticuerpo compuesta por la cadena ligera o variable de cadena pesada y ligera y las regiones hipervariables que se une específicamente al antígeno.

[0049] La frase "molécula de anticuerpo" en sus diversas formas gramaticales como se usa en este documento contempla tanto una molécula de inmunoglobulina intacta como una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina.

5 **[0050]** Moléculas de anticuerpo ejemplares son moléculas intactas de inmunoglobulina, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y aquellas porciones de una molécula de inmunoglobulina que contiene el paratopo, incluyendo aquellas porciones conocidas en la técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v), cuyas porciones son las preferidas para uso en los métodos terapéuticos descritos en este documento.

10 **[0051]** Los anticuerpos también pueden ser biespecíficos, en los que un dominio de unión del anticuerpo es un miembro de unión específica, y el otro dominio de unión tiene una especificidad diferente, por ejemplo, para reclutar una función efectora o similar. Los anticuerpos biespecíficos incluyen en donde un dominio de unión del anticuerpo es un miembro de unión específico descrito aquí, que incluye un fragmento del mismo, y el otro dominio de unión es un anticuerpo distinto o fragmento del mismo, que incluye un anticuerpo específico anti-cáncer o anti-tumor. El otro dominio de unión puede ser un anticuerpo que reconoce o se dirige a un tipo de célula particular, como en un anticuerpo neuronal o celular glial específico. En los anticuerpos biespecíficos, el dominio de unión del anticuerpo de la divulgación se puede combinar con otros dominios o moléculas de unión que reconocen receptores de células particulares y/o modulan células de una manera particular, como por ejemplo un modulador inmune (por ejemplo, interleucina(s)), un modulador de crecimiento o citoquina (por ejemplo, factor de necrosis tumoral (TNF) y, particularmente, la modalidad biespecífica de TNF demostrada en U.S.S.N. 60/355.838 presentada el 13 de febrero de 2002) o una toxina (por ejemplo, ricina) o agente o factor antimitótico o apoptótico. Por lo tanto, los anticuerpos anti-FAP se pueden utilizar para dirigir agentes, marcadores, otras moléculas o compuestos o anticuerpos a sitios del estroma, áreas particulares de curación de heridas, inflamación, cáncer o tumores.

25 **[0052]** La frase "anticuerpo monoclonal" en sus diversas formas gramaticales se refiere a un anticuerpo que tiene solamente una especie de sitio de combinación de anticuerpo capaz de inmunorreaccionar con un antígeno particular. Por lo tanto, un anticuerpo monoclonal típicamente muestra una única afinidad de unión por cualquier antígeno con el que inmunorreacciona. Un anticuerpo monoclonal también puede contener una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpos, cada uno inmunoespecífico para un antígeno diferente; por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico (quimérico).

30 **[0053]** El término "dominio de unión a antígeno" describe la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente y es complementaria a parte o la totalidad de un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo se puede unir a una parte particular del antígeno solamente, parte que se denomina epítipo. Un dominio de unión a antígeno puede proporcionarse por uno o más dominios variables de anticuerpo. Preferiblemente, un dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

35 **[0054]** Los inmunoconjugados o proteínas de fusión de anticuerpos, en donde los anticuerpos, moléculas de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, de uso en la presente invención están conjugados o unidos a otras moléculas o agentes incluyen además, pero no están limitados a tales anticuerpos, moléculas, o fragmentos conjugados a un agente de ablación química, toxina, inmunomodulador, citoquina, agente citotóxico, agente quimioterapéutico, agente antimicrobiano o péptido, disruptor de la pared celular y/o de la membrana celular, o fármaco.

40 **[0055]** El término "específico" puede usarse para referirse a la situación en la que un miembro de un par de unión específica no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distintas de su pareja de unión específica. El término también es aplicable cuando, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno es específico para un epítipo particular que es portado por un número de antígenos, en cuyo caso el miembro de unión específico que lleva el dominio de unión a antígeno será capaz de unirse a los diversos antígenos que llevan el epítipo.

45 **[0056]** El término "comprende" se utiliza generalmente en el sentido de incluir, es decir que permite la presencia de una o más características o componentes.

50 **[0057]** El término "que consta esencialmente de" se refiere a un producto, en particular una secuencia de péptido, de un número definido de residuos que no se une covalentemente a un producto más grande. En el caso del péptido mencionado anteriormente, los expertos en la materia apreciarán que pueden contemplarse, sin embargo, modificaciones menores en el terminal N o C del péptido, tales como la modificación química del terminal para añadir un grupo protector o similar, *por ej.* la amidación del C-terminal.

55 **[0058]** El término "aislado" se refiere al estado en el que estarán los miembros de unión específicos, o ácido nucleico que codifica tales miembros de unión, de acuerdo con la presente descripción. Los miembros y el ácido nucleico estarán libres o sustancialmente libres del material con el que están asociados de forma natural, como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural, o el entorno en el que están preparados (por ejemplo, cultivo celular) cuando dicha preparación es mediante tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*. Los miembros y el ácido nucleico se pueden formular con diluyentes o adyuvantes y aún

con fines prácticos se pueden aislar; por ejemplo, los miembros normalmente se mezclarán con gelatina u otros vehículos si se usan para recubrir placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos, o se mezclarán con productos farmacéuticamente aceptables portadores o diluyentes cuando se usan en el diagnóstico o la terapia.

5 **[0059]** Como se usa en el presente documento, "pg" significa picogramo, "ng" significa nanogramo, "ug" o "µg" significan microgramo, "mg" significa miligramos, "ul" o "µl" significan microlitro, "ml" significa mililitro, "l" significa litro.

10 **[0060]** Los términos "anticuerpo", "neurona de anticuerpo de unión", "anticuerpo IgM12", "anticuerpo IgM42", "anticuerpo 12", "anticuerpo 42", "sHIgM12", "sHIgM42", "rHIgM12", "rHIgM42" y cualquier variante no enumerada específicamente, puede usarse aquí, y como se usa en la presente solicitud y las reivindicaciones se refieren a material proteínico que incluye proteínas únicas o múltiples, y se extiende a aquellas proteínas que tienen los datos de secuencia de aminoácidos descritos aquí y presentados en las Figuras 5 y 6 y el perfil de las actividades establecidas en este documento y en las Reivindicaciones. En particular, el anticuerpo IgM12, anticuerpo 12, rHIgM12 se refiere particularmente a polipéptidos o anticuerpos o fragmentos, particularmente anticuerpos recombinantes o fragmentos, que comprenden la secuencia presentada en la Figura 5. El anticuerpo IgM12, anticuerpo 12, rHIgM12 se refiere particularmente a polipéptidos o anticuerpos o fragmentos, particularmente anticuerpos recombinantes o fragmentos, que comprenden secuencias de CDR de la región variable de la cadena pesada expuestas en SEQ ID NOS: 31-33 y secuencias de CDR de la región variable de la cadena ligera expuestas en SEQ ID NOS: 34-36. El anticuerpo IgM12, anticuerpo 12, rHIgM12 incluye un anticuerpo que tiene la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 1 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 11. En particular, el anticuerpo IgM42, anticuerpo 42, rHIgM42 se refiere particularmente a polipéptidos o anticuerpos o fragmentos, particularmente anticuerpos recombinantes o fragmentos, que comprenden la secuencia presentada en la Figura 6. Anticuerpo IgM42, anticuerpo 42, rHIgM42 se refieren particularmente a polipéptidos o anticuerpos o fragmentos, particularmente anticuerpos recombinantes o fragmentos, que comprenden secuencias de CDR de región variable de cadena pesada establecidas en SEQ ID NOS: 37-39 y las secuencias de CDR de la región variable de la cadena ligera expuestas en SEQ ID NOS: 40-42. El anticuerpo IgM42, anticuerpo 42, rHIgM42 incluye anticuerpo que tiene la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 17 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 27. En consecuencia, también se contemplan proteínas que exhiben actividad sustancialmente equivalente o alterada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, tales como modificaciones obtenidas mediante mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como las obtenidas a través de mutaciones en huéspedes que son productoras del complejo o sus subunidades nombradas. Además, los términos "anticuerpo", "anticuerpo de unión a neurona", "anticuerpo IgM12", "anticuerpo IgM42", "anticuerpo 12", "anticuerpo 42", "sHIgM12", "sHIgM42", "rHIgM12", "rHIgM42" han de incluir dentro de su alcance proteínas específicamente citadas aquí así como también todos los análogos y variaciones alélicas sustancialmente homólogas.

40 **[0061]** Se prefiere que los residuos de aminoácido descritos en este documento están en la forma isomérica "L". Sin embargo, los residuos en la forma isomérica "D" pueden sustituirse por cualquier residuo de L-aminoácido, siempre que el polipéptido retenga la propiedad funcional deseada de la unión a inmunoglobulina. NH₂ se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino terminal de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en el extremo carboxi de un polipéptido. De acuerdo con la nomenclatura polipeptídica estándar, J. Biol. Chem., 243: 3552-59 (1969), las abreviaturas para residuos de aminoácidos se muestran a continuación

45 **[0062]** Tabla de Correspondencia:

50

55

60

65

TABLA DE CORRESPONDENCIA

	SÍMBOLO Una letra	SÍMBOLO 3 letras	AMINOÁCIDO
5	Y	Tyr	tirosina
	G	Gly	glicina
	F	Phe	fenilalanina
	M	Met	metionina
10	A	Als	alanina
	S	Ser	serina
	I	Ile	isoleucina
	L	Leu	leucina
	T	Thr	treonina
15	V	Val	valina
	P	Pro	prolina
	K	Lys	lisina
	H	His	histidina
20	Q	Gln	glutamina
	E	Glu	ácido glutámico
	W	Trp	triptofano
	R	Arg	arginina
	D	Asp	ácido aspártico
25	N	Asn	asparagina
	C	Cys	cisteína

[0063] Hay que señalar que todas las secuencias de residuos de aminoácidos se representan en la presente memoria por las fórmulas cuya orientación izquierda y derecha está en la dirección convencional del extremo amino al extremo carboxi-terminal. Además, debe observarse que un guión al comienzo o al final de una secuencia de residuos de aminoácidos indica un enlace peptídico con una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácidos. La tabla anterior se presenta para correlacionar las anotaciones de tres letras y una letra que pueden aparecer alternativamente en este documento.

[0064] Un "replicón" es cualquier elemento genético (por ejemplo, plásmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación de ADN *in vivo*; es decir, capaz de replicarse bajo su propio control.

[0065] Un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, al cual otro segmento de ADN puede estar unido de manera que se produzca la replicación del segmento unido.

[0066] Una "molécula de ADN" se refiere a la forma polimérica de desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina, o citosina) en su forma monocatenaria, o una hélice de doble cadena. Este término se refiere solo a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no la limita a ninguna forma terciaria particular. Por lo tanto, este término incluye ADN bicatenario encontrado, *inter alia*, en moléculas de ADN lineal (por ejemplo, fragmentos de restricción), virus, plásmidos y cromosomas. Al discutir la estructura de moléculas de ADN bicatenarias particulares, las secuencias pueden describirse aquí de acuerdo con la convención normal de dar solo la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena no transcrita de ADN (es decir, la cadena que tiene una secuencia homóloga al ARNm).

[0067] Un "origen de replicación" se refiere a aquellas secuencias de ADN que participan en la síntesis de ADN.

[0068] Una "secuencia codificante" es una secuencia de ADN de doble cadena que se transcribe y traduce en un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia de codificación están determinados por un codón de inicio en el extremo 5' (amino) y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3' (carboxilo). Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, secuencias procariotas, ADNc de ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN eucariota (por ejemplo, mamífero) e incluso secuencias de ADN sintéticas. Una secuencia de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción se ubicarán normalmente en 3' con respecto a la secuencia codificante.

[0069] Las secuencias de control transcripcional y traduccional son secuencias reguladoras de ADN, tales como promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores, y similares, que proporcionan la expresión de una secuencia codificante en una célula huésped.

[0070] Una "secuencia promotora" es una región reguladora de ADN capaz de unir la polimerasa de ARN en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia de codificación (dirección 3') aguas abajo. La secuencia promotora está limitada en su extremo 3' por el sitio de inicio de la transcripción y se extiende aguas arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por

encima del fondo. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de iniciación de la transcripción (convenientemente definido por mapeo con nucleasa S1), así como dominios de unión a proteínas (secuencias de consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa. Los promotores eucariotas a menudo, pero no siempre, contendrán cajas "TATA" y cajas "CAT". Los promotores procariotas contienen secuencias Shine-Dalgarno además de las secuencias de consenso -10 y -35.

[0071] Una "secuencia de control de expresión" es una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y traducción de otra secuencia de ADN. Una secuencia codificante está "bajo el control" de secuencias de control transcripcional y traduccional en una célula cuando la polimerasa de ARN transcribe la secuencia codificante en ARNm, que luego se traduce en la proteína codificada por la secuencia codificante.

[0072] Una "secuencia de señal" puede incluirse antes de la secuencia codificante. Esta secuencia codifica un péptido señal, N-terminal para el polipéptido, que se comunica con la célula huésped para dirigir el polipéptido a la superficie de la célula o para secretar el polipéptido en el medio, y este péptido de señal es recortado por la célula huésped antes de que la proteína salga de la célula. Las secuencias de señal se pueden encontrar asociadas con una variedad de proteínas nativas de procariotas y eucariotas.

[0073] El término "oligonucleótido", como se usa en este documento en referencia a la sonda de la presente descripción, se define como una molécula compuesta de dos o más ribonucleótidos, preferiblemente más de tres. Su tamaño exacto dependerá de muchos factores que, a su vez, dependen de la función y el uso último del oligonucleótido.

[0074] El término "cebador" tal como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido, tanto si se produce de forma natural como en un digesto de restricción purificado o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis cuando se coloca bajo condiciones en las que la síntesis de un producto de extensión del cebador, que es complementario a una cadena de ácido nucleico, se induce, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como una polimerasa de ARN y a una temperatura y pH adecuados. El cebador puede ser monocatenario o bicatenario y debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis del producto de extensión deseado en presencia del agente inductor. La longitud exacta del cebador dependerá de muchos factores, incluida la temperatura, la fuente del cebador y el uso del método. Por ejemplo, para aplicaciones de diagnóstico, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el cebador oligonucleotídico típicamente contiene 15-25 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos.

[0075] Los cebadores en este documento se seleccionan para ser "sustancialmente" complementarios a diferentes hebras de una secuencia de ADN diana particular. Esto significa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridar con sus hebras respectivas. Por lo tanto, la secuencia del cebador no necesita reflejar la secuencia exacta del molde. Por ejemplo, un fragmento de nucleótido no complementario se puede unir al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador el complementario de la cadena. Alternativamente, las bases no complementarias o las secuencias más largas pueden intercalarse en el cebador, con la condición de que la secuencia del cebador tenga una complementariedad suficiente con la secuencia de la cadena para hibridarse con ella y formar así el molde para la síntesis del producto de extensión.

[0076] Como se usa en el presente documento, los términos "endonucleasas de restricción" y "enzimas de restricción" se refieren a enzimas bacterianas, cada una de las cuales cortan el ADN bicatenario en o cerca de una secuencia de nucleótidos específica.

[0077] Una célula ha sido "transformada" por ADN exógeno o heterólogo cuando dicho ADN se ha introducido dentro de la célula. El ADN transformante puede estar o no integrado (unido covalentemente) en el ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula. En procariotas, levaduras y células de mamíferos, por ejemplo, el ADN transformante puede mantenerse en un elemento episomal tal como un plásmido. Con respecto a las células eucarióticas, una célula establemente transformada es aquella en la que el ADN transformante se ha integrado en un cromosoma para que las células hijas lo hereden a través de la replicación del cromosoma. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de las células eucariotas para establecer líneas celulares o clones compuestos por una población de células hijas que contienen el ADN transformante. Un "clon" es una población de células derivadas de una sola célula o ancestro común por mitosis. Una "línea celular" es un clon de una célula primaria que es capaz de crecimiento estable *in vitro* durante muchas generaciones.

[0078] Dos secuencias de ADN son "sustancialmente homólogas" cuando al menos aproximadamente 75% (preferiblemente al menos aproximadamente 80%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 90 o 95%) de los nucleótidos coinciden con la longitud definida de las secuencias de ADN. Las secuencias que son sustancialmente homólogas pueden identificarse comparando las secuencias usando un software estándar disponible en bancos de datos de secuencia, o en un experimento de hibridación Southern bajo, por ejemplo, condiciones rigurosas tal como se definen para ese sistema particular. La definición de condiciones de hibridación apropiadas está dentro de la habilidad de la técnica. Véase, por ejemplo, Maniatis et al., *Supra*; DNA Cloning, Vols. I y II, *supra*; Nucleic Acid Hybridization, *supra*.

[0079] Se debe apreciar que también dentro del alcance de la presente descripción hay secuencias de ADN que codifican miembros de unión específica (anticuerpos) que codifican para, por ejemplo, un anticuerpo que tiene la misma secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 2 o 10, o que comprende las secuencias de la región de dominio CDR establecidas aquí o en la Figura 10 pero que están degeneradas. Por "degenerado" se entiende que se usa un codón de tres letras diferente para especificar un aminoácido particular. Es bien conocido en la técnica que los siguientes codones se pueden usar de forma intercambiable para codificar cada aminoácido específico:

5		
10	Fenilalanina (Phe o F)	UUU o UUC
	Leucina (Leu o L)	UUA o UUG o CUU o CUC o CUA o CUG
	Isoleucina (Ile o I)	AUU o AUC o AUA
	Metionina (Met o M)	AUG
	Valina (Val o V)	GUU o GUC o GUA o GUG
15	Serina (Ser o S)	UCU o UCC o UCA o UCG o AGU o AGC
	Prolina (Pro o P)	CCU o CCC o CCA o CCG
	Treonina (Thr o T)	ACU o ACC o ACA o ACG
	Alanina (Ala o A)	GCU o GCG o GCA o GGC
	Tirosina (Tyr o Y)	UAU o UAC
20	Histidina (His o H)	CAU o CAC
	Glutamina (Gln o Q)	CAA o CAG
	Asparagina (Asn o N)	AAU o AAC
	Lisina (Lys o K)	AAA o AAG
	Ácido aspártico (Asp o D)	GAU o GAC
25	Ácido glutámico (Glu o E)	GAA o GAG
	Cisteína (Cys o C)	UGU o UGC
	Arginina (Arg o R)	CGU o CGC o CGA o CGG o AGA o AGG
	Glicina (Gly o G)	GGU o GGC o GGA o GGG
	Triptófano (Trp o W)	UGG
30	Codón de terminación	UAA (ocre) o UAG (ámbar) o UGA (ópalo)

[0080] Se debe entender que los codones especificados anteriormente son para las secuencias de ARN. Los codones correspondientes para ADN tienen una T sustituida por U.

[0081] Las mutaciones se pueden hacer en las secuencias que codifican los aminoácidos, fragmentos de anticuerpos, secuencias de la región CDR establecidas en las Figuras 5 o 6, o en las secuencias de ácidos nucleicos representadas en las Figuras 5 o 6, de manera que un codón particular se cambia a un codón que codifica un aminoácido diferente. Dicha mutación generalmente se realiza haciendo el menor número posible de cambios de nucleótidos. Puede hacerse una mutación de sustitución de este tipo para cambiar un aminoácido en la proteína resultante de una manera no conservativa (por ejemplo, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a una agrupación de aminoácidos que tiene un tamaño o característica particular a un aminoácido perteneciente a otra agrupación) o de una manera conservadora (por ejemplo, cambiando el codón de un aminoácido perteneciente a una agrupación de aminoácidos que tiene un tamaño o característica particular a un aminoácido que pertenece a la misma agrupación). Tal cambio conservador generalmente conduce a un menor cambio en la estructura y función de la proteína resultante. Un cambio no conservador es más probable que altere la estructura, actividad o función de la proteína resultante. La presente descripción debe considerarse que incluye secuencias que contienen cambios conservadores que no alteran significativamente la actividad o las características de unión de la proteína resultante.

[0082] Lo siguiente es un ejemplo de varias agrupaciones de aminoácidos:

- 50 Aminoácidos con grupos R no polares
Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina, Prolina, Fenilalanina, Triptófano, Metionina
- Aminoácidos con grupos R polares sin carga
Glicina, Serina, Treonina, Cisteína, Tirosina, Asparagina, Glutamina
- 55 Aminoácidos con grupos R polares cargados (carga negativa a Ph 6,0)
Ácido aspártico, Ácido glutámico
- Aminoácidos básicos (con carga positiva a pH 6,0)
Lisina, Arginina, Histidina (a pH 6,0)

[0083] Otra agrupación puede ser aquellos aminoácidos con grupos fenilo: Fenilalanina, Triptófano, Tirosina

[0084] Otra agrupación puede ser según el peso molecular (es decir, tamaño de los grupos R):

65	Glicina	75	Alanina	89
	Serina	105	Prolina	115
	Valina	117	Treonina	119

Cisteína	121	Leucina	131
Isoleucina	131	Asparagina	132
Ácido aspártico	133	Glutamina	146
Lisina	146	Ácido glutámico	147
Metionina	149	Histidina (a pH 6,0)	155
Fenilalanina	165	Arginina	174
Tirosina	181	Triptófano	204

[0085] Las sustituciones particularmente preferidas son:

- Lys para Arg y viceversa de modo que se pueda mantener una carga positiva;
- Glu para Asp y viceversa para que se pueda mantener una carga negativa;
- Ser para Thr de modo que se pueda mantener un -OH libre; y
- Gln para Asn de modo que se pueda mantener un NH₂ libre.

[0086] Las sustituciones de aminoácidos ejemplares y conservativos preferidos incluyen cualquiera de:

glutamina (Q) para el ácido glutámico (E) y viceversa; leucina (L) para valina (V) y viceversa; serina (S) para treonina (T) y viceversa; isoleucina (I) para valina (V) y viceversa; lisina (K) para glutamina (Q) y viceversa; isoleucina (I) para metionina (M) y viceversa; serina (S) para asparagina (N) y viceversa; leucina (L) para metionina (M) y viceversa; lisina (L) para el ácido glutámico (E) y viceversa; alanina (A) para serina (S) y viceversa; tirosina (Y) para fenilalanina (F) y viceversa; ácido glutámico (E) para ácido aspártico (D) y viceversa; leucina (L) para isoleucina (I) y viceversa; lisina (K) para arginina (R) y viceversa.

[0087] Las sustituciones de aminoácidos también pueden ser introducidas para sustituir un aminoácido con una propiedad particularmente preferible. Por ejemplo, un Cys se puede introducir en un sitio potencial para puentes de disulfuro con otro Cys. Un His se puede introducir como un sitio particularmente "catalítico" (es decir, His puede actuar como un ácido o base y es el aminoácido más común en la catálisis bioquímica). Pro puede ser introducido debido a su estructura particularmente plana, que induce giros β en la estructura de la proteína.

[0088] Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" cuando al menos aproximadamente 70% de los residuos de aminoácidos (preferiblemente al menos aproximadamente 80%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 90 o 95%) son idénticos o representan sustituciones conservadoras. Las regiones CDR de dos anticuerpos son sustancialmente homólogas cuando uno o más aminoácidos están sustituidos con una sustitución de aminoácidos similar o conservativa, y en los que el/los anticuerpo/anticuerpos tiene(n) el perfil de unión y actividades de uno o más de IgM12 o IgM42 descritos en este documento.

[0089] Una región de "heterólogo" del constructo de ADN es un segmento identificable de ADN dentro de una molécula de ADN mayor que no se encuentra en asociación con la molécula mayor en la naturaleza. Por lo tanto, cuando la región heteróloga codifica un gen de mamífero, el gen generalmente estará flanqueado por ADN que no flanquea el ADN genómico de mamífero en el genoma del organismo fuente. Otro ejemplo de una secuencia codificante heteróloga es una construcción en la que la secuencia codificante no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, un ADNc en el que la secuencia codificante genómica contiene intrones o secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo). Las variaciones alélicas o los eventos mutacionales de origen natural no dan lugar a una región heteróloga de ADN como se define en este documento.

[0090] Una secuencia de ADN está "unida operativamente" a una secuencia de control de expresión cuando los controles de secuencia de control de expresión y regula la transcripción y traducción de esa secuencia de ADN. El término "unido operativamente" incluye tener una señal de inicio apropiada (por ejemplo, ATG) frente a la secuencia de ADN para expresar y mantener el marco de lectura correcto para permitir la expresión de la secuencia de ADN bajo el control de la secuencia de control de expresión y producción del producto deseado codificado por la secuencia de ADN. Si un gen que uno desea insertar en una molécula de ADN recombinante no contiene una señal de inicio apropiada, dicha señal de inicio puede insertarse frente al gen.

[0091] El término "condiciones de hibridación estándar" se refiere a condiciones de sal y temperatura sustancialmente equivalentes a 5 x SSC y 65°C tanto para la hibridación como para el lavado. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que tales "condiciones de hibridación estándar" dependen de condiciones particulares que incluyen la concentración de sodio y magnesio en el tampón, longitud y concentración de la secuencia de nucleótidos, porcentaje de desapareamiento, porcentaje de formamida y similares. También es importante en la determinación de "condiciones de hibridación estándar" si las dos secuencias que hibridan son ARN-ARN, ADN-ADN o ARN-ADN. Tales condiciones de hibridación estándar se determinan fácilmente por un experto en la técnica de acuerdo con las fórmulas bien conocidas, en las que la hibridación es típicamente 10-20°C por debajo de la T_m predicha o determinada con lavados de mayor severidad, si se desea.

[0092] El término 'agente' significa cualquier molécula, incluyendo polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos, compuestos químicos y moléculas pequeñas. En particular, el término agente incluye compuestos tales como

compuestos de prueba o compuestos candidatos a fármacos.

[0093] El término 'agonista' se refiere a un ligando que estimula el receptor al que se une el ligando en el sentido más amplio.

5 **[0094]** El término 'ensayo' significa cualquier proceso utilizado para medir una propiedad específica de un compuesto. Un 'ensayo de detección' significa un proceso usado para caracterizar o seleccionar compuestos basados en su actividad de una colección de compuestos.

10 **[0095]** El término 'prevenir' o 'prevención' se refiere a una reducción en el riesgo de adquirir o desarrollar una enfermedad o trastorno (es decir, hacer que al menos uno de los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrollen) en un sujeto que puede estar expuesto a un agente causante de enfermedad, o predispuesto a la enfermedad antes del inicio de la enfermedad.

15 **[0096]** El término 'profilaxis' se relaciona con y abarca el término 'prevención', y se refiere a una medida o procedimiento con el propósito de evitar, en lugar de tratar o curar una enfermedad. Los ejemplos no limitantes de medidas profilácticas pueden incluir la administración de vacunas; la administración de heparina de bajo peso molecular a pacientes hospitalizados con riesgo de trombosis debido, por ejemplo, a inmovilización; y la administración de un agente antipalúdico como la cloroquina, antes de una visita a una región geográfica donde la malaria es endémica o el riesgo de contraer malaria es alto.

20 **[0097]** 'Cantidad terapéuticamente eficaz' significa la cantidad de un fármaco, compuesto, agente, anticuerpo, o agente farmacéutico que provocará la respuesta biológica o médica de un sujeto que está siendo buscada por un médico u otro clínico. En particular, con respecto a enfermedades o afecciones neurológicas, el término "cantidad eficaz" pretende incluir una cantidad eficaz de un compuesto o agente, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo, que provocará un cambio biológicamente significativo en un parámetro clínicamente relevante de la enfermedad. Esto puede incluir un cambio en la cantidad de daño neurológico o muerte observable o evaluable tras la obtención de imágenes, un cambio en un parámetro funcional como movimiento, habla o cognición, o la ausencia o reducción de dicho cambio en condiciones de riesgo o susceptibilidad. La frase "cantidad terapéuticamente efectiva" se usa aquí para indicar una cantidad suficiente para mejorar o prevenir, y preferiblemente reducir en al menos aproximadamente 20 por ciento, al menos aproximadamente 30 por ciento, más preferiblemente en al menos 50 por ciento, más preferiblemente en al menos 70 por ciento, más preferiblemente por al menos 80 por ciento, lo más preferiblemente por al menos 90 por ciento, un cambio clínicamente significativo en un fenómeno mensurable o evaluable, o una característica de la patología, o evaluación de la función.

35 **[0098]** El término 'tratar' o 'tratamiento' de cualquier enfermedad, condición, lesión o infección se refiere, en una realización, a la mejora de la enfermedad, condición, lesión o infección (es decir, detener la muerte o lesión de una célula o tejido, o reducir la manifestación, extensión o gravedad de al menos uno de sus síntomas clínicos). En otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a mejorar al menos un parámetro físico, que puede no ser discernible por el sujeto. En otra realización más, "tratar" o "tratamiento" se refiere a modular la enfermedad, afección, lesión o infección, ya sea físicamente (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico), o ambos. En una realización adicional, "tratar" o "tratamiento" se refiere a ralentizar la progresión de una enfermedad o reducir la cantidad de lesión, daño, muerte a células o tejidos.

45 **[0099]** La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y típicamente no producen una reacción alérgica o adversa similar, tal como molestias gástricas, mareos y similares, cuando se administran a un humano.

50 **[0100]** Como se usa en el presente documento, "pg" significa picogramo, "ng" significa nanogramo, "ug" o "µg" significa microgramos, "mg" significa miligramos, "ul" o "µl" significa microlitro, "ml" significa mililitro, "l" significa litro.

B. DIVULGACIÓN DETALLADA.

55 **[0101]** Los agentes neuroprotectores están dirigidos a la prevención y tratamiento de las complicaciones que resultan en daño en el SNC. Los compuestos o agentes con capacidad para neuroprotección tienen aplicación en trastornos agudos, como apoplejía y lesiones del sistema nervioso, así como en enfermedades crónicas, como trastornos neurodegenerativos. Muchos de los mecanismos subyacentes de daño a los tejidos neurales son similares en estas afecciones y un compuesto o agente neuroprotector podría usarse en más de un trastorno. Las enfermedades incluyen trastornos cerebrovasculares, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, epilepsia, enfermedad(es) de la neurona motora y neuropatía isquémica. Otras aplicaciones incluyen neuroprotección durante anestesia y cirugía. Se han investigado numerosos productos para efectos neuroprotectores, incluidos los de las categorías de secuestradores de radicales libres, agentes antiexcitotóxicos, inhibidores de apoptosis (muerte celular programada), agentes antiinflamatorios, factores neurotróficos, quelantes de iones metálicos, moduladores de canales iónicos y terapia génica. Varios productos candidatos neuroprotectores han llegado a ensayos clínicos y no han demostrado ser significativos, incluidos

antagonistas de NMDA y agentes para reducir la liberación de neurotransmisores Clark WM y col. (2000) Stroke 31 (6): 1234-9; Sarco RI y col. (2001) JAMA 285 (13): 1719 - 28; Albers, GW y col. (2001) JAMA 286 (21): 2673 - 82). Un desafío para los agentes neuroprotectores es la especificidad y la orientación de modo que los efectos de un agente estén dirigidos contra lesiones o neuronas dañadas/comprometidas sin actividad significativa contra células normales y, por lo tanto, efectos secundarios adversos, incluso potencialmente dañinos. La presente invención ahora proporciona agente(s) específico(s) y tolerable(s) capaces de cruzar la barrera hematoencefálica y dirigirse a áreas de lesión, comprometen o dañan para efectuar protección, con efectos adversos mínimos sobre las neuronas normales.

[0102] Aquí se describen miembros de unión específica, particularmente anticuerpos que demuestran unión neuronal, con aplicación como agentes neuroprotectores para uso en el diagnóstico, control, mejora y tratamiento de enfermedades y afecciones donde las neuronas o células nerviosas están comprometidas, incluyendo afecciones neurodegenerativas, muerte de células nerviosas y lesión. Los anticuerpos para uso de la presente invención tienen ciertas cualidades únicas y notables que los hacen particularmente útiles y aplicables en neuroprotección y/o neurorregeneración y en diagnóstico y terapéutica para enfermedades y afecciones neurológicas. Los nuevos anticuerpos para uso de la invención, particularmente anticuerpos recombinantes, se muestran en la presente para cruzar la barrera hematoencefálica de manera efectiva y sin ninguna modificación, para proteger a las neuronas de la muerte celular y para dirigir lesiones neurales y sitios de lesión en el SNC. Los anticuerpos mejoran la función nerviosa y mantienen los axones en modelos animales de lesión axonal crónica y desmielinización. Los anticuerpos tienen toxicidad mínima en animales y no exacerban las condiciones autoinmunes, según se evalúa en modelos animales.

[0103] Aquí se describen miembros de unión específica, particularmente anticuerpos que demuestran la unión de neuronas, con la aplicación como agentes terapéuticos, solos o en combinación con otros agentes neuroactivos alternativos, para la mejora y tratamiento de enfermedades y afecciones donde las neuronas o células nerviosas están comprometidas, incluyendo afecciones neurodegenerativas, muerte y lesión de las células nerviosas. La aplicación proporciona evidencia de la capacidad y actividad terapéuticamente relevante de anticuerpos para el uso de la presente invención, que incluye IgM12, en modelos animales de enfermedades o deficiencias neurológicas. En particular, los estudios proporcionados en este documento demuestran la capacidad y la actividad en un modelo TMEV, en un modelo animal reconocido de enfermedad de la neurona motora particularmente ELA, y proporciona estudios en modelos de lesión de la médula espinal. Se proporcionan composiciones para uso en la mejora o el tratamiento de cualquiera de tales enfermedades o en la prevención de lesión nerviosa o protección de nervios en casos de compromiso o riesgo de compromiso.

[0104] Estudios anteriores con IgM12 y IgM42 han demostrado que el anticuerpo derivado del suero se une a las neuronas del SNC, soporta la extensión de neuritas sobre el sustrato revestido con anticuerpo, y anulan la inhibición de extensión de neuritas de los estudios de la mielina del SNC in vitro (Warrington A et al (2004) J Neuropath Exp Neurol 63 (5): 461 - 473). Los estudios de sHIgM12 inyectados en animales TMEV mostraron una mayor actividad nocturna espontánea, sin embargo, los títulos de virus no se evaluaron en los animales y no se pudieron determinar los posibles efectos antivirales (Rodrigues M et al (2009) Neurology 72: 1269-1276). Los estudios descritos en este documento proporcionan 12 recombinante completamente humano y la secuencia del anticuerpo 42 así como rHIgM42 recombinante. Se proporcionan ahora estudios que demuestran los notables efectos neuroprotectores y terapéuticamente relevantes de estos anticuerpos derivados de suero y recombinantes en animales y modelos animales de enfermedad, así como su unión/direccionamiento específico a sitios de lesión neural.

Anticuerpos, composiciones y métodos terapéuticos

[0105] Los mAb humanos reactivos automáticamente se clasifican en autoanticuerpos naturales humanos (NatAbs) (Cohen IR (2007) J Autoimmun 29: 246-249). Los NatAbs son parte de nuestro repertorio de inmunoglobulinas humanas (Cohen, IR y M. Schwartz (1999) Journal of Neuroimmunology 100: 111-114), producidos naturalmente a partir de nuestros propios genes, generalmente sin mutaciones somáticas y que pueden funcionar para estimular procesos celulares o eliminar restos celulares (Lutz, HU (2007) J Autoimmun 29: 287 - 294). Los NatAbs reaccionan a los autoantígenos, mientras que los Abs convencionales reaccionan a los antígenos exógenos. Los NatAbs tienen una afinidad relativamente baja, generalmente son poliactivos y con frecuencia son IgM. El mecanismo de acción de estas IgM humanas parece ser similar, actuando a través de microdominios de membrana. Los NatAbs son por definición polirreactivos, por lo que identificar el antígeno relevante para una función in vivo específica puede ser un desafío. Sin estar limitados por la teoría, actualmente se entiende que estas IgM se unen a microdominios de membrana que reticular moléculas en la superficie celular. Las moléculas que normalmente no están en contexto se reúnen ensamblando un complejo de señalización (Rodríguez, M., A.E. Warrington, y L.R. Pease (2009) Neurology 72: 1269-1276).

[0106] De acuerdo con ello, las moléculas terapéuticas se identificaron mediante cribado de autoanticuerpos reactivos humanos monoclonales (mAbs) de los sueros de los individuos que llevan los mAbs en alta concentración sin enfermedad mediada por Ab. Dichos mAb se prueban para unirse a la superficie de las células del sistema nervioso sin tener en cuenta el antígeno. Los mAb luego se ensayan para la capacidad de modular un modelo de enfermedad. Este método de identificación de mAbs con eficacia biológica es diferente de la metodología

comúnmente utilizada por la industria farmacéutica (Rodríguez, M., A.E. Warrington, y L.R. Pease (2009) *Neurology* 72: 1269-1276). Se ha demostrado que ciertas IgM humanas pueden promover la remielinización (Warrington AE y col. (2000) *Proc Natl Acad. Sci. EE.UU.* 97: 6820 - 6825). Por ejemplo, una de tales IgM es el rHIgM22 monoclonal humano recombinante que promueve la remielinización (Mitsunaga YB y col. (2002) *Faseb J* 16: 1325-1327). El anticuerpo rHIgM22 se une a oligodendrocitos y mielina y promueve la remielinización del SNC en modelos de EM inducidos por virus y toxinas (Warrington AE y col. (2000) *Proc Natl Acad. Sci. EE.UU.* 97: 6820-6825; Bieber AJ y cols. (2002) *Glia* 37: 241- 249). La remielinización de la médula espinal se induce después de una sola dosis baja de rHIgM22 (Warrington AE y col. (2007) *J Neurosci Res* 85: 967-976).

5
10
15
[0107] Es notable que un tratamiento intraperitoneal (i.p.) con una molécula de corta duración (15 h vida media estimada en ratones) promueve la reparación de tejidos máxima dentro de 5 semanas en un modelo de EM con poca reparación espontánea inherente. Después de la inyección periférica, rHIgM22 cruza la barrera hematoencefálica (BBB) y se acumula dentro de las lesiones cerebrales y de la médula espinal de ratones con desmielinización. Se ha detectado rHIgM22 etiquetada con perlas de ferritina en lesiones in vivo mediante MRI (Pirko I y col. (2004) *Faseb J* 18: 1577-1579).

20
[0108] Un anticuerpo de IgM humano de suero adicional con capacidad remielinizante, sHIgM46, y su contraparte recombinante rHIgM46, también ha sido descrito. Los anticuerpos sHIgM22 y sHIgM46 derivados de suero, y las versiones recombinantes de los mismos, y los métodos para la remielinización se describen, por ejemplo, en el documento WO 0185797. El anticuerpo rHIgM22 y sus métodos están cubiertos, por ejemplo, por la Patente de Estados Unidos 7.807166.

25
30
35
[0109] Aquí se describen autoanticuerpos humanos, que incluyen anticuerpos monoclonales y particularmente anticuerpos recombinantes, que demuestran actividad en la promoción, estimulación, protección y/o regeneración de neuronas en el sistema nervioso central. En un aspecto, los presentes anticuerpos, que incluyen fragmentos de los mismos, demuestran actividad en la neuroprotección, preservación y regeneración de neuronas y axones en la prevención o reducción de la muerte de células nerviosas mediada por lesiones en el sistema nervioso central. Los anticuerpos son aplicables en el tratamiento o mejora de enfermedades o condiciones, o en la prevención o reducción de déficits de células nerviosas y muerte de células nerviosas o apoptosis asociadas con enfermedades o afecciones, particularmente cuando los nervios están dañados, o comprometidos. Las condiciones o enfermedades para el uso o aplicación de los anticuerpos de la divulgación incluyen escenarios en los que la pérdida de estructura, función o supervivencia de neuronas está involucrada o asociada, incluyendo lesión cerebral o trauma, lesión de médula espinal (LME), lesión nerviosa, lesión en la cabeza, condiciones donde el suministro de sangre al cerebro se reduce o se ve comprometido, enfermedades infecciosas del cerebro, enfermedades neurodegenerativas. Ejemplos de tales enfermedades o condiciones incluyen lesión de la médula espinal (LME), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Alzheimer, apoplejía, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, anoxia prenatal/isquemia perinatal y/o parálisis cerebral, encefalopatía, mielopatía y enfermedades de las neuronas motoras.

40
45
[0110] Los agentes neuromoduladores o anticuerpos de la descripción tienen una o más de las siguientes características: protegen y/o estabilizan las neuronas; se dirigen a sitios en el SNC o dañan, comprometen o lesionan las células nerviosas; y/o bloquean la muerte celular, por ejemplo, muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno. Aquí se describen anticuerpos monoclonales que se unen a neuronas que son capaces de promover la extensión de neuritas y proteger a las neuronas del daño con fines diagnósticos y terapéuticos en el sistema nervioso central. En particular, se describen anticuerpos recombinantes, en los que dichos anticuerpos reconocen y son capaces de unirse a neuronas, que incluyen neuronas corticales, neuronas hipocampales, células granulares cerebelosas y células ganglionares de la retina.

50
55
60
[0111] Aquí se describen anticuerpo(s) o fragmento(s) ejemplar(es) del mismo, anticuerpo 12 y anticuerpo 42, particularmente IgM12 o IgM42 recombinante o derivada de suero. En un aspecto particular adicional, el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 12 o 42 que incluye como se expone en la Figura 5 y/o la Figura 6. El anticuerpo recombinante IgM12 comprende la cadena pesada variable (SEQ ID NO: 1) y secuencia de cadena ligera (SEQ ID NO: 11) como se establece en la Figura 5. El anticuerpo recombinante IgM42 comprende la cadena pesada variable (SEQ ID NO: 17) y la secuencia de la cadena ligera (SEQ ID NO: 27) como se expone en la Figura 6. En un aspecto de la descripción se proporciona un anticuerpo de unión a neurona recombinante o sintético que comprende las secuencias de CDR de región variable expuestas en las Figuras 5 y 6. El anticuerpo 12 comprende secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 GGSVSLYY (SEQ ID NO: 31), CDR2 GYIYSSGST (SEQ ID NO: 32) y CDR3 ARSASIRGWFD (SEQ ID NO: 33), y las secuencias CDR de cadena ligera CDR1 QSISSY (SEQ ID NO: 34), AAS CDR2 (SEQ ID NO: 35) y CDR3 QQSYHTPW (SEQ ID NO: 36), como se expone en la Figura 5. El anticuerpo 42 comprende secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 GFTFSTYA (SEQ ID NO: 37), INVGVT CDR2 (SEQ ID NO: 38) y C DR3 VRRSGPDRNSSPADF (SEQ ID NO: 39) y secuencias de CDR de cadena ligera CDR1 QGIG (SEQ ID NO: 40), CDR2 TTS (SEQ ID NO: 41) y CDR3 QKYNSAPRT (SEQ ID NO: 42), como se expone en la Figura 6.

65
[0112] Los paneles de anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos, que incluyen fragmentos Fab o bibliotecas de presentación en fagos, que son capaces de reconocer neuronas, particularmente neuronas humanas,

se pueden cribar para diversas propiedades; es decir, afinidad, isotipo, epitopo, estabilidad, etc. De particular interés son los anticuerpos que imitan la actividad de los anticuerpos ejemplares IgM12 e IgM42, y tienen la capacidad de unir neuronas y proteger a las neuronas de la muerte o lesión celular, como por ejemplo la muerte celular mediada por peróxido. Dichos anticuerpos pueden identificarse fácilmente y/o seleccionarse en ensayos de unión y actividad específicos. Los anticuerpos recombinantes que comprenden la región de unión a antígeno o las regiones de CDR de cadena pesada y/o ligera de los presentes anticuerpos IgM12 y/o IgM42, pueden generarse y seleccionarse para determinar su actividad.

[0113] En general, las regiones CDR, que comprenden secuencias de aminoácidos sustancialmente establecidas como las regiones CDR de las Figuras 5 y 6, se transportarán en una estructura que permite la unión de las regiones CDR a la superficie o a la superficie de las neuronas, y particularmente a neuronas de mamíferos, particularmente neuronas humanas, de mono, mandril, rata y/o ratón. Por "sustancialmente como se establece" se entiende que las secuencias de la región variable, y/o particularmente las secuencias CDR, de la invención serán idénticas o altamente homólogas a las regiones especificadas de las Figuras 5 y 6. Por "altamente homólogo" se contempla que solo unas pocas sustituciones, preferiblemente de 1 a 8, preferiblemente de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, o de 1 a 3, o 1 o 2 sustituciones se pueden hacer en la secuencia de la región variable y/o en las secuencias de CDR. El término "sustancialmente tal como se establece" incluye sustituciones de aminoácidos particularmente conservadoras que no afectan material ni significativamente a la especificidad y/o actividad de los presentes anticuerpos.

[0114] Se pueden hacer sustituciones en la secuencia de la región variable fuera de las CDR para retener las secuencias de CDR. Por lo tanto, pueden introducirse o utilizarse cambios en la secuencia de la región variable o en las secuencias de regiones variables no homólogas o estratificadas alternativas, de modo que las secuencias de CDR se mantienen y el resto de la secuencia de la región variable puede estar sustituido. Alternativamente, las sustituciones pueden hacerse particularmente en los CDR. Las secuencias de CDR para los anticuerpos de la presente descripción se exponen y se describen en este documento incluyendo en las Figuras 5 y 6. El anticuerpo 12 comprende secuencias CDR de cadena pesada CDR1 GGSVSLYY (SEQ ID NO: 31), CDR2 GYIYSSGST (SEQ ID NO: 32) y CDR3 ARSASIRGWFD (SEQ ID NO: 33) y secuencias de CDR de cadena ligera CDR1 QSISSY (SEQ ID NO: 34), CDR2 AAS (SEQ ID NO: 35) y CDR3 QQSYHTPW (SEQ ID NO: 36), como se expone en la Figura 5. El anticuerpo 42 comprende secuencias CDR de cadena pesada CDR1 GFTFSTYA (SEQ ID NO: 37), INVGGVTT CDR2 (SEQ ID NO: 38) y CDR3 VRRSGPDRNS-SPADF (SEQ ID NO: 39), y secuencias CDR de cadena ligera CDR1 QGIG (SEQ ID NO: 40), CDR2 TTS (SEQ ID NO: 41) y CDR3 QKYNSAPRT (SEQ ID NO: 42), como se expone en la Figura 6. Los anticuerpos que tienen sustituciones como se ha descrito y se ha contemplado anteriormente se seleccionan para mantener las actividades y la especificidad acorde con los anticuerpos ejemplares, que incluyen anticuerpos IgM12 e IgM42 y que tienen las características expuestas en este documento y en las reivindicaciones.

[0115] La estructura para llevar los CDRs será generalmente de una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo o una porción sustancial de la misma en la cual las regiones CDR están situadas en posiciones correspondientes a la región CDR de dominios variables de anticuerpos VH y VL de origen natural codificada por genes de inmunoglobulinas reordenados. Las estructuras y ubicaciones de dominios variables de inmunoglobulina pueden determinarse por referencia a Kabat, E.A. y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4^a Edición. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU. 1987, y sus actualizaciones, ahora disponibles en Internet (immuno.bme.nwu.edu). Los dominios variables pueden derivarse de cualquier línea germinal o dominio variable humano reordenado, o pueden ser un dominio variable sintético basado en secuencias de consenso de dominios variables humanos conocidos. Las secuencias derivadas de CDR, como se define en el párrafo anterior, pueden introducirse en un repertorio de dominios variables que carecen de regiones CDR, usando tecnología de ADN recombinante.

[0116] Por ejemplo, Marks y col. (Bio/Technology, 1992, 10: 779-783) describen métodos para producir repertorios de dominios variables de anticuerpos en los que los cebadores de consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' del área de dominio variable se utilizan junto con cebadores de consenso para la tercera región de marco de genes VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables VH que carecen de una CDR/CDR. Marks y col describen además cómo este repertorio se puede combinar con una CDR de un anticuerpo particular. El repertorio puede mostrarse entonces en un sistema huésped adecuado tal como el sistema de presentación de fagos del documento WO92/01047, de manera que se pueden seleccionar miembros de unión específicos adecuados. Un repertorio puede consistir de unos 10⁴ miembros individuales hacia arriba, por ejemplo de 10⁶ a 10⁸ o 10¹⁰ miembros. También se describen técnicas de barajado análogas o combinatorias por Stemmer (Nature, 1994, 370: 389-391), que describe la técnica en relación con un gen de β -lactamasa pero observa que el enfoque puede usarse para la generación de anticuerpos.

[0117] Una alternativa adicional consiste en generar nuevas regiones VH o VL que llevan las secuencias derivadas de CDR de la divulgación usando mutagénesis aleatoria de, por ejemplo, los genes Ab VH o VL para generar mutaciones dentro de todo el dominio variable. Tal técnica está descrita por Gram et al (1992, Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 89: 3576-3580), que usaba PCR propensa a error. Otro método que puede usarse es dirigir la mutagénesis a regiones CDR de genes VH o VL. Tales técnicas están descritas por Barbas y col., (1994, Proc. Natl. Acad. Sci.,

EE.UU., 91: 3809-3813) y Schier y col. (1996, J. Mol. Biol. 263: 551-567). Todas las técnicas descritas anteriormente se conocen como tales en la técnica. El experto en la materia podrá usar tales técnicas para proporcionar miembros de unión específica de la divulgación usando metodología de rutina en la técnica.

5 **[0118]** Una parte sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones marco intermedias. Preferiblemente, la parte también incluirá al menos aproximadamente el 50% de una o ambas de las regiones marco primera y cuarta, siendo el 50% el C-terminal 50% de la primera región marco y el N-terminal 50% de la cuarta región marco. Residuos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser los que normalmente no están asociados con las regiones de dominio variable naturales. Por ejemplo, la construcción de miembros de unión específicos fabricados mediante técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de residuos N- o C-terminales codificados por ligadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlaces para unir dominios variables a otras secuencias de proteínas que incluyen cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de anticuerpos) o marcadores proteicos como se proporciona en este documento y/o conocidos por los expertos en la técnica.

20 **[0119]** Aunque en un aspecto preferido anticuerpos recombinantes que comprenden un par de dominios basados en secuencias establecidas sustancialmente en las figuras 5 y/o 6 de unión se prefieren, dominios de unión individual basados en cualquiera de estas secuencias forman aspectos adicionales. En el caso de los dominios de unión basados en la secuencia sustancialmente expuesta en la Figura 5 y/o 6, tales dominios de unión pueden usarse como agentes diana para neuronas del SNC, particularmente sitios de lesión o lesión nerviosa, ya que se sabe que los dominios de VH de inmunoglobulina son capaces de unirse a los antígenos diana de una manera específica.

25 **[0120]** Los miembros de unión específica pueden comprender además regiones constantes de anticuerpos o partes de las mismas. Por ejemplo, anticuerpos recombinantes basados en las secuencias de VH y VL de las figuras 5 y 6 pueden estar unidos en su extremo C-terminal a dominios constantes de cadena ligera del anticuerpo incluyendo cadenas C κ o C λ humanas, preferiblemente cadenas C λ , incluyendo dominios constantes que son distintos o variantes de los dominios constantes respectivos establecidos en las Figuras 5 o 6. De forma similar, los anticuerpos recombinantes basados en las secuencias de las Figuras 5 o 6 pueden unirse en su extremo C-terminal a la totalidad o parte de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, *p. ej.* IgG, IgA, IgE, IgD e IgM y cualquiera de las subclases de isotipos, particularmente IgG1, IgG2b e IgG4, y luego se ensayan para afirmar o determinar una actividad y capacidad comparable y/o adecuada. IgM es preferido.

35 **[0121]** Los anticuerpos, o cualquiera de sus fragmentos, pueden conjugarse o fusionarse de forma recombinante con cualquier toxina celular, bacteriana u otra, por ejemplo, exotoxina de pseudomonas, ricina o toxina diftérica. La parte de la toxina utilizada puede ser la toxina completa o cualquier dominio particular de la toxina. Dichas moléculas de anticuerpo-toxina se han usado con éxito para dirigir y terapia de diferentes tipos de cánceres, véase, por ejemplo, Pastan, Biochem Biophys Acta. 24 de octubre de 1997; 1333 (2): C1-6; Kreitman y otros, N Engl J Med. 2001 26 de julio; 345 (4): 241-7; Schnell y col., Leukemia. 2000 Jan; 14 (1): 129-35; Ghetie y otros, Mol Biotechnol. 2001 Jul; 18 (3): 251-68. Los multímeros bi y tri-específicos pueden formarse por asociación de diferentes moléculas de scFv y se han diseñado como reactivos de entrecruzamiento para el reclutamiento de células T en tumores (inmunoterapia), reorientación viral (terapia génica) y como reactivos de aglutinación de glóbulos rojos (inmunodiagnóstico), véase, por ejemplo, Todorovska et al., J Immunol Methods. 2001 1 de febrero; 248 (1-2): 47-66; Tomlinson y col., Methods Enzymol. 2000; 326: 461 - 79; McCall y otros, J Immunol. 2001 15 de mayo; 166 (10): 6112-7.

50 **[0122]** Los anticuerpos para uso de la invención se pueden marcar con un marcador detectable o funcional. Las etiquetas detectables incluyen, pero no se limitan a, radiomarcadores tales como los isótopos ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²¹I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In, ¹¹⁷Lu, ²¹¹At, ¹⁹⁸Au, ⁶⁷Cu, ²²⁵Ac, ²¹³Bi, ⁹⁹Tc y ¹⁸⁶Re, que pueden unirse a anticuerpos usando química convencional conocida en la técnica de formación de imágenes de anticuerpos. Las etiquetas también incluyen marcadores fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, Texas Red) y etiquetas usadas convencionalmente en la técnica para la obtención de imágenes MRI-CT. También incluyen etiquetas de enzimas como peroxidasa de rábano picante, β -glucuronidasa, β -galactosidasa, ureasa. Las etiquetas incluyen además elementos químicos tales como biotina que pueden detectarse mediante unión a un resto detectable afín específico, por ejemplo, avidina marcada. Las etiquetas funcionales incluyen sustancias que están diseñadas para ser dirigidas al sitio de compromiso, daño o lesión para proporcionar protección o causar la destrucción del tejido neural. Tales marcadores funcionales incluyen fármacos citotóxicos tales como 5-fluorouracilo o ricina y enzimas tales como carboxipeptidasa bacteriana o nitroreductasa, que son capaces de convertir profármacos en fármacos activos en el sitio. Se contemplan inmunoconjugados o proteínas de fusión de anticuerpos, en donde los anticuerpos y fragmentos de los mismos están conjugados o unidos a otras moléculas o agentes incluyen además, pero sin limitación, miembros de unión conjugados a un agente de ablación química, toxina, inmunomodulador, citocina, agente citotóxico, agente quimioterapéutico o droga. Cuando se usan etiquetas radiactivas, se pueden utilizar procedimientos conocidos de recuento disponibles actualmente para identificar y cuantificar los miembros de unión específica. En el caso en el que la etiqueta es una enzima, la detección se puede llevar a cabo mediante cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas,

amperométricas o gasométricas utilizadas actualmente conocidas en la técnica.

[0123] El experto en la materia puede utilizar modelos animales in vivo de complicaciones que dan como resultado daño en el SNC, incluyendo lesión o daño de células nerviosas o afecciones neurodegenerativas, para cribar, evaluar y/o verificar adicionalmente los anticuerpos o fragmentos de los mismos, variantes de los mismos, o combinaciones de los mismos, o de combinaciones con otros anticuerpos reactivos del SNC. Dichos modelos animales incluyen, pero no se limitan a, modelos de afecciones o enfermedades asociadas con daño, compromiso, alteración, muerte, lesión o degeneración de las células nerviosas. Los modelos incluyen los de o que imitan aspectos de apoplejía, lesión cerebral, isquemia, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, demencia, encefalitis, meningitis, ELA o enfermedad de la neurona motora. Los modelos de trazos que utilizan la oclusión de la arteria cerebral media en primates, tales como mandriles, monos o macacos son conocidos en la técnica y pueden ser adecuados (Young A et al (1997) Stroke 28: 1471-1476; delZoppo GJ et al (1986) Stroke 17: 1254 - 1265; Marshall y Ridley 91996) Neurodegeneration 5: 275 - 286). Los modelos de EM tales como TMEV son conocidos, descritos y utilizados en este documento. Los modelos de ratón SOD para ELA y la enfermedad de neurona motora son conocidos y se describen y se utilizan en este documento (Gurney ME et al (1994) Science 264: 1772-1775).

[0124] Los anticuerpos, fragmentos de los mismos y anticuerpos recombinantes que comprenden la región variable de secuencias de acuerdo la invención pueden ser utilizados en métodos de tratamiento, prevención o diagnóstico del cuerpo humano o animal, tales como un método de neuroprotección en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de los anticuerpos, fragmentos de los mismos y anticuerpos recombinantes. Los anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos que comprenden las secuencias de la región de dominio CDR de acuerdo con la descripción pueden usarse en tales métodos. Los agentes de la divulgación, particularmente anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos, pueden usarse como agentes neuroprotectores en métodos para prevención, tratamiento o mejora de la lesión nerviosa, daño o compromiso y complicaciones que pueden dar como resultado daño en el SNC. Los métodos son aplicables cuando la pérdida de estructura, función o supervivencia de las neuronas está involucrada o asociada, incluyendo lesión o trauma cerebral, lesión de la médula espinal (LME), lesión nerviosa, lesión en la cabeza, condiciones donde el suministro de sangre al cerebro se reduce o se compromete, enfermedades infecciosas del cerebro, enfermedades neurodegenerativas. Ejemplos de tales enfermedades o condiciones para el tratamiento, prevención o mejora incluyen lesión de la médula espinal (LME), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Alzheimer, apoplejía, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, anoxia prenatal/isquemia perinatal y/o parálisis cerebral, encefalopatía, mielopatía y enfermedades de las neuronas motoras.

[0125] En este documento se describen métodos para tratar o mejorar enfermedades o afecciones en mamíferos donde los nervios están comprometidos, lesionados o escenarios donde los nervios o neuronas son susceptibles o en riesgo de compromiso, lesión o daño que comprende administrar un anticuerpo recombinante o completamente humano o fragmento del mismo seleccionado de IgM12 e IgM42. Los métodos de la divulgación pueden comprender la administración de más de un anticuerpo o fragmento, que incluye combinaciones de anticuerpos IgM12 y 42. En un método adicional adicional, uno o más anticuerpos IgM12 y/o anticuerpos IgM42 se pueden combinar con otro anticuerpo activo del SNC. particularmente incluyendo uno o más de los anticuerpos rHlgM22 y/o rHlgM46. Las combinaciones de anticuerpos se pueden administrar colectivamente o en serie, y en diversos momentos y diversas cantidades o concentraciones. De este modo, el anticuerpo 12 y/o 42 pueden administrarse en combinación con el anticuerpo 22 y/o 46, mediante administración combinada o en serie, separados por un corto período de tiempo o mayor tiempo, que incluyen horas, días o semanas. El anticuerpo 12 y/o 42 pueden administrarse particularmente en combinación con el anticuerpo 22 y/o 46 (sHlgM22, rHlgM22, sHlgM46 o rHlgM46), mediante administración combinada o en serie para el tratamiento de la mejora de una enfermedad o afección que implica neurodegeneración, y particularmente incluida la desmielinización. En uno de dichos métodos, el anticuerpo 12 y/o 42 se administra en combinación con el anticuerpo 22 y/o 46, mediante administración combinada o en serie para el tratamiento de la mejora de una enfermedad o afección desmielinizante, que incluye particularmente esclerosis múltiple (EM). Las secuencias variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo IgM22 se exponen en la SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44, respectivamente. Las secuencias variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo IgM46 se exponen en la SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46, respectivamente. Uno o más anticuerpos IgM12 y/o anticuerpos IgM42 se pueden combinar con uno o más anticuerpos remielinantes que comprenden (a) CDRs de región variable de cadena pesada que comprenden secuencia CDR1 SSGMH secuencia CDR2 V(I)SYDGSRKYYADSVKVG y secuencia CDR3 GVTGSPTLDY y región variable de cadena ligera CDR que comprenden secuencia CDR1 SGSSNIGNNFVS secuencia CDR2 DITKRPS y secuencia CDR3 G(E)TWSSLSAV V; o (b) CDRs de la región variable de la cadena pesada que comprenden secuencia CDR1 SGFTFSSYW secuencia CDR2 IKKDGSEK y secuencia CDR3 ARPNCGGDCYLPWYFD, y CDRs de la región variable de la cadena ligera que comprenden secuencia CDR1 QSVLYSSNNKNY secuencia CDR2 YWAS y secuencia CDQ3 QQYYNTPQA.

[0126] Los anticuerpos se pueden administrar a un paciente en necesidad de tratamiento a través de cualquier vía adecuada, incluyendo por inyección intraperitoneal, en el torrente sanguíneo o CSF, o directamente en el sitio de la lesión o el compromiso. Una ventaja particular de los anticuerpos a modo de ejemplo para el uso de la presente invención es que cruzan la BBB y, por lo tanto, pueden dirigirse al SNC incluso en la administración i.p. La dosis

precisa dependerá de una serie de factores, incluyendo si el anticuerpo es para el diagnóstico o el tratamiento, el tamaño o extensión y la ubicación de la lesión, la naturaleza precisa del anticuerpo (ya sea anticuerpo completo, fragmento, diacuerpo, etc.), y la naturaleza de cualquier marcador detectable o funcional unido al anticuerpo. Cuando se utiliza un radionúclido para la terapia, una dosis única máxima adecuada puede ser de aproximadamente 45 mCi/m², hasta un máximo de aproximadamente 250 mCi/m². La dosificación preferida está en el intervalo de 15 a 40 mCi, con un intervalo de dosificación preferido adicional de 20 a 30 mCi, o de 10 a 30 mCi. Tal terapia puede requerir reemplazo de médula ósea o células madre. Los anticuerpos desnudos aprobados clínicamente generalmente se administran en cantidades de mg, con dosis para adultos de 20 a 2000 mg de proteína por dosis, de 20 a 1500 mg de proteína por dosis, o de 20 a 1000 mg de proteína por dosis, o de 20 a 500 mg de proteína por dosis o 20 a 100 mg de proteína por dosis. Los anticuerpos monoclonales inyectables aprobados clínicamente se administran en cantidades de mg, 3-5 mg/kg, 5-10 mg/kg por dosis, 300-400 mg/dosis, 300-500 mg/dosis (Newsome BW y Ernstoff EM (2008) Br J Clin Pharmacol 66 (1): 6-19; herceptin.net, tysabri.net, avastin.net, remicade.com). Es notable que el anticuerpo remielinizante IgM22 ha demostrado ser eficaz en dosis comparativamente significativamente menores, en el rango de µg, y es capaz de cruzar la BHE para ser activo en el SNC incluso con una sola dosis de anticuerpo (WO 2004/110355; Warrington AE y col. (2007) J Neurosci Res 85 (5): 967 - 976). El anticuerpo IgM12 recombinante se muestra en la presente memoria que tiene actividad terapéuticamente relevante en modelos animales con una sola dosis i.p. en el intervalo de µg. Por lo tanto la dosificación de los anticuerpos para el uso de la presente invención, ya sea en dosis única o dosis múltiples y/o periódicas, en el intervalo de µgs por dosis o dosis de µg/kg, o en bajo mg por dosis (100 µg - 1 mg, menos de 1 mg, 1 mg-5 mg, 1 mg-10 mg, 5 mg-15 mg, 10 mg-20 mg por dosis), puede ser aplicable y efectivo. Una dosis para un solo tratamiento de un paciente adulto, puede ajustarse proporcionalmente para niños y bebés, y también ajustarse para otros formatos de anticuerpos, en proporción, por ejemplo, al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, dos veces por semana, semanales o mensuales, a discreción del médico. Una ventaja de los anticuerpos a modo de ejemplo es que cruzan la BBB y los sitios diana de daño o lesión, facilitando así el uso de dosis menores y potencialmente menores para lograr efectos adecuados.

Composiciones farmacéuticas y terapéuticas

[0127] Los anticuerpos o fragmentos se administrarán habitualmente en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del/los anticuerpo(s) o fragmentos. Por tanto, las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables, bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, o mediante inyección, por ejemplo, por vía intravenosa, o por deposición en un sitio tumoral.

[0128] Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en forma de tableta, cápsula, polvo o líquido. Una tableta puede comprender un portador sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio de afección, el ingrediente activo puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica son capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como Inyección de Cloruro de sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Ringer de lactato. Se pueden incluir conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario.

[0129] Una composición se puede administrar sola o en combinación con otros tratamientos, agentes terapéuticos o agentes, ya sea de manera simultánea o secuencial dependiendo de la afección a tratar. Se contemplan las composiciones que comprenden combinaciones de uno o más anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos como se describe en este documento. Además, la presente descripción contempla e incluye composiciones que comprenden el anticuerpo o fragmento del mismo, descrito aquí y otros agentes o agentes terapéuticos tales como agentes neuroactivos o terapéuticos, agentes antiinflamatorios, agentes moduladores de la liberación de neurotransmisores, ligandos de neuroreceptores o agonistas o antagonistas, canales de calcio. agentes, inmunomoduladores u otros anticuerpos reactivos del SNC. Se contemplan las composiciones que comprenden combinaciones de uno o más anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos como se describe en este documento. Otros tratamientos o terapéuticos pueden incluir la administración de dosis adecuadas de fármacos para el alivio del dolor tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, aspirina, paracetamol, ibuprofeno o ketoprofeno) u opiáceos tales como morfina o antieméticos. Además, la composición se puede administrar con inmunomoduladores, como interleucinas, factor de necrosis tumoral (TNF) u otros factores de crecimiento, factores estimulantes de colonias, citocinas u hormonas como la dexametasona que estimulan la respuesta inmune y la reducción o eliminación del células decáncer o tumores. La composición también se puede administrar con, o puede incluir, combinaciones junto con otros anticuerpos reactivos del SNC, que incluyen particularmente anticuerpos remielinizantes, que incluyen rHlgM22 y/o rHlgM46.

[0130] La presente divulgación además contempla composiciones terapéuticas útiles en la práctica de los métodos terapéuticos de la divulgación. Una composición terapéutica sujeto incluye, en mezcla, un excipiente (vehículo) farmacéuticamente aceptable y uno o más de un anticuerpo, un análogo polipeptídico del mismo o un fragmento del mismo, como se describe aquí como un ingrediente activo. En una realización preferida, la composición comprende un antígeno capaz de modular la unión específica del presente miembro de unión/anticuerpo con una célula diana. La preparación de composiciones terapéuticas o farmacéuticas que contienen anticuerpos, polipéptidos o fragmentos activos como ingredientes activos se comprende bien en la técnica. Típicamente, tales composiciones se preparan como inyectables, como soluciones líquidas o suspensiones. Sin embargo, también se puede preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse. El ingrediente terapéutico activo a menudo se mezcla con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH que mejoran la eficacia del ingrediente activo. Se puede formular un anticuerpo o fragmento activo en la composición terapéutica como formas de sal farmacéuticamente aceptables neutralizadas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido o molécula de anticuerpo) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas a partir de los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, y similares.

[0131] Las composiciones que contienen anticuerpos terapéuticos o fragmentos activos se administran convencionalmente por vía intraperitoneal o intravenosa, por ejemplo mediante inyección de una dosis unitaria. El término "dosis unitaria" cuando se usa en referencia a una composición terapéutica de la presente invención se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitaria para humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido; es decir, portador o vehículo.

[0132] Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad terapéuticamente efectiva. La cantidad a administrar depende del sujeto que se va a tratar, la capacidad del sistema del sujeto para utilizar el ingrediente activo y el grado de capacidad de unión a la neurona deseada o el grado de lesión neural. Las cantidades precisas de ingrediente activo requeridas para administrarse dependen del juicio del médico y son peculiares de cada individuo. Los regímenes adecuados para la administración inicial y la administración posterior también son variables, y pueden incluir una administración inicial seguida de dosis repetidas a intervalos de una o más horas, días, semanas o meses mediante una inyección posterior u otra administración. Alternativamente, se contempla una infusión o administración continua suficiente para mantener concentraciones apropiadas y suficientes en la sangre, el SNC o en el sitio de la terapia deseada.

[0133] El momento de administración puede variar y puede ser determinada por el experto en la técnica o profesional médico, basado en la enseñanza de la memoria descriptiva, los parámetros clínicos del paciente o sujeto, el estado o la gravedad de la condición o enfermedad, o el grado o naturaleza de lesión neural, o compromiso. Por lo tanto, la mejora en la función neuronal o la protección mejorada de las neuronas, por ejemplo, de muerte o compromiso, puede mejorarse mediante la administración temprana en el inicio o la demostración clínica de una enfermedad, a fin de minimizar el grado de daño o compromiso neurológico. En un aspecto, el momento de la administración se coordina con evaluaciones de la función neurológica, determinación del estado y/u otras evaluaciones clínicas a fin de minimizar o aliviar la progresión de la enfermedad de daño o deterioro neurológico.

Ensayos de diagnóstico

[0134] La presente descripción también se refiere a una variedad de aplicaciones de diagnóstico, que incluyen métodos para detectar o determinar daño de células nerviosas, lesión o compromiso. Los anticuerpos y fragmentos de la divulgación pueden utilizarse para evaluar, cuantificar, dirigir y/o formar imágenes de neuronas, *in vitro* o *in vivo*. Los presentes anticuerpos que incluyen fragmentos de los mismos y fármacos que modulan la producción o actividad de los miembros de unión específica, anticuerpos y/o sus subunidades pueden poseer ciertas aplicaciones de diagnóstico y pueden, por ejemplo, utilizarse con el fin de detectar y/o medir condiciones o enfermedades que implican compromiso de neuronas, degeneración, lesión, daño o muerte. Los anticuerpos marcados, incluidos los radiomarcados, y sus fragmentos, son útiles en técnicas de diagnóstico *in vitro* y en técnicas de radioimagen *in vivo* y en radioinmunoterapia. En el caso de la formación de imágenes *in vivo*, los anticuerpos o fragmentos de la presente descripción pueden conjugarse con un agente de formación de imágenes en lugar de un radioisótopo o isótopos, que incluyen, pero no se limitan a un agente potenciador de la imagen de resonancia magnética cargado con una gran cantidad de iones paramagnéticos a través de grupos quelantes. Los ejemplos de grupos quelantes incluyen EDTA, porfirinas, éteres de corona de poliaminas, y polioximas. Los ejemplos de iones paramagnéticos incluyen gadolinio, hierro, manganeso, renio, europio, lananio, holmio y ferbio. En un aspecto adicional, los anticuerpos radiomarcados y sus fragmentos, particularmente los radioinmunoconjugados, son útiles en

radioinmunoterapia, particularmente como anticuerpos radiomarcados para terapia celular. En otro aspecto adicional, los miembros de unión específica radiomarcados, particularmente anticuerpos y fragmentos de los mismos, son útiles en técnicas de cirugía radioinmunológica guiada, en las que pueden identificar e indicar la presencia y/o localización de neuronas comprometidas o dañadas o los sitios de lesión del nervio, durante o después de la cirugía para apuntar o eliminar tales células o para trasplantar o administrar células a esos sitios específicos.

[0135] La radioinmunoterapia (RAIT) ha ingresado en la clínica y ha demostrado eficacia usando varios inmunoconjugados de anticuerpos. Se ha evaluado el anticuerpo hMN-14 de antígeno carcinoembrionario (anti-CEA) humanizado marcado con ¹³¹I en cáncer colorrectal (Behr TM y col. (2002) *Cancer* 94 (4Suppl): 1373-81) y el mismo anticuerpo con la etiqueta 90Y se ha evaluado en el carcinoma de tiroides medular (Stein R et al (2002) *Cancer* 94 (1): 51-61). La radioinmunoterapia con anticuerpos monoclonales también se ha evaluado e informado para el linfoma no Hodgkin y el cáncer de páncreas (Goldenberg DM (2001) *Crit Rev Oncol Hematol* 39 (1-2): 195-201; Gold DV y cols. (2001) *Crit Rev. Oncol Hematol* 39 (1-2) 147-54). Los métodos de radioinmunoterapia con anticuerpos particulares también se describen en las patentes de los Estados Unidos 6.306.393 y 6.331.175. La cirugía radioinmunoguiada (RIGS) también ha ingresado en la clínica y ha demostrado eficacia y utilidad, incluido el uso de anticuerpos anti-CEA y anticuerpos dirigidos contra antígenos asociados a tumores (Kim JC et al (2002) *Int J Cancer* 97 (4): 542-7; Schneebaum S et al (2001) *World J Surg* 25 (12): 1495 - 8; Avital S et al (2000) *Cancer* 89 (8): 1692 - 8; McIntosh DG et al (1997) *Cancer Biother Radiopharm* 12 (4): 287-94).

[0136] Los anticuerpos radiomarcados y sus fragmentos son útiles en técnicas de diagnóstico *in vitro* y en técnicas de radiomágenes *in vivo*. Los anticuerpos y fragmentos de los mismos, particularmente radioinmunoconjugados, son útiles en radioinmunoterapia, particularmente como anticuerpos radiomarcados para la reparación de lesiones nerviosas, recuperación neurodegenerativa, cáncer o terapia tumoral del SNC, o alternativamente para la ablación de tejido nervioso o neuronas dañadas en ciertos casos. En un aspecto *in vivo*, el anticuerpo o fragmento de unión a neurona del mismo se marca y se administra al animal antes, durante o después de la cirugía o una técnica quirúrgica, incluida una técnica estereotáxica o mínimamente invasiva, con el fin de localizar lesiones nerviosas o evaluar resto del tejido neural dañado o lesionado. En uno de tales aspectos, los miembros de unión específica radiomarcados, particularmente anticuerpos y fragmentos de los mismos, son útiles en técnicas de cirugía radioinmunogénica, en las que pueden identificar e indicar la presencia y/o localización de células nerviosas o neuronas comprometidas, dañadas, lesionadas o moribundas o tejido nervioso, antes, durante o después de la cirugía para identificar, o eliminar tales células.

[0137] Las aplicaciones de diagnóstico de los anticuerpos y fragmentos de las mismas de la divulgación incluyen aplicaciones *in vitro* e *in vivo* bien conocidas y estándar para el experto en la materia y basadas en la presente descripción. Los ensayos y kits de diagnóstico para la evaluación y evaluación *in vitro* de neuronas o tejido nervioso se pueden utilizar para diagnosticar, evaluar y controlar muestras de pacientes, incluidos los que se sabe que tienen o se sospecha que tienen afecciones neurológicas o enfermedades donde las células nerviosas están comprometidas, dañadas o lesionadas. determinar el grado de muerte o lesión celular o de un tumor o cáncer del SNC, incluso en una muestra de un paciente o sujeto. La evaluación del estado de enfermedad neurológica también es útil para determinar la idoneidad de un paciente para un ensayo clínico de un fármaco o para la administración de un agente neuroterapéutico o quimioterapéutico particular o un anticuerpo, incluidas combinaciones de los mismos, frente a un agente o anticuerpo diferente.

[0138] Se describe aquí un sistema de ensayo que se puede preparar en forma de un kit de prueba para el análisis cuantitativo de la extensión de la presencia de, por ejemplo, neuronas dañadas, comprometidas o lesionadas o para cuantificar neuronas en una muestra. El sistema o kit de prueba puede comprender un componente marcado preparado por una de las técnicas radiactivas y/o enzimáticas discutidas en la presente, acoplado a una etiqueta al anticuerpo, y uno o más reactivos inmunoquímicos adicionales, al menos uno de los cuales es un componente libre o inmovilizado para ser determinado o su(s) socio(s) vinculante(s).

[0139] En una realización adicional, se pueden preparar kits de prueba comerciales adecuados para uso por un especialista médico en base a lo anterior para determinar el estado de las neuronas en una muestra. De acuerdo con las técnicas de prueba discutidas anteriormente, una clase de tales kits contendrá al menos el anticuerpo marcado o su compañero de unión, por ejemplo, un anticuerpo específico para el mismo, y las instrucciones, por supuesto, dependiendo del método seleccionado, por ejemplo, "competitivo", "sandwich", "DASP" y similares. Los kits también pueden contener reactivos periféricos tales como tampones, estabilizadores, etc.

[0140] Por consiguiente, se puede preparar un kit de prueba para la demostración de la presencia o determinación del estado de las neuronas, que comprende:

- (a) una cantidad predeterminada de al menos un componente inmunoquímicamente reactivo marcado obtenido por la unión directa o indirecta del presente anticuerpo o fragmento o un asociado de unión específico al mismo, a un marcador detectable;
- (b) otros reactivos; e
- (c) instrucciones para el uso de dicho kit.

[0141] Se puede preparar un kit de prueba para la demostración de la presencia de lesión, daño o compromiso de las células nerviosas que comprende:

- 5 (a) una cantidad predeterminada de al menos un componente inmunoquímicamente reactivo marcado obtenido mediante la unión directa o indirecta del presente anticuerpo o una pareja de unión específica al mismo, a un marcador detectable;
- (b) otros reactivos; e
- (c) instrucciones para el uso de dicho kit.

10 Ácidos nucleicos

[0142] Aquí se describe un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo, particularmente un anticuerpo recombinante, en particular un anticuerpo completamente humano, de la presente divulgación. El ácido nucleico incluye ADN y ARN. En un aspecto preferido, en el presente documento se describe un ácido nucleico que codifica un polipéptido como se definió anteriormente, que incluye un polipéptido como se establece en las Figuras 5 o 6 o capaz de codificar las regiones CDR del mismo.

[0143] Aquí se describen constructos en forma de plásmidos, vectores, transcripción o casetes de expresión que comprenden al menos un polinucleótido como anteriormente. Aquí se describe una célula huésped recombinante que comprende una o más construcciones como anteriormente. Un ácido nucleico que codifica cualquier anticuerpo o fragmento como se proporciona forma un aspecto de la presente descripción, como lo hace un método de producción del miembro de unión específica, método que comprende la expresión del ácido nucleico que lo codifica. La expresión se puede lograr convenientemente cultivando en condiciones apropiadas células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción por expresión, un miembro de unión específico puede aislarse y/o purificarse usando cualquier técnica adecuada, y luego usarse según sea apropiado.

[0144] Los anticuerpos y las moléculas de ácido nucleico codificadoras y vectores de acuerdo con la presente descripción pueden ser proporcionarse aisladas y/o purificadas, por ejemplo, de su ambiente natural, en forma sustancialmente pura o homogénea, o, en el caso del ácido nucleico, libre de o sustancialmente libre de ácido nucleico o de un origen de genes distinto de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. El ácido nucleico de acuerdo con la presente descripción puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético.

[0145] Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células huésped son bien conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamíferos, levaduras y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de hámster bebé, células cancerosas, células de cáncer de ovario y muchas otras. Un huésped bacteriano común y preferido es *E. coli*. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células procariotas tales como *E. coli* está bien establecida en la técnica. Se pueden elegir o construir vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, virales, por ejemplo, fagos o fagémidos, según corresponda. Para más detalles, véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en Short Protocols in Molecular Biology, Segunda Edición, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992.

[0146] Por lo tanto, un aspecto adicional de la presente divulgación es una célula huésped que contiene ácido nucleico como se describe en el presente documento. Otro aspecto adicional es un método que comprende introducir dicho ácido nucleico en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir la transfección con fosfato de calcio, DEAE-Dextrano, electroporación, transfección y transducción mediada por liposomas utilizando retrovirus u otros virus, por ejemplo, vaccinia o, para células de insectos, baculovirus. Para las células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir la transformación del cloruro de calcio, la electroporación y la transfección usando un bacteriófago. La introducción puede ir seguida de causar o permitir la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando células huésped en condiciones para la expresión del gen. La presente descripción también incluye un método que comprende usar una construcción como se indicó anteriormente en un sistema de expresión para expresar un miembro o polipéptido de unión específico como se ha indicado anteriormente.

[0147] Otra característica de esta descripción es la expresión de las secuencias de ADN descritas en este documento. Como es bien sabido en la técnica, las secuencias de ADN pueden expresarse uniéndolas operativamente a una secuencia de control de la expresión en un vector de expresión apropiado y empleando ese vector de expresión para transformar un huésped unicelular apropiado. Se puede emplear una amplia variedad de combinaciones de vector de huésped/expresión para expresar las secuencias de ADN de esta descripción. Los

vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas. Los vectores adecuados incluyen derivados de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, por ejemplo, plásmidos de *E. coli* col EI, pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos tales como RP4; ADN de fago, por ejemplo, los numerosos derivados de fago λ , por ejemplo, NM989, y otro ADN de fago, por ejemplo, M13 y ADN de fago monocatenario filamentosos; plásmidos de levadura tales como el plásmido 2u o derivados de los mismos; vectores útiles en células eucariotas, tales como vectores útiles en células de insectos o mamíferos; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, tales como plásmidos que se han modificado para emplear ADN de fago u otras secuencias de control de la expresión; y similares. Cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión - secuencias que controlan la expresión de una secuencia de ADN unida operativamente - puede usarse en estos vectores para expresar las secuencias de ADN de esta descripción. Dichas secuencias de control de expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores temprano o tardío de SV40, CMV, vaccinia, polioma o adenovirus, el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *TAC*, el sistema *TRC*, el sistema *LTR*, el operador principal y regiones promotoras del fago λ , las regiones de control de proteína cubierta de fd, el promotor de quinasa de 3-fosfoglicerato u otras enzimas glicolíticas, los indicadores de la fosfatasa ácida (por ejemplo, Pho5), los promotores de los factores de apareamiento D de levadura, y otras secuencias conocidas para controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y diversas combinaciones de los mismos.

[0148] Una amplia variedad de células huésped unicelulares también son útiles para expresar las secuencias de ADN de esta descripción. Estos huéspedes pueden incluir huéspedes eucariotas y procariotas bien conocidas, tales como cepas de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, hongos como levaduras y células animales, como CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1.1, células B-W y L-M, células de riñón de mono verde africano (p. ej., COS 1), COS 7, BSC1, BSC40 y BMT10), células de insectos (por ejemplo, Sf9), y células humanas y células de plantas en cultivo de tejidos.

[0149] Se entenderá que no todos los vectores, secuencias de control de expresión y huéspedes funcionarán igualmente bien para expresar las secuencias de ADN de esta descripción. Tampoco todos los huéspedes funcionarán igual de bien con el mismo sistema de expresión. Sin embargo, un experto en la técnica podrá seleccionar los vectores, las secuencias de control de la expresión y los huéspedes adecuados sin experimentación indebida para lograr la expresión deseada sin apartarse del alcance de esta descripción. Al seleccionar una secuencia de control de expresión, normalmente se considerarán una variedad de factores. Estos incluyen, por ejemplo, la fuerza relativa del sistema, su controlabilidad y su compatibilidad con la secuencia de ADN particular o el gen que se va a expresar, particularmente con respecto a las estructuras secundarias potenciales. Los huéspedes unicelulares adecuados se seleccionarán teniendo en cuenta, por ejemplo, su compatibilidad con el vector elegido, sus características de secreción, su capacidad para plegar proteínas correctamente y sus requisitos de fermentación, así como la toxicidad para el huésped del producto codificado por las secuencias de ADN a expresarse y la facilidad de purificación de los productos de expresión. Teniendo en cuenta estos y otros factores, un experto en la técnica podrá construir una variedad de combinaciones vector/control/secuencia de control de expresión que expresarán las secuencias de ADN de esta descripción en fermentación o en cultivo de animales a gran escala.

[0150] Una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo o fragmento de la misma puede prepararse sintéticamente en lugar de clonarse. La secuencia de ADN se puede diseñar con los codones apropiados para la secuencia de aminoácidos del miembro de unión específica. En general, se seleccionarán los codones preferidos para el huésped deseado si la secuencia se usará para la expresión. La secuencia completa se ensambla a partir de oligonucleótidos solapantes preparados por métodos estándar y se ensamblan en una secuencia codificante completa. Véase, por ejemplo, Edge, Nature, 292: 756 (1981); Nambair et al., Science, 223: 1299 (1984); Jay y otros, J. Biol. Chem., 259: 6311 (1984). Las secuencias de ADN sintético permiten la construcción conveniente de genes que expresarán análogos de miembros de unión específica o "muteínas". Alternativamente, el ADN que codifica muteínas puede prepararse mediante mutagénesis dirigida a un sitio de genes o ADNc de miembros de unión específicos nativos, y las muteínas pueden prepararse directamente usando la síntesis de polipéptidos convencional.

[0151] La invención puede entenderse mejor por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que se proporcionan como ejemplos de la invención. Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención y de ningún modo deben interpretarse como limitativos del amplio alcance de la invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Identificación de autoanticuerpos naturales (NatAbs) que se unen a las células del sistema nervioso

[0152] IgM humanos de suero natural que se unen a las neuronas se identificaron mediante el cribado del banco de suero Mayo Clinic, que contiene más de 140,000 muestras recogidas durante 45 años, para candidatas con un alto pico monoclonal de IgG o IgM (más de 10 mg/ml en la sangre) y luego pruebas de suero para la unión de anticuerpos a cortes de corteza cerebral y cerebelo vivos (31). Tales IgM se purificaron a partir de muestras positivas

y se analizaron adicionalmente para 1) unión a la superficie de neuronas primarias aisladas 2) como sustratos para el soporte de la extensión de neuritas 3) la capacidad de proteger a las neuronas de la apoptosis frente a moléculas estresantes. Este protocolo de selección se basa en el usado para identificar IgM humanas que se unen a oligodendrocitos y promueven la remielinización en modelos de EM (22, y como se describe en el documento WO 0185797). El reconocimiento de la superficie de células o tejidos apropiados parece ser una característica definitoria importante de las IgM terapéuticas.

[0153] Dos IgM de unión neuronal humanas distintas derivadas del suero han sido identificadas (sHlgM12 y sHlgM42). Ciertas características de estos anticuerpos derivados de suero se enumeran en la TABLA 1. Los sHlgM12 y sHlgM42 derivados de suero se han demostrado inicialmente in vitro para soportar la extensión de neurita así como la laminina de sustrato potente y para anular la inhibición de neurofiliinas de la mielina del SNC (23).

[0154] Estudios adicionales han demostrado que sHlgM12 derivado de suero mejora la función espontánea en ratones infectados con TMEV, según se evalúa por la actividad nocturna espontánea media por hora en ratones (21). En contraste con IgM NatAbs identificados previamente (sHlgM22 y sHlgM46), ni sHlgM12 ni sHlgM42 promueven la remielinización de la médula espinal.

Tabla 1 - IgM humanas terapéuticas

IgM humana	Promueve remielinización	Apoya extensión de neurita	Se une a oligodendrocitos	Se une a neuronas
sHlgM12	no	sí	No	sí
sHlgM42	no	sí	No	sí
sHlgM22	sí	no	sí	no
sHlgM46	sí	no	sí	no
sHlgM39	no	no	No	No

[0155] A menudo, se cree que los autoanticuerpos son patógenos. Por el contrario, como se demuestra en la presente memoria, los autoanticuerpos contra neuronas (sHlgM12 y sHlgM42 y anticuerpos recombinantes basados en los mismos) no matan a las neuronas. En cambio, estas IgM protegen a las neuronas de la muerte, promueven la extensión de las neuritas, aumentan la NAA in vivo, protegen los axones in vivo en el modelo TMEV y mejoran la función espontánea nocturna de los ratones enfermos de TMEV.

[0156] Los anticuerpos de unión de neuronas IgM12 y IgM42 se dirigen a neuronas en lesiones del SNC y aplicables para revertir la pérdida neuronal y/o mejorar los efectos de lesión neuronal o enfermedad. IgM humanas de unión a neurona representan una nueva clase de agentes terapéuticos con aplicación única para diversas enfermedades y afecciones que involucran neurodegeneración, lesión neuronal o muerte neuronal. Dichas enfermedades incluyen, sin limitación, EM, lesión de la médula espinal, ELA, enfermedad de Alzheimer, lesión cerebral traumática, eventos cerebrovasculares o accidente cerebrovascular. Estas IgM humanas han sido mínimamente antigénicas cuando se administran sistémicamente en animales.

Identificación y caracterización de IgM humanas que se unen a la superficie de múltiples tipos de neuronas vivas:

[0157] Las muestras de suero con una alta concentración de IgG o IgM (> 10 mg/ml) fueron seleccionadas para la unión a Ab a capas neuronales en cortes de tejido del SNC vivos (corteza y cerebelo). De 152 sueros ensayados, 17 sueros humanos fueron positivos en cortes de tejido (23).

[0158] Los anticuerpos sHlgM12 y sHlgM42 se unen a la superficie de una amplia variedad de neuronas que coetiquetan con marcadores neuronales neurofilamento o tubulina β III. Estos incluyen células granulares cerebelosas (23), neuronas corticales, neuronas del hipocampo, neuronas de la biopsia del lóbulo temporal humano (FIGURA 1) y células ganglionares de la retina (datos no mostrados). rHlgM12 tiñe el soma, las neuritas y los conos de crecimiento de las neuronas del hipocampo (datos no mostrados). Esta reactividad cruzada sugiere que las IgM humanas pueden actuar sobre las células del SNC afectadas en una serie de afecciones/enfermedades neurológicas, tales como EM, esclerosis lateral amiotrófica o apoplejía.

[0159] Los presentes datos indican que la unión de sHlgM12 o sHlgM42 a la superficie de las neuronas depende de los hidratos de carbono. El tratamiento con sialidasa de neuronas en cultivo eliminó la unión de ambas IgM humanas a la superficie celular, mientras que el bloqueo de la síntesis de esfingolípidos con Fumonisina B1 o la eliminación de proteínas unidas a GPI con PIPLC no eliminó la unión de IgM (23). Los gangliósidos son candidatos para los antígenos de estas IgM humanas. En experimentos de co-etiquetado, rHlgM12 se localiza conjuntamente con GM1 en la membrana neuronal (véase el Ejemplo 11 y la FIGURA 21C).

[0160] Aunque comparten ciertas características funcionales tales como provocar el crecimiento de neuritas,

sHlgM12 y sHlgM42 sí demuestran diferencias y son cada uno anticuerpos únicos. Esto es evidente en estudios de unión e inmunofluorescencia; etiquetan la superficie de las células granulares del cerebelo en distintos patrones. En estudios de inmunofluorescencia de células de gránulos cerebelosos de rata en cultivo, los patrones de marcación de la membrana neuronal mediante el uso de estos dos anticuerpos son distintos (FIGURA 2). Las áreas cortas de membrana de neurita están unidas por sHlgM12 lo que da como resultado un patrón puntiforme. Las áreas más grandes de la membrana de neurita están unidas por sHlgM42 dando como resultado un patrón más segmentado.

Ejemplo 2: IgM humanas protegen a las neuronas corticales de la muerte inducida por peróxido

[0161] IgM humanas promotoras de remielinización se han demostrado para proteger los oligodendrocitos en cultivo de la activación de peróxido inducida de la caspasa 3 (33), un marcador de la apoptosis activo. Como se establece en este documento, sHlgM12 o sHlgM42, se evaluaron en protocolos análogos. El sHlgM12 o sHlgM42, respectivamente, y el peróxido se añadieron juntos a cultivos de neuronas corticales primarias de ratón y se ensayó el grado de activación de caspasa 24 horas más tarde (FIGURA 3).

[0162] El tratamiento de las neuronas cultivadas con rHlgM12 dio como resultado la protección del 80% de la activación de la caspasa 3. El tratamiento de las neuronas con sHlgM42 fue protector también con aproximadamente el 40% de la activación de la caspasa 3. Estos resultados fueron significativamente diferentes ($P < 0,01$) en comparación con una IgM humana de control, que resultó en menos del 10% de protección contra la activación de la caspasa 3.

[0163] Por tanto, sHlgM12 o sHlgM42 de unión a neuronas protegieron las neuronas corticales de la muerte celular inducida por peróxido. Por lo tanto, cuando se proporcionó un inductor o agente de daño (o muerte) de células nerviosas, IgM12 e IgM42 evitaron de forma independiente y significativa que ocurriera el daño (o la muerte).

Ejemplo 3: Anticuerpos recombinantes derivados de sHlgM12

[0164] Se han construido dos formas recombinantes de sHlgM12. Cada uno utilizó el mismo vector de expresión que se utilizó previamente para el anticuerpo IgM22 recombinante (rHlgM22) para las cadenas pesada y ligera (22, 28, WO0185797). El vector incluye un gen dHfR seleccionable expresado bajo el control del promotor SV40. Una forma de anticuerpo IgM12 recombinante parcialmente humano con una cadena J de ratón se construyó inicialmente de la siguiente manera, después de eso, anticuerpo producido en células F3B6 de línea de hibridoma humano/de ratón.

[0165] La construcción del vector de anticuerpo IgM12 recombinante (PAD12) se realizó mediante la inserción del ADNc de región variable de cadena pesada con una secuencia líder de la base de datos de nucleótidos y de ADNc completo de la cadena ligera con la secuencia líder adjunta de la base de datos de nucleótidos de una manera similar a la descrita previamente (6), usando los cebadores que se describen a continuación. El vector se representa en la Figura 4. La secuencia de la cadena pesada y ligera utilizada para el anticuerpo IgM12 humano recombinante, con regiones variables y constantes, se muestra en la FIGURA 5.

[0166] Los cebadores usados para preparar rHlgM12VH y empalmarlo por extensión de solapamiento (Horton RM y col. (1989) Gene 77: 61-68) a una secuencia líder con un intrón (letras minúsculas) de la base de datos (M29812) son los siguientes:

- (1) Cebador 5' con sitio BspEI: TCC GGA CGG TCC GGG A
- (2) TCC GGA CGG TCC G ggacctct gtgcaagaac atgaaacatc tgtggttctt ccttctctg gtggcagctc ccagatgtga gtatctcagg gatccagaca
- (3) cagg gatccagaca tggggatg ggaggtgct ctgatcccag ggctcactgt gggctctct gtccacaggg gtcctgtccc aggtgcagct gcaggagtcg ggcccaggac
- (4) Cebador 3' con sitio PAC I: CCTTAATTAAGACCTGG AGAGGCCATTCTTACCTGAG GAGACGGTGACCAGGGTTC

[0167] Los cebadores usados para preparar rHlgM12Vk y empalmarlo por extensión de solapamiento (soe) a la secuencia líder de la base de datos (letras minúsculas, accesión X59312) son los siguientes:

- (1) Cebador 5'-Ck a soe lym 12 Vk a Ck: CGA ACT GTGGCT GCA C
- (2) Cebador 3' Ck con Xho 1: CCGCTCGAGTATCTAACACTCTCCCCTGTT
- (3) 5' Lym 12 Vk con Nhe I: AGCATTACTAGCTAGCTC AAGACTCAGCCTGGAC atggaca tgagggtccc cgctcagctc ctggggctcc tgctactctggctccgag gtgccaga tgt GAC ATC CAG ATG ACC CA

[0168] El vector con los genes de anticuerpos sintéticos se introdujo en células de hibridoma F3B6 por electroporación y metotrexato (MTX) de amplificación se realizó como se ha descrito previamente (6).

[0169] Brevemente, se incubaron 8 millones de células de hibridarbinoma de ratón/humano F3B6 (American Type Culture Collection: ATCC) con 10 µg de vector PAD12 linealizado con Bgl II durante 10 min en 800 µl de medio sin suero en cuyo momento se electroporaron en 0.2 V en un Biorad Gene Pulser™ (Biorad, Hercules, CA, EE.UU.).

Después de una incubación de 10 minutos en hielo, las células se diluyeron a 24 ml en RPMI-1640 que contenía 10% de suero de ternera fetal (FC) (Gibco, Carlsbad, CA, EE.UU.). Se sembraron en placas de 24 pocillos y se incubaron a 37°C; 48 h más tarde, las células que contenían el vector se seleccionaron usando metotrexato 1 µM (Calbiochem, La Jolla, CA, EE.UU.). Después de un período de incubación de 2 semanas, las colonias se recogieron en una placa nueva y se les permitió crecer hasta la confluencia. En este punto, el sobrenadante se recolectó y se ensayó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para detectar la presencia de IgM humana. Las colonias positivas se seleccionaron adicionalmente en el transcurso de 2 meses con dosis crecientes de metotrexato que variaban de 1 µM a 200 µM. De esta manera, se generaron células que producían más de 10 µg/ml de IgM.

[0170] El primer anticuerpo recombinante construido como anteriormente no es completamente humano. Para generar una forma completamente humana, se cotransfectaron células CHO (GibcoBRL cat nº 11619) con un vector que codifica la cadena pesada y ligera recombinante bajo el control de un promotor E1A y una construcción que expresa la cadena J humana en pCI (Promega). Las células se seleccionaron con dosis crecientes de metotrexato en una mezcla 50/50 de PowerCho1 e IMDM con 10% de clon cósmico y se subclonaron los clones que produjeron la mayor cantidad de anticuerpo medida por ELISA. Los subclones se expandieron y los viales se congelaron. Ambas formas recombinantes de IgM12 mantienen la unión de neuronas y el carácter de eficacia in vivo de la IgM aislada en suero, pero tienen una semivida más corta en ratones (que puede deberse a diferencias en la glucosilación).

[0171] Un procedimiento similar y comparable se utilizó para construir anticuerpo HIgM42 recombinante en el vector comparable. La secuencia de la cadena pesada y ligera del anticuerpo IgM42 humano, con regiones variables y constantes, se muestra en la FIGURA 6.

Ejemplo 4: Una única dosis periférica de la función neurológica mejorada de rHIgM12 en el modelo TMEV de la esclerosis múltiple (EM)

[0172] En vista del hecho de que rHIgM12 protegió las neuronas primarias en cultivo, y que la discapacidad en el modelo TMEV de EM se correlaciona con la pérdida de axones (2), se usó el tratamiento de ratones infectados con TMEV con rHIgM12 para evaluar la capacidad de ralentizar la progresión de déficits neurológicos.

[0173] Los grupos de 5 ratones a los 90 días después de la infección TMEV, el punto en el que los axones comienzan a ser perdidos, fueron tratados con una única dosis de 100 µg de rHIgM12 o un control de IgM humano. Se seleccionaron aleatoriamente cinco ratones infectados para cada grupo y los registros funcionales de pretratamiento solían estar seguros de que la actividad inicial no era diferente entre los grupos. Se siguió a los ratones como grupos durante 3 días consecutivos durante varias semanas usando cajas de actividad (34, 35). Los cambios en el comportamiento nocturno son medidas sensibles del déficit neurológico en la enfermedad mediada por TMEV. Los cuadros de actividad son cajas de acrílico transparentes con rayos infrarrojos opuestos que crean una cuadrícula a lo largo del recinto que registra todos los movimientos horizontales y verticales. La sensibilidad del ensayo refleja la capacidad de medir el encabritarse y la marcha. En ratones infectados con TMEV las extremidades posteriores se vuelven rígidas y el encabritarse se reduce. Sin embargo, caminar espontáneamente sobre la jaula no se ve tan severamente afectado. Es más fácil para los ratones con extremidades traseras rígidas caminar que encabritarse, e incluso los ratones con enfermedad avanzada pueden ser extremadamente activos durante la noche.

[0174] Cada grupo de tratamiento se ensambló aleatoriamente y se alojó en cajas de actividad durante 72 horas antes del tratamiento, y luego durante 72 horas cada semana después del tratamiento. Las rupturas medias del haz por hora se calcularon para la actividad horizontal y vertical durante las 12 h desde las 18 h. hasta las 6 h durante el período de análisis de 72 h. No hubo diferencias entre los grupos de tratamiento en la actividad horizontal o vertical diurna, que típicamente era inferior a 600 rupturas/hora mientras que dormían los ratones. Sin embargo, se registró un aumento en la actividad horizontal nocturna espontánea en comparación con su línea base previa al tratamiento en el grupo tratado con rHIgM12 ($P < 0,01$, semanas 3 a 7) (FIGURA 7). Una IgM humana de control que no se une a las células no mejora la actividad.

[0175] En contraste con el efecto visto con suero derivado de sHIgM12, y ahora también anticuerpo recombinante rIgM12, en un estudio similar el anticuerpo sHIgM42 humano no alteró la actividad nocturna de ratones infectados con TMEV en las mismas condiciones. Los parámetros de dosificación alternativos para sHIgM42 en el mismo formato de ensayo producen resultados diferentes y más positivos en la actividad nocturna.

[0176] Una posible explicación para la mejora en la función es que las IgM efectivas interfieren con las cargas de virus que dan como resultado menos enfermedad. Sin embargo, esta no parece ser la explicación. Los ratones con enfermedad crónica de TMEV se trataron con una sola dosis de rHIgM12, sHIgM42 o IgM de control, el cerebro y la médula espinal se cosecharon 5 semanas después y luego se midió el nivel de transcripciones genómicas de ARN de TMEV mediante PCR con una sonda a proteína viral 2. Las transcripciones virales no fueron diferentes entre los grupos ($P < 0,01$) (datos no mostrados).

Ejemplo 5: Niveles de NAA en el tronco encefálico de ratones con enfermedad de la médula espinal: un

marcador sustituto no invasivo de la preservación del axón a lo largo de la médula espinal

[0177] NAA es un metabolito asociado con la función de la neurona (36, 37). NAA es el segundo aminoácido más abundante en el cerebro y se restringe casi exclusivamente a las neuronas. La preservación de los niveles de NAA en el tallo cerebral es una medida de la salud general del axón de la médula espinal validado por nuestro grupo utilizando el modelo de ratón TMEV (8). Cuando se dañan los axones en los niveles más bajos de la médula espinal, las células del tronco encefálico mueren, lo que reduce la NAA. Los niveles de NAA medidos por MRS reflejan principalmente la densidad de neuronas. NAA se expresa en otras células neuronales, pero la expresión principal de NAA está en las neuronas. Los estudios del perfil MRS de células SNC purificadas indican que la amplitud de la señal NAA predomina en las neuronas, mientras que la amplitud de la señal NAA de los oligodendrocitos o astrocitos fue del 5% y 10% de la señal neuronal, respectivamente (38).

[0178] Para evaluar adicionalmente la capacidad de sHlgM12 e IgM42 para mejorar la actividad en ratones al preservar la función del axón, usamos un ensayo de formación de imágenes no invasivo y una morfología tradicional para evaluar los axones de la médula espinal. El trazado retrógrado se utilizó para demostrar la disfunción del axón de la médula espinal después de la desmielinización en la enfermedad mediada por TMEV (5). Se midió una reducción drástica de la etiqueta retrógrada desde los axones del nivel torácico hasta el núcleo del tronco encefálico. El tronco encefálico es donde residen muchos de los cuerpos celulares que proyectan tractos axónicos largos a lo largo de la longitud de la médula espinal. Posteriormente, se evaluaron los niveles de N-acetilato aspartato (NAA) en el tronco encefálico mediante espectroscopia de resonancia magnética (MRS) en ratones infectados con TMEV (FIGURA 8) usando un protocolo previamente informado (8).

[0179] Observamos una reducción en NAA de tronco encefálico a lo largo del tiempo en ratones con enfermedad inducida por TMEV (FIGURA 9). Los niveles de NAA se disminuyeron durante los primeros 45 días de infección y permanecieron deprimidos hasta 270 días después de la infección. En ratones SJL infectados con TMEV, la extensión de las mesetas desmielinizantes de la médula espinal a los 90 días después de la infección (39). Es en este momento que la pérdida de axón es notable por la histología en este modelo (2). Por lo tanto, NAA es una medida sensible de la disfunción axonal.

[0180] Después de la última colección de MRS, los axones fueron muestreados sistemáticamente de 6 áreas de materia blanca de apariencia normal dentro de una sección transversal de la médula espinal en el nivel T6. Se eligió este nivel porque proporcionaba una representación global de la pérdida de axones a partir de múltiples lesiones desmielinizadas distribuidas al azar en toda la médula espinal (39). Encontramos que había 30,5% menos de axones en 270 días de ratones infectados con TMEV SJL en comparación con los controles no infectados ($P < 0,001$). Se encontró una correlación positiva entre los niveles de NAA del tallo cerebral y el recuento de axones en el nivel T6 de la médula espinal ($r = 0,823$) (8).

Una dosis única de IgM humana de unión a neuronas preserva los niveles de NAA en el tallo cerebral y los axones en la médula espinal:

[0181] Se evaluó la capacidad de las IgM de unión a neuronas humanas para alterar los niveles de NAA o los recuentos de axones en ratones infectados con TMEV. Por consiguiente, se encontró que cuando los ratones TMEV infectados en el inicio de descenso de axón de médula espinal (90 días después de la infección) fueron tratados con una sola dosis de 100 μg de IgM de unión a neurona sHlgM12 o sHlgM42, la densidad de axones mielinizados en la sustancia blanca normal de la médula espinal torácica fue mayor cuando se midió 10 semanas después.

[0182] Los grupos de 10-15 ratones a los 90 días después de la infección se trataron con una única dosis de 100 μg de sHlgM12, sHlgM42, controlan IgM humano o solución salina (Figura 10). Antes del tratamiento y a las 5 y 10 semanas después, cada ratón se colocó en un imán de calibre pequeño y se recogió MRS en el tronco encefálico. A las 10 semanas, se mataron los ratones, se recogieron las médulas espinales, se incrustó el plástico y se cortaron secciones transversales en el nivel T6 teñido con parafenilamindiamina para visualizar las vainas de mielina, se recogieron 6 imágenes por sección que abarcan 400,000 μm de apariencia normal de la materia blanca y se contaron automáticamente los axones. En los grupos tratados con cualquiera de las dos IgM de unión a neuronas (sHlgM12, sHlgM42), los niveles de NAA se incrementaron a las 5 y 10 semanas más tarde en comparación con los niveles de pretratamiento. Los ratones tratados con IgM de control mostraron una tendencia inferior y los ratones tratados con solución salina se mantuvieron constantes.

[0183] Los niveles de NAA de los grupos tratados con sHlgM12 y sHlgM42 se incrementaron a 9,13 y 9,3 mM, respectivamente, cada uno de los cuales estaba muy por debajo de los niveles de 12,0 mM de ratones no infectados. Cuando los axones en el nivel T6 se compararon entre los grupos de tratamiento (TABLA 2), los ratones tratados con sHlgM12 o sHlgM42 contenían más axones que el grupo tratado con solución salina (17.303 y 17.771 axones en comparación con 15,198 axones, $P = 0,008$ y $P < 0,001$), pero menos que el número de axones contados en ratones no infectados (21.284 axones).

[0184] Estos resultados indicaron que cada uno de los anticuerpos sHlgM12 y rHlgM12 mejoraba la función por preservación de axones, como se evidencia en el modelo TMEV. Aunque el anticuerpo sHlgM42 conserva los

axones en el modelo TMEV, no se observaron cambios demostrables en la evaluación de la actividad nocturna en la prueba inicial. Tras los estudios de rango de dosis, se encuentra que sHlgM42 también logra una mayor actividad en la prueba de actividad nocturna.

5 **[0185]** El uso de MRS de tronco cerebral para evaluar el estado del axón en modelos de ratón de la enfermedad de la médula espinal valida aún más la presente invención; en consecuencia, NAA en el tallo cerebral sirve como un punto final excelente para el uso de ensayos clínicos de estos anticuerpos humanos.

10 **[0186]** Los ratones tratados con sHlgM42 y sHlgM12 con niveles mejorados de NAA también contenían más axones en la médula espinal media torácica. Grupos de 10-15 ratones SJL infectados con TMEV fueron tratados con una única dosis de 100 µg de rHlgM22, sHlgM42, sHlgM12, controlar sHlgM39 y solución salina a los 90 días después de la infección. Diez semanas después del tratamiento, se extrajeron los cordones espinales y se tiñó una sección torácica media con PPD para visualizar la mielina. Seis áreas que abarcan 400,000 µM² de la materia blanca se muestrearon de cada ratón y el número de axones mielinizados contado (1). El promedio del número absoluto de axones mielinizados por T6 de sección transversal ± SEM se enumera en la Tabla 2.

TABLA 2

Tratamiento con IgM de unión a neuronas preserva los recuentos de axones en la médula espinal		
Tratamiento	Número promedio de axones T6	Comparar
sHlgM42	17.771 ± 436	p<0,001
sHlgM12	17.303 ± 505	p=0,008
Control IgM	15.508 ± 627	
Salina	15.198 ± 484	p = 0,701
Ratones no infectados	21.284 ± 829	

Ejemplo 6: IgM de unión a neuronas preservan axones sin promover la remielinización

35 **[0187]** Se han identificado varias IgM humanas (por ejemplo, sHlgM22 y sHlgM46) que se unen a oligodendrocitos y promover la remielinización (22, 40, 41). Como se muestra a continuación, las IgM vinculantes de neuronas mejoran el número y la función de las neuronas sin una remielinización obvia. Sin estar limitados por la teoría, se entiende que el mecanismo de acción se debe a la activación directa de los axones (protección, extensión de neuritas) y/o al activar el sistema inmune innato o adaptativo para secretar factores que protegen a las neuronas. Los resultados presentados anteriormente demuestran claramente que los anticuerpos tienen un efecto directo sobre los axones/neuronas. Dentro de las mismas médulas espinales en las que se midió la preservación y/o el crecimiento del axón mediado por sHlgM12 y sHlgM42, la desmielinización general, la remielinización y la inflamación no fueron diferentes entre los grupos de tratamiento (FIGURA 11).

45 **[0188]** Estos atributos se cuantificaron clasificando los cuadrantes de 10 secciones transversales de médula espinal (6) que representan muestras a lo largo de la longitud de la médula espinal. El grupo tratado con rHlgM22 (control positivo) mostró el aumento esperado en la remielinización, mientras que los ratones tratados con sHlgM12 y sHlgM42 contenían poca remielinización de la médula espinal. En consecuencia, los déficits neurológicos en el modelo TMEV se mejoraron (por ejemplo, IgM12) sin el requisito de remielinización significativa; además, la remielinización no es necesaria para la conservación del axón y/o el rebrote dentro del marco de tiempo examinado.

Ejemplo 7: Vida media en suero de rHlgM12 (con cadena J humana) y sHlgM42

55 **[0189]** Para determinar la vida media de las IgM humanas, rHlgM12 (con la cadena J humana) y sHlgM42, 100 µg de rHlgM12 que contiene la cadena J humana o 100 µg sHlgM42 en 200 µl de solución salina se inyectó en las venas de la cola de ratones normales CD-1 (FIGURA 12). A intervalos definidos (15 minutos, 1, 4, 8, 24, 48 horas), se recogió sangre de grupos de 3 ratones mediante punción cardíaca. El suero se recogió y se analizó la presencia de cadena mu de IgM humana usando un ELISA de tipo sándwich.

60 **[0190]** Para rHlgM12, la vida media entre la primera recogida a los 15 min y la recogida a las 8 h fue de 3,8 h. Para sHlgM42, la vida media entre la primera recolección a los 15 min y la recolección a las 24 h fue de 20,5 h. Estos valores abarcan la vida media del rHlgM22 promotor de remielinización que tiene una vida media en ratones de 15 h (29) y en conejos de 90 h. La vida media se calculó utilizando las fórmulas $K_{elim} = (\ln(C_{pico}) - \ln(C_{bajo})) / t_{intervalo}$ y $t_{1/2} = 0.693 / K_{elim}$.

65 **Ejemplo 8: IgM humanas monoclonales radiomarcadas atraviesan la barrera cerebral sanguínea**

[0191] Se ha aceptado a menudo que las IgM con un peso molecular cercano a 1 millón pueden ser demasiado grandes para cruzar la barrera hematoencefálica (BBB) de la circulación y de ese modo entrar en el SNC (42, 43). Sin embargo, hay cierta evidencia de que algunas IgM cruzan el BBB.

5 [0192] La distribución tisular de rHlgM12 etiquetada con ³⁵S se midió en ratones normales y SJL infectados con TMEV (FIGURA 13). Se administraron 50 µg de rHlgM12 (1 x 10⁷ cpm). Los ratones se perfundieron con solución salina 4 o 24 horas después, los tejidos se recogieron de forma aguda, se trituraron y se disolvieron en fluido de centelleo. El cerebro y la médula espinal de ratones no infectados contenían radiomarca en ambos puntos de tiempo. El SNC de ratones infectados con TMEV contenía el doble de radiomarcador en el punto de tiempo de 4
10 horas que los ratones no infectados; esto aumentó a 4x por 24 horas.

[0193] También se encontró que rHlgM12 (tanto con y sin cadena J humana) y sHlgM42 son capaces de cruzar la BBB en ratones normales y SAMP8, que modelan la enfermedad de Alzheimer. En consecuencia, las IgM humanas
15 marcadas con ¹²⁵I se inyectan por vía i.v. y los cerebros se recogen dos horas después. Cada uno de estos anticuerpos se acumula en los cerebros de ratones normales y enfermos. Estos anticuerpos también revierten el deterioro cognitivo en el modelo murino de la enfermedad de Alzheimer ya sea que la IgM se administre por inyección intracerebral o i.v.

20 **Ejemplo 9: IgM de unión a neurona humana administradas por vía intraperitoneal que entran en lesiones de médula espinal desmielinizada y se localizan en axones positivos de neurofilamentos**

[0194] El estudio de la IgM de ratón de promoción de remielinización marcada isotópicamente, SCH94.03, por Hunter (44) utilizaron autorradiografía para demostrar radiomarcador localizado in vivo en la médula espinal de
25 ratones infectados con TMEV, específicamente a las células que fueron identificadas ultraestructuralmente como oligodendrocitos. Se han realizado estudios de autorradiografía similares con ³⁵S rHlgM12. Mediante el uso de la inmunocitoquímica tradicional, hemos detectado neuronas que se unen a IgM humanas en lesiones de la médula espinal (FIGURA 14).

[0195] Por consiguiente, se administraron 1,0 mg de rHlgM12 (con cadena J humana), sHlgM42 o una IgM humana
30 de control comercial (Jackson Immuno Research) por vía intraperitoneal a ratones infectados con TMEV con desmielinización crónica. Cuatro horas más tarde, los ratones se perfundieron con paraformaldehído, las médulas espinales se seccionaron longitudinalmente y se inmunotifieron para detectar la presencia de la cadena mu de IgM humana. En ratones que recibieron rHlgM12 o sHlgM42, la cadena mu humana se localizó en lesiones desmielinizadas en tramos paralelos, sugiriendo fibras axónicas. La IgM humana de control no se encontró dentro de
35 las lesiones ni en el cordón no lesionado. Por lo tanto, estaba claro que las IgM humanas que se unen a las neuronas rHlgM12 o sHlgM42 cruzan la BBB en ratones infectados con TMEV.

[0196] Las secciones de la médula espinal adyacentes se inmunomarcaron entonces con Abs de anti-neurofilamento
40 (NF) (SMI-32 y 34, Sternberger) seguido de cadena Mu anti-mu de F-ABS humana fluorescente y anti-TRITC de ratón. La microscopía confocal demostró que rHlgM12 y sHlgM42 se co-localizaron con axones NF+ dentro de las lesiones, en pistas paralelas de fibras y como haces de fibras de axones cortados en el extremo (FIGURA 15).

45 **Ejemplo 10: rHlgM12 o sHlgM42 no exacerban la EAE inducida por péptido MOG cuando se administra al inicio de la enfermedad**

[0197] Para abordar las preocupaciones de que la administración de IgM de unión del SNC autorreactivo a animales
50 con autoinmunidad activa pueda exacerbar la enfermedad, los efectos de rHlgM12 y sHlgM42 se ensayaron en ratones con EAE. Grupos de 10 ratones de C57BL6 con EAE inducida por el péptido de MOG (200 µg) se les administró una sola dosis de 100 µg de rHlgM12, sHlgM42, controlan IgM humana o solución salina por vía intravenosa. Se trataron ratones individuales en el momento en que su puntuación clínica alcanzó 1 (cola inerte). Los ratones fueron seguidos por un investigador ciego a los grupos de tratamiento que registraron los pesos y las puntuaciones clínicas clasificadas cada dos días hasta que los ratones llegaron a los 28 días después de la inmunización o estaban moribundos.

[0198] No hubo diferencias entre los grupos de tratamiento en los pesos, o puntuaciones clínicas medias (FIGURA
55 16, P=0,14). Además, 10 secciones transversales de la médula espinal que abarcan toda la médula espinal de cada ratón se clasificaron a ciegas por la presencia de inflamación meníngea y desmielinización en cada cuadrante de la médula espinal (6). No hubo diferencias en el porcentaje de cuadrantes con inflamación meníngea (P=0,825) o desmielinización (P=0,766) en todos los grupos de tratamiento (FIGURA 17). Por lo tanto, se encontró que una sola
60 dosis de neuronas que se unen a IgM humanas que son eficaces para proteger axones en el modelo TMEV no empeora los déficits clínicos de EAE, acelera la progresión del déficit o aumenta la patología de la médula espinal.

REFERENCIAS

65 [0199]

1. Howe, C. L., J. D. Adelson, y M. Rodriguez. 2007. Absence of perforin expression confers axonal protection despite demyelination. *Neurobiol Dis* 25:354-359.
2. McGavern, D. B., P. D. Murray, C. Rivera-Quinones, J. D. Schmelzer, P. A. Low, y M. Rodriguez. 2000. Axonal loss results in spinal cord atrophy, electrophysiological abnormalities and neurological deficits following demyelination in a chronic inflammatory model of multiple sclerosis. *Brain* 123 Pt 3:519-531.
- 5 3. Jones, M. V., T. T. Nguyen, C. A. Deboy, J. W. Griffin, K. A. Whartenby, D. A. Kerr, y P. A. Calabresi. 2008. Behavioral and pathological outcomes in MOG 35-55 experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*.
4. Rodriguez, M., E. Oleszak, y J. Leibowitz. 1987. Theiler's murine encephalomyelitis: a model of demyelination and persistence of virus. *Crit Rev Immunol* 7:325-365.
- 10 5. Ure, D. R., y M. Rodriguez. 2002. Preservation of neurologic function during inflammatory demyelination correlates with axon sparing in a mouse model of multiple sclerosis. *Neuroscience* 111:399-411.
6. Mitsunaga, Y., B. Ciric, V. Van Keulen, A. E. Warrington, M. Paz Soldan, A. J. Bieber, M. Rodriguez, y L. R. Pease. 2002. Direct evidence that a human antibody derived from patient serum can promote myelin repair in a mouse model of chronic-progressive demyelinating disease. *Faseb J* 16:1325-1327.
- 15 7. Van Keulen, V. P., B. Ciric, S. Radhakrishnan, K. L. Heckman, Y. Mitsunaga, K. Iijima, H. Kita, M. Rodriguez, y L. R. Pease. 2006. Immunomodulation using the recombinant monoclonal human B7-DC cross-linking antibody rHlgM12. *Clin Exp Immunol* 143:314-321.
8. Denic, A., A. Bieber, A. Warrington, P. K. Mishra, S. Macura, y M. Rodriguez. 2009. Brainstem (1)H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: Marker of demyelination and repair in spinal cord. *Annals of neurology* 66:559-564.
- 20 9. Duncan, I. D. 1996. Glial cell transplantation and remyelination of the central nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 22:87-100.
10. Fernandez, M., A. Giuliani, S. Pirondi, G. D'Intino, L. Giardino, L. Aloe, R. Levi-Montalcini, y L. Calza. 2004. Thyroid hormone administration enhances remyelination in chronic demyelinating inflammatory disease. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 101:16363-16368.
- 25 11. Craig, C. G., V. Tropepe, C. M. Morshead, B. A. Reynolds, S. Weiss, y D. van der Kooy. 1996. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* 16:2649-2658.
- 30 12. Rodriguez, M. 2007. Effectors of Demyelination and Remyelination in the CNS: Implications for Multiple Sclerosis. *Brain Pathol* 17:219-229.
13. Pitt, D., P. Werner, y C. S. Raine. 2000. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med* 6:67-70.
- 35 14. Okuda, Y., S. Sakoda, H. Fujimura, y T. Yanagihara. 1997. Nitric oxide via an inducible isoform of nitric oxide synthase is a possible factor to eliminate inflammatory cells from the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 73:107-116.
15. Waxman, S. G. 2002. Sodium channels as molecular targets in multiple sclerosis. *J Rehabil Res Dev* 39:233-242.
16. Irvine, K. A., and W. F. Blakemore. 2008. Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration. *Brain* 131:1464-1477.
- 40 17. Linker, R. A., M. Maurer, S. Gaupp, R. Martini, B. Holtmann, R. Giess, P. Rieckmann, H. Lassmann, K. V. Toyka, M. Sendtner, y R. Gold. 2002. CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat Med* 8:620-624.
18. Chang, A., W. W. Tourtellotte, R. Rudick, y B. D. Trapp. 2002. Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 346:165-173.
- 45 19. McTigue, D. M., R. Tripathi, y P. Wei. 2006. NG2 colocalizes with axons and is expressed by a mixed cell population in spinal cord lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:406-420.
20. Franklin, R. J., G. L. Hinks, R. H. Woodruff, y M. T. O'Leary. 2001. What roles do growth factors play in CNS remyelination? *Prog Brain Res* 132:185-193.
- 50 21. Rodriguez, M., A. E. Warrington, y L. R. Pease. 2009. Invited Article: Human natural autoantibodies in the treatment of neurologic disease. *Neurology* 72:1269-1276.
22. Warrington, A. E., K. Asakura, A. J. Bieber, B. Ciric, V. Van Keulen, S. V. Kaveri, R. A. Kyle, L. R. Pease, y M. Rodriguez. 2000. Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 97:6820-6825.
- 55 23. Warrington, A. E., A. J. Bieber, V. Van Keulen, B. Ciric, L. R. Pease, y M. Rodriguez. 2004. Neuron-binding human monoclonal antibodies support central nervous system neurite extension. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:461-473.
24. Radhakrishnan, S., L. T. Nguyen, B. Ciric, D. Flies, V. P. Van Keulen, K. Tamada, L. Chen, M. Rodriguez, y L. R. Pease. 2004. Immunotherapeutic potential of B7-DC (PD-L2) cross-linking antibody in conferring antitumor immunity. *Cancer Res* 64:4965-4972.
- 60 25. Cohen, I. R. 2007. Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus. *J Autoimmun* 29:246-249.
26. Cohen, I. R., y M. Schwartz. 1999. Autoimmune maintenance and neuroprotection of the central nervous system. *Journal of neuroimmunology* 100:111-114.
27. Lutz, H. U. 2007. Homeostatic roles of naturally occurring antibodies: an overview. *J Autoimmun* 29:287-294.
- 65 28. Bieber, A. J., A. Warrington, K. Asakura, B. Ciric, S. V. Kaveri, L. R. Pease, y M. Rodriguez. 2002. Human antibodies accelerate the rate of remyelination following lyssolecithin-induced demyelination in mice. *Glia* 37:241-249.

29. Warrington, A. E., A. J. Bieber, B. Ciric, L. R. Pease, V. Van Keulen, y M. Rodriguez. 2007. A recombinant human IgM promotes myelin repair after a single, very low dose. *J Neurosci Res* 85:967-976.
30. Pirko, I., B. Ciric, J. Gamez, A. J. Bieber, A. E. Warrington, A. J. Johnson, D. P. Hanson, L. R. Pease, S. I. Macura, y M. Rodriguez. 2004. A human antibody that promotes remyelination enters the CNS and decreases lesion load as detected by T2-weighted spinal cord MRI in a virus-induced murine model of MS. *Faseb J* 18:1577-1579.
31. Warrington, A. E., y S. E. Pfeiffer. 1992. Proliferation and differentiation of O4+ oligodendrocytes in postnatal rat cerebellum: analysis in unfixed tissue slices using anti-glycolipid antibodies. *J Neurosci Res* 33:338-353.
32. Ciric, B., V. Van Keulen, M. Paz Soldan, M. Rodriguez, y L. R. Pease. 2004. Antibody-mediated remyelination operates through mechanism independent of immunomodulation. *Journal of neuroimmunology* 146:153-161.
33. Howe, C. L., A. J. Bieber, A. E. Warrington, L. R. Pease, y M. Rodriguez. 2004. Antiapoptotic signaling by a remyelination-promoting human antimyelin antibody. *Neurobiol Dis* 15:120-131.
34. Rivera-Quinones, C., D. McGavern, J. D. Schmelzer, S. F. Hunter, P. A. Low, y M. Rodriguez. 1998. Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis. *Nature medicine* 4:187-193.
35. McGavern, D. B., L. Zoecklein, K. M. Drescher, y M. Rodriguez. 1999. Quantitative assessment of neurologic deficits in a chronic progressive murine model of CNS demyelination. *Exp Neurol* 158:171-181.
36. De Stefano, N., P. M. Matthews, L. Fu, S. Narayanan, J. Stanley, G. S. Francis, J. P. Antel, y D. L. Arnold. 1998. Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain* 121 (Pt 8):1469-1477.
37. Tourbah, A., C. Linnington, C. Bachelin, V. Avellana-Adalid, H. Wekerle, y A. Baron-Van Evercooren. 1997. Inflammation promotes survival and migration of the CG4 oligodendrocyte progenitors transplanted in the spinal cord of both inflammatory and demyelinated EAE rats. *J Neurosci Res* 50:853-861.
38. Manganas, L. N., X. Zhang, Y. Li, R. D. Hazel, S. D. Smith, M. E. Wagshul, F. Henn, H. Benveniste, P. M. Djuric, G. Enikolopov, y M. Maletic-Savatic. 2007. Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science* 318:980-985.
39. McGavern, D. B., P. D. Murray, y M. Rodriguez. 1999. Quantitation of spinal cord demyelination, remyelination, atrophy, and axonal loss in a model of progressive neurologic injury. *J Neurosci Res* 58:492-504.
40. Asakura, K., D. J. Miller, L. R. Pease, y M. Rodriguez. 1998. Targeting of IgMkappa antibodies to oligodendrocytes promotes CNS remyelination. *J Neurosci* 18:7700-7708.
41. Asakura, K., D. J. Miller, K. Murray, R. Bansal, S. E. Pfeiffer, y M. Rodriguez. 1996. Monoclonal autoantibody SCH94.03, which promotes central nervous system remyelination, recognizes an antigen on the surface of oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 43:273-281.
42. Kozlowski, G. P., I. Sterzl, y G. Nilaver. 1992. Localization patterns for immunoglobulins and albumins in the brain suggest diverse mechanisms for their transport across the blood-brain barrier (BBB). *Prog Brain Res* 91:149-154.
43. Banks, W. A. 2008. Developing drugs that can cross the blood-brain barrier: applications to Alzheimer's disease. *BMC Neurosci* 9 Suppl 3:S2.
44. Hunter, S. F., D. J. Miller, y M. Rodriguez. 1997. Monoclonal remyelination-promoting natural autoantibody SCH 94.03: pharmacokinetics and in vivo targets within demyelinated spinal cord in a mouse model of multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 150:103-113.
45. Banks, W. A., S. A. Farr, J. E. Morley, K. M. Wolf, V. Geylis, y M. Steinitz. 2007. Anti-amyloid beta protein antibody passage across the blood-brain barrier in the SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease: an age-related selective uptake with reversal of learning impairment. *Exp Neurol* 206:248-256.
46. Schenk, D., R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandeventer, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games, y P. Seubert. 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173-177.
47. Bard, F., C. Cannon, R. Barbour, R. L. Burke, D. Games, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, I. Lieberburg, R. Motter, M. Nguyen, F. Soriano, N. Vasquez, K. Weiss, B. Welch, P. Seubert, D. Schenk, y T. Yednock. 2000. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 6:916-919.
48. Mikami, Y., M. Toda, M. Watanabe, M. Nakamura, Y. Toyama, y Y. Kawakami. 2002. A simple and reliable behavioral analysis of locomotor function after spinal cord injury in mice. Technical note. *J Neurosurg* 97:142-147.
49. Mikami, Y., H. Okano, M. Sakaguchi, M. Nakamura, T. Shimazaki, H. J. Okano, Y. Kawakami, Y. Toyama, y M. Toda. 2004. Implantation of dendritic cells in injured adult spinal cord results in activation of endogenous neural stem/progenitor cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery. *J Neurosci Res* 76:453-465.
50. Gilgun-Sherki, Y., H. Panet, V. Holdengreber, R. Mosberg-Galili, y D. Offen. 2003. Axonal damage is reduced following glatiramer acetate treatment in C57/bl mice with chronic-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci Res* 47:201-207.
51. Genain, C. P., B. Cannella, S. L. Hauser, y C. S. Raine. 1999. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 5:170-175.
52. Genain, C. P., M. H. Nguyen, N. L. Letvin, R. Pearl, R. L. Davis, M. Adelman, M. B. Lees, C. Linnington, y S. L. Hauser. 1995. Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate. *J Clin Invest* 96:2966-

2974.

53. Lennon, V. A., D. M. Wingerchuk, T. J. Kryzer, S. J. Pittock, C. F. Lucchinetti, K. Fujihara, I. Nakashima, y B. G. Weinshenker. 2004. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 364:2106-2112.

54. Rodriguez, M., W. E. Karnes, J. D. Bartleson, y A. A. Pineda. 1993. Plasmapheresis in acute episodes of fulminant CNS inflammatory demyelination. *Neurology* 43:1100-1104.

55. Herrero-Herranz, E., L. A. Pardo, R. Gold, y R. A. Linker. 2008. Pattern of axonal injury in murine myelin oligodendrocyte glycoprotein induced experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 30:162-173.

56. Yednock, T. A., C. Cannon, L. C. Fritz, F. Sanchez-Madrid, L. Steinman, y N. Karin. 1992. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 356:63-66.

57. Kanwar, J. R., J. E. Harrison, D. Wang, E. Leung, W. Mueller, N. Wagner, y G. W. Krissansen. 2000. Beta7 integrins contribute to demyelinating disease of the central nervous system. *Journal of neuroimmunology* 103:146-152.

58. Warrington, A. E., y M. Rodriguez. 2008. Remyelination-promoting human IgMs: developing a therapeutic reagent for demyelinating disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 318:213-239.

59. Jaffe, J. D., H. Keshishian, B. Chang, T. A. Addona, M. A. Gillette, y S. A. Carr. 2008. Accurate inclusion mass screening: a bridge from unbiased discovery to targeted assay development for biomarker verification. *Mol Cell Proteomics* 7:1952-1962.

60. Keshishian, H., T. Addona, M. Burgess, E. Kuhn, y S. A. Carr. 2007. Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol Cell Proteomics* 6:2212-2229.

Ejemplo 11: Anticuerpo rHlgM12 de IgM humana promueve la formación de axones e interactúa con balsas lipídicas para dirigirse a microtúbulos

[0200] El anticuerpo sHlgM12 promovió el crecimiento de neuritas en neuronas de gránulos cerebelosos cultivadas primarias. En el presente ejemplo, se encontró que el uso de neuronas hipocampales primarias completamente humanas (rHlgM12 que tiene una cadena J humana) estimula la formación de axones. rHlgM12 se une a las membranas neuronales e induce el agrupamiento de colesterol y gangliósido GM1.

[0201] Además, el rHlgM12 unido a la membrana se distribuye en dos conjuntos, uno asociado con dominios de balsa lipídica, y el otro con el sedimento insoluble en detergente enriquecido en el citoesqueleto. Los agregados de rHlgM12 se colocan sobre microtúbulos, pero no sobre actina filamentosa después de la extracción del detergente. Los estudios de coimmunoprecipitación demostraron que rHlgM12 y β 3-tubulina existen en un complejo. Estos resultados indican que rHlgM12 especifica la formación de axones mediante el agrupamiento de dominios de membrana para señalar el citoesqueleto de microtúbulos.

[0202] Las neuronas desarrollan axones a través de la regulación del crecimiento de neuritas (Barnes y Polleux, 2009). El citoesqueleto de neuronas, que incluye actina filamentosa (actina F) y microtúbulos, desempeña un papel crucial en el crecimiento de neuritas y en la identificación del cono de crecimiento.

[0203] Anticuerpo derivado de suero puede no ser adecuado para los estudios de mayor escala, en particular si no se puede producir en cantidad y debe estar aislado para cada uso del paciente que produce el anticuerpo, la generación de una forma recombinante que demuestra actividad comparable y la capacidad es ventajosa. El presente estudio demostró que el anticuerpo IgM12 recombinante y completamente humano (rHlgM12) promovió la formación de axones y, por lo tanto, condujo a la polarización neuronal en neuronas cultivadas del hipocampo. El rHlgM12 agrupa los dominios de la membrana neuronal que contienen colesterol y gangliósido GM1.

[0204] El fraccionamiento en gradiente de densidad de sacarosa indicó que el rHlgM12 unido a la membrana neuronal se segrega en dos conjuntos, uno asociado con la fracción más ligera resistente a los detergentes que contiene caveolina-1, y el otro con el sedimento enriquecido con citoesqueleto. La extracción de detergente de las neuronas vivas demostró que rHlgM12 se asocia con microtúbulos. rHlgM12 también se coimmunoprecipitó con β 3-tubulina. Tomados en conjunto, se entiende que rHlgM12 se une a dominios de membrana asociados con microtúbulos. Cuando está presente como un sustrato en una superficie, rHlgM12 promueve el anclaje de microtúbulos en las membranas neuronales, facilitando el crecimiento de neuritas y la formación de axones.

[0205] *IgM 12 humana recombinante (rHlgM12)*: rHlgM12 se expresó en células CHO (GibcoBRL, cat n° 11619). Los plasmidos que expresan las secuencias que codifican la cadena pesada y ligera para el anticuerpo predominante expresado en el suero del paciente 12 de macroglobulinemia de Waldenstrom se transfectaron junto con un transgen de la cadena J humana en células CHO-S. Las células CHO resultantes se seleccionaron con dosis crecientes de metotrexato y se subclonó y expandió un clon estable que producía el anticuerpo medido por ELISA. El anticuerpo rHlgM12 del sobrenadante del cultivo se purificó por cromatografía al 97% según se midió por análisis de HPLC.

[0206] *Ensayo de cultivo celular y crecimiento de neuritas*. Las neuronas hipocampales primarias se prepararon a partir de ratones FVB. Las neuronas del hipocampo del día 15 embrionario se disociaron en tripsina-EDTA, se

plaquearon en poli-D-lisina (PDL), PDL con sustratos de laminina o rHlgM12 recubiertos con una fina capa de membrana de nitrocelulosa unida a cubreobjetos de vidrio y se cultivaron en medios neurobasales que contenían 2 % (v/v) de B27. El crecimiento de neurita se analizó 12 horas después de sembrar las neuronas. Las neuronas se fijaron con paraformaldehído al 4% y se tiñeron con anticuerpo anti β 3-tubulina. La actina filamentosa (F-actina) se marcó con faloidina de Texas-Red y núcleos con DAPI. La longitud de neurita se midió utilizando el software Neuron J, se procesó con Excel (Microsoft) y se analizó estadísticamente con Prism (GraphPad). Una neurona de Etapa 3 se definió como una neurona con múltiples neuritas en la que la neurita más larga (Dotti et al., 1988), determinada como un axón mediante tinción de Tau1, era al menos dos veces la longitud de la segunda neurita más larga. Tau1 estaba asimétricamente enriquecido en la parte distal del axón. Por el contrario, las neuronas en etapa 2 tenían múltiples neuritas simétricas.

[0207] *Inmunotinción, inmunoprecipitación y fraccionamiento en gradiente de densidad de sacarosa de neuronas cultivadas primarias:* neuronas del hipocampo cultivadas de uno a tres días in vitro (DIV) se permeabilizaron con 0,2% de Triton X-100 después de la fijación con 4% de paraformaldehído seguido de inmunotinción. Las imágenes se recogieron usando un microscopio vertical Olympus y se procesaron utilizando Photoshop (Adobe). La distribución de rHlgM12 se determinó por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa no continuo. Brevemente, se permitió que rHlgM12 se uniera a neuronas corticales DIV7 vivas a 4°C durante 30 min y luego se lisó en tampón de lisis helado (50 mM Tris.HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, Triton X-100 al 1% y cóctel inhibidor de proteasa) durante 30 min. Los lisados neuronales se mezclaron con un volumen igual de sacarosa al 100% (p/v). La mezcla se transfirió a un tubo de centrifuga y se superpusieron secuencialmente 8 ml de sacarosa al 35% y 3,5 ml de sacarosa al 5%. Después de la centrifugación a 2×10^5 g durante 20 h a 4°C, se recogieron seis fracciones (2 ml de cada una) de la parte superior del gradiente. Cada fracción y el sedimento se disolvieron en tampón de muestra SDS y se sometieron a transferencia Western.

[0208] Para coimmunoprecipitación de rHlgM12 con proteína del citoesqueleto, las neuronas corticales vivas DIV7 se trataron con rHlgM12 a 4°C durante 30 min y se lisaron en tampón de lisis que contenía 0,5% de NP-40. rHlgM12 fue capturado por perlas de proteína L-agarosa y β 3-tubulina por proteína G-resina (Thermo). Para el doble etiquetado, las neuronas vivas se tiñeron con rHlgM12 en hielo y se permeabilizaron con 0,2% de Triton X-100 después de la fijación. La extracción neuronal viva y fijación se llevó a cabo en tampón que contenía 60 mM de Pipes, 25 mM de Hepes, 5 mM de EGTA, 1 mM de $MgCl_2$, 4% de paraformaldehído y 0,1% de Triton X-100.

[0209] *Anticuerpos y otros reactivos en este ejemplo:* Anti- β 3-tubulina (Promega); anti-actina, EDTA, poli-D-lisina, metilo- β -ciclodextrina y filipina (Sigma); receptor anti-Tau1, anti-caveolina-1 y anti-transferrina (Millipore); Texas Red-faloidina, toxina de cólera B, medio neurobasal y B27 (Invitrogen); tableta inhibidora de la proteasa (Roche).

IgM humana recombinante, rHlgM12, formación de axón potenciada:

[0210] Para comprender mejor el efecto de la IgM en la diferenciación de neuronas y los mecanismos moleculares subyacentes, los ensayos de desarrollo de neuritas se llevaron a cabo con las neuronas del hipocampo en cultivo utilizando un rHlgM12 recombinante. Las neuronas hipopólicas experimentan tres etapas de diferenciación para formar un axón (Dotti et al., 1988). Múltiples procesos se inician desde el cuerpo celular. Una de las neuritas de crecimiento rápido se diferencia en el axón, las otras en dendritas más tarde, que se pueden identificar por la distribución diferencial de Tau1 y MAP2 respectivamente (Lewis et al., 1989; Kanai e Hirokawa, 1995). Encontramos que rHlgM12, cuando se presenta como un sustrato, promueve la diferenciación de las neuronas. A las 12 horas de la siembra, las neuronas del hipocampo que crecen en rHlgM12 desarrollan múltiples neuritas, una de ellas es mucho más larga en comparación con las neuritas vecinas. Por el contrario, las neuronas plateadas en poli-D-lisina (PDL) tenían múltiples neuritas simétricas (FIGURA 18A, B).

[0211] Después de medir la longitud de neurita, encontramos que las neuronas plateadas en rHlgM12 ($n = 86$) en comparación con PDL ($n = 74$) tenían una longitud de neurita total significativamente más larga (195,8 μ M frente a 150,7 μ M, $P=0,0056$) (FIGURA 18C). La longitud más larga de neuritas se duplicó (117,1 μ M vs. 51,8 μ M, $p < 0,0001$) (FIGURA 18D), pero no se encontró diferencia significativa en la segunda longitud de neurita más larga (38,7 μ M vs. 33,3 μ M, $P=0,0782$) (FIGURA 18E). Las neuronas que crecen en rHlgM12 tienen menos neuritas primarias (2,9 vs. 4,1, $p < 0,0001$) (FIGURA 18F), y la mayoría de ellas son de fenotipo de neurona en etapa 3 (72% en rHlgM12 vs. 18% en PDL) (FIGURA 18G). Estos resultados indicaron que rHlgM12 promovió la diferenciación neuronal cuando se presentó como un sustrato.

[0212] El rasgo característico de la diferenciación neuronal es el crecimiento del axón polarizado y la segregación de las dendritas. Observamos que rHlgM12 promovió la extensión de neuritas, con una neurita significativamente más larga. Para verificar adicionalmente que estas neuritas más largas de las neuronas de la etapa 3 se convirtieron en axones, las neuronas del hipocampo depositadas en diferentes sustratos se tiñeron con anticuerpos anti-tau1 y MAP2 (FIGURA 19). La tinción de Tau1 fue débil en neuronas cultivadas en PDL (FIGURA 19A, D), pero mucho más fuerte en neuronas chapadas en PDL-laminina (FIGURA 19B, E) o rHlgM12 (FIGURA 19C, F). La laminina es un sustrato clásico para la diferenciación de neuronas y la formación de axones (Chen et al., 2009) y se usó como control positivo.

[0213] La comparación de la intensidad tau1 de las neuronas cultivadas en PDL (FIGURA 19D), la distribución de tau1 se enriqueció asimétricamente en la parte distal de la neurita más larga y mucho mayor en las neuronas sembradas en PDL-laminina (FIGURA 19E) o rHlgM12 (FIGURA 19F). Por el contrario, MAP2 teñía la parte proximal de todas las neuritas (FIGURA 19A2-C2). Este resultado indicó que las neuritas más largas de las neuronas en etapa 3 cultivadas tanto en rHlgM12 como en laminina eran axones. Estos estudios demuestran que rHlgM12 soporta el crecimiento de neuritas a partir de múltiples tipos de neuronas, y que rHlgM12 conduce a la formación de axones.

Agrupación de Microdominios de Membrana Neuronal Inducida por rHlgM12

[0214] Las neuronas del hipocampo que crecen en rHlgM12 como sustrato mostraron diferenciación potenciada (Figuras 18 y 19). Sin embargo, no observamos que rHlgM12 indujo el crecimiento de neuritas cuando se aplicó rHlgM12 a los medios de baño (datos no mostrados). Esta observación sugiere que rHlgM12, para ejercer su función, se requiere que se presente como una molécula de matriz extracelular. Para comprender mejor las interacciones de la membrana neuronal rHlgM12, las neuronas vivas se trataron primero con rHlgM12, luego se fijaron y tiñeron dos veces con filipina o toxina de cólera B (CTB), que se unen al colesterol o al gangliósido, GM1 respectivamente (Shogomori y Futerman, 2001). Las superficies celulares rHlgM12, CTB y filipina marcadas uniformemente de las neuronas de control no tratadas (FIGURA 20A). Por el contrario, el tratamiento con rHlgM12 a 37°C indujo la reorganización de membranas neuronales 30 min (FIGURA 20B, C). En primer lugar, rHlgM12 se agregan en estructuras parecidas a "parches" (FIGURA 20B1, C1) en la membrana, que no se observaron en neuronas no tratadas (FIGURA 20A) o neuronas tratadas con un anticuerpo IgM de control que no se une a la membrana neuronal (datos no mostrados). En segundo lugar, se formaron grupos de colesterol (FIGURA 20B2) y GM1 (FIGURA 20C2) en las membranas neuronales en el cuerpo de la célula, el eje de la neurita y el cono de crecimiento. En tercer lugar, el rHlgM12 agregado se colocalizó con colesterol agrupado (FIGURA 20B3) o GM1 (FIGURA 20C3), especialmente en el dominio central del cono de crecimiento (FIGURA 20B-C, gran aumento), pero no en la periferia del cono de crecimiento. Estos resultados indicaron que el rHlgM12 aplicado en el baño indujo la reorganización de la membrana neuronal, a pesar de que no es compatible con la extensión neurita/axón. Es posible que rHlgM12, cuando se presenta como un sustrato, pueda reclutar moléculas de membrana para sitios de contacto con la membrana neuronal rHlgM12 y dar como resultado la señalización direccional.

Balsas lipídicas unidas a rHlgM12

[0215] Los estudios bioquímicos sobre la base de la extracción con detergente no iónico en condiciones de frío se han utilizado para demostrar la existencia de balsas de lípidos que contienen colesterol y glicoesfingolípidos (Chichili y Rodgers, 2009). Sin embargo, hay información morfológica limitada sobre las balsas lipídicas porque el tamaño de la nanoescala está más allá de la resolución del microscopio óptico (Lingwood y Simons, 2010). La observación de que rHlgM12 induce el agrupamiento de la membrana y se colocaliza con dominios de membrana que contienen colesterol y GM1 (FIGURA 20) planteó la posibilidad de que rHlgM12 se asocie con dominios de balsa lipídica.

[0216] Puesto que las membranas neuronales están enriquecidas en colesterol y glicoesfingolípidos, que tienen temperaturas de fusión más altas (T_m) (Samsonov et al., 2001), la disminución de la temperatura de la membrana por debajo de T_m puede facilitar la visualización de balsas de lípidos y sus moléculas asociadas que son más dinámicas a 37°C. Para poner a prueba esta hipótesis, las neuronas vivas se enfriaron a 4°C, seguido de tinción con rHlgM12. En contraste con las neuronas fijadas a 37°C donde rHlgM12 se unía uniformemente (FIGURA 21A), a 4°C, rHlgM12 marcó estructuras punteadas mucho más grandes. Además, los conos de crecimiento neuronal se encogieron (FIGURA 21B).

[0217] Aprovechamos el hecho de que las balsas lipídicas son dominios de membrana dependientes del colesterol y que la reducción del colesterol altera su estructura (Chichili y Rodgers, 2009). Las neuronas del hipocampo cultivadas se trataron primero con metilo- β -ciclodextrina (M β CD) para agotar colesterol (Ko et al., 2005) y después se enfrió a 4°C, seguido por tinción de rHlgM12 y CTB después de la fijación. rHlgM12 se unió a las estructuras punteadas en las membranas neuronales después del agotamiento del colesterol, y se colocalizó con GM1 marcado con CTB (FIGURA 21C). Debido a que GM1 reside dentro de microdominios de balsa lipídica y rHlgM12 induce la agrupación de GM1 (FIGURA 20), concluimos que rHlgM12 se une a microdominios que contienen GM1, que son independientes del colesterol de la membrana neuronal. Estos experimentos confirmaron que las balsas lipídicas existen como estructuras morfológicas distintas, que se insertan uniformemente en las membranas (FIGURA 20A y FIGURA 21A) o se agregan para formar dominios más grandes (FIGURA 20B y C, FIGURA 21B y C). Estos resultados indican que rHlgM12 se une a la(s) molécula(s) que circulan entre los dominios de balsas y no balsas dependiendo de las interacciones biofísicas con otras moléculas.

[0218] Además, ensayamos la hipótesis de que rHlgM12 se une a balsas lipídicas. Debido a que las balsas lipídicas se localizan dentro de las membranas resistentes a los detergentes no iónicos (DRM) a temperatura fría (Samsonov et al., 2001), se analizó la localización de rHlgM12 en lisados de neuronas corticales preparados a 4°C. La transferencia de los lisados neuronales con anticuerpo IgM secundario antihumano reveló que se encontró rHlgM12 unido a la membrana tanto en el sedimento como en el sobrenadante, mientras que el anticuerpo IgM de control no vinculante a la neurona se encontró solamente en los eluatos de lavado (FIGURA 22A). Estas observaciones

indicaron que rHlgM12 se segregó en dos grupos, uno localizado en la fracción soluble en detergente en el sobrenadante y el otro asociado con la pastilla "insoluble en detergente".

[0219] En un segundo experimento, las neuronas corticales se marcaron primero con rHlgM12, luego se fraccionaron por gradiente de densidad de sacarosa a 4°C. La transferencia de diferentes fracciones indicó que rHlgM12 se localizaba en la fracción más clara que también contenía caveolina-1, un marcador de balsa lipídica, pero no a la fracción no balsa enriquecida con receptor de transferrina (FIGURA 22B). Sin embargo, incluso en este estricto proceso de fraccionamiento (1% de Triton X-100 y ultracentrifugación a 2x10⁵ g), se detectó algo de rHlgM12 en el sedimento, que contiene principalmente citoesqueleto insoluble en detergente (FIGURA 22B). Aunque tanto la tubulina (Sorice et al., 2009) como la actina (Levitan y Gooch, 2007) están presentes en las balsas lipídicas, solo se detectó β 3-tubulina en la balsa y la mayoría de la actina se dirigió a la fracción sin balsas (FIGURA 22B). Estos datos indicaron la existencia de dos grupos de rHlgM12 unidos a la membrana, uno presente en la balsa lipídica, y el otro en la pastilla.

15 *rHlgM12 asociado con microtúbulos*

[0220] Nuestros datos mostraron que el rHlgM12 agregado se localizaba en las regiones tales como el cuerpo celular, el eje de neurita y el dominio central del cono de crecimiento (FIGURA 20), que están dominados por microtúbulos (Forscher y Smith, 1988). Juntos, con el hecho de que rHlgM12 unido a la membrana segregado en la balsa lipídica y las fracciones de pastillas, que contenían β 3-tubulina (FIGURA 22B), estos hallazgos sugirieron que rHlgM12 puede estar asociado con componente(s) del citoesqueleto. Para ensayar esta hipótesis, las neuronas del hipocampo se trataron con rHlgM12 para inducir la reordenación de la membrana, luego se fijaron y se extrajeron a 37°C con 4% de paraformaldehído que contiene 0,1% de Triton X-100. Después de la extracción, la membrana insoluble en el detergente marcada con rHlgM12 se alinea con fascículos de microtúbulos agrupados en el eje de la neurita (FIGURA 23A2). En el cono de crecimiento, rHlgM12 se localiza principalmente en el dominio central ocupado por microtubos defasciculados, pero no en la periferia del cono de crecimiento enriquecido en actina F (FIGURA 23A3 y A4). Estos resultados indicaron que rHlgM12 puede asociarse con microtúbulos.

[0221] Se encontró que rHlgM12 se colocalizó con GM1 (FIGURA 21C). Se demostró que GM1 estaba anclado por la membrana de tubulina en las neuronas del gránulo cerebeloso, y fue arrastrado por un anticuerpo anti-tubulina después de la reticulación (Palestini et al., 2000). Por lo tanto, es probable que rHlgM12 se asocie con microdominios de membrana que contienen tubulina. Para ensayar más esta hipótesis, los experimentos desplegables modificados se llevaron a cabo con lisados celulares de neuronas corticales vivas tratadas con rHlgM12 a 4°C. Encontramos que tanto rHlgM12 como β 3-tubulina se coimmunoprecipitan entre sí (FIGURA 23B), lo que sugiere que rHlgM12 y β 3-tubulina existen como un complejo. La molécula IgM tiene una estructura pentámera con un peso molecular de aproximadamente 900 kDa. Para descartar la posibilidad de que rHlgM12 se asocie con tubulina o microtúbulos directamente en lisados neuronales, se llevaron a cabo ensayos de tracción con células de neuroblastoma N2A que no se unen a rHlgM12, pero que expresan β 3-tubulina (FIGURA 25A). rHlgM12 no se asoció con β 3-tubulina ni se preparó en el sedimento. Solo se detectó en los sobrenadantes de los lisados de células de neuroblastoma N2A (FIGURA 25B). En conjunto, estos resultados confirmaron que las balsas lipídicas median la asociación entre rHlgM12, su antígeno y microtúbulos.

[0222] Los datos en el presente documento demostraron que una IgM recombinante totalmente humano, rHlgM12, condujo polarización neurona mediante la promoción de axón en neuronas del hipocampo de cultivo primario cuando se presenta como un sustrato (Figura 18 y 19). El rHlgM12 se acumuló en las superficies de las neuronas e indujo el agrupamiento de colesterol y gangliósido, GM1 (FIGURA 20). rHlgM12 colocalizado con GM1 (FIGURA 21). El fraccionamiento en gradiente de sacarosa de los lisados neuronales indicó que el rHlgM12 unido a la membrana se segregó en dos grupos: uno asociado con las balsas lipídicas y el otro con el sedimento (FIGURA 22). Mediante la extracción de neuronas vivas con detergente no iónico, mostramos además que el rHlgM12 unido a la membrana se co-localizaba con microtúbulos y se inmunoprecipitaba conjuntamente con β 3-tubulina (FIGURA 23).

[0223] Lo anterior indica que rHlgM12 se une e interactúa con microdominios de balsa lipídica, y además indica que los dominios de balsa asociados a rHlgM12 transportan señalización a microtúbulos. Como resultado, rHlgM12 media la estabilización de microtúbulos, que impulsa el crecimiento del axón.

[0224] Este ejemplo demostró que rHlgM12 promueve selectivamente axón de las neuronas del hipocampo primarias (Figura 18 y 19).

[0225] Recientemente, se demostró que los sueros de origen humano IgM, sHlgM12, mejoraron la función neurológica de un modelo animal de la esclerosis múltiple que desarrolla una amplia degeneración axonal y pérdida (Rodríguez et al., 2009). Estos estudios apoyan el concepto de que HlgM12 ejerce su función al fomentar el crecimiento del axón.

[0226] Las neuronas especifican axones a través de un programa intrínseco controlado que regula la extensión de neuritas. Una neurona en desarrollo inicia múltiples neuritas. Una de las neuritas se diferencia en el axón, las otras dendritas. Las neuritas vecinas compiten entre sí. La neurita más larga, que también es la que tiene la velocidad de

extensión más rápida, primero rompe la extensión de neurita simétrica para convertirse en un axón, mientras que las otras neuritas se extienden mucho más lentamente y se convierten más tarde en dendritas (Dotti y cols., 1988; Goslin y Banker, 1989). La F-actina y los microtúbulos son los dos principales citoesqueletos que participan en la extensión de neuritas y la formación de axones. Nuestra comprensión de la especificación de axones ha estado evolucionando. La F-actina, que se localiza principalmente en la periferia del cono de crecimiento, se consideró que desempeñaba un papel importante. Se pensó que los microtúbulos, que dominan el eje neurítico y están confinados al dominio central del cono de crecimiento, eran secundarios a la F-actina. Recientemente, se descubrió que los microtúbulos también juegan un papel crítico en el crecimiento axónico. Los microtúbulos son capaces de explorar dinámicamente la malla de actina del cono de crecimiento. La estabilización de microtúbulos es suficiente para inducir la formación de axones (Witte y Bradke, 2008).

[0227] Nuestros resultados, que rHlgM12 y β 3-tubulina se coinmunoprecipitaron, que rHlgM12 se colocó con microtúbulos y que rHlgM12 estaba presente en el sedimento después de la extracción del detergente, no solo soportan microtúbulos como un jugador central. Además, estos datos proporcionaron la primera evidencia en la técnica de que los microtúbulos interactúan directamente con las membranas neuronales. Estos hallazgos apoyan el concepto de que rHlgM12 interactúa o se une a una cascada transmembrana que transmite señal extracelular a los microtúbulos. La propiedad dinámica de los microtúbulos para crecer y retraerse, por ejemplo en los conos de crecimiento, les permite impulsar el movimiento de la membrana neuronal (Dent y Kalil, 2001). Los microtúbulos estabilizados anclan las membranas neuronales. La existencia de microtúbulos dinámicos y estabilizados y/o la transición entre estos dos estados orquestan el proceso de crecimiento de neuritas para especificar un axón. De acuerdo con esto, IgM12 potencia la extensión del axón efectuando la estabilidad de los microtúbulos.

[0228] Los lípidos y las proteínas se incorporan continuamente a las membranas celulares, que luego se dividen en microdocinas, las llamadas balsas lipídicas. Las balsas de membrana generalmente se definen como compartimientos de membrana a escala nanométrica (10-200 nm), heterogéneos y dinámicos enriquecidos con esterol y esfingolípidos (Lingwood y Simons).

[0229] Proponemos que rHlgM12 se una a las balsas lipídicas. Primero, observamos que rHlgM12 se agregaba a membranas neuronales e inducía la agrupación de colesterol o gangliósido, GM1 (FIGURA 20). Estos resultados indican que rHlgM12 se une a los dominios de balsa lipídica que contienen colesterol y GM1. Las balsas pequeñas pueden interactuar con lípidos y/o proteínas. Las pequeñas balsas individuales pueden estabilizarse y fusionarse en plataformas más grandes que integran señales y regulan la intensidad y la amplitud de las vías de señalización. Los anticuerpos IgM, que poseen una estructura pentamérica, pueden amplificar las señales mediante los antígenos adyacentes de reticulación (receptores) y/o acercar los antígenos lo suficientemente para mejorar la reticulación o la interacción. Por lo tanto, los antígenos reticulados y las moléculas de señalización asociadas pueden agruparse. En segundo lugar, mostramos que rHlgM12 se unía a puntos más grandes en las membranas neuronales cuando las neuronas del hipocampo se enfriaban a 4°C (FIGURA 21). El colesterol y el esfingolípido tienen una alta temperatura de fusión (T_m). El tratamiento de las neuronas a la temperatura por debajo de T_m puede disminuir la dinámica de la membrana, lo que facilita la visualización de las balsas lipídicas agregadas. Junto con el hallazgo de que rHlgM12 se colocó con GM1 incluso después del agotamiento del colesterol (FIGURA 21), estos resultados sugieren que rHlgM12 se une e interactúa con las moléculas de la membrana neuronal que se colocan con GM1. La identidad precisa no está clara, aunque nuestro hallazgo anterior, que el tratamiento con sialidasa de neuronas cultivadas de gránulos de cerebelo de rata abolió la unión a sHlgM12, sugirió que el epitopo unido a sHlgM12 es un carbohidrato (Warrington et al., 2004). En tercer lugar, después del fraccionamiento de sacarosa de los lisados de neuronas, el rHlgM12 unido a la membrana se localizó en la fracción más clara, que también contenía el marcador de balsa lipídica, caveolina-1. Tomados en conjunto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que rHlgM12 se une a las balsas lipídicas.

[0230] Las cascadas de señales, desde la valva exterior de las membranas neuronales hasta el citoesqueleto intracelular, son fundamentales para la especificación de los axones. Los agregados de rHlgM12 se distribuyeron en el eje neurítico y el dominio central del cono de crecimiento (FIGURA 20), que están dominados por microtúbulos, pero no actina filamentosa (FIGURA 23). Algunos de los agregados de rHlgM12 eran insolubles en detergente y se localizaron en haces de microtúbulos fasciculados después de la extracción del detergente (FIGURA 23A). Estas observaciones indican la existencia de otro conjunto de moléculas unidas a rHlgM12, que pueden ser diferentes de las que asociaban las balsas lipídicas. El estudio de fraccionamiento de sacarosa confirmó adicionalmente que existe un conjunto de moléculas asociadas a rHlgM12 que se localizan en el sedimento insoluble en detergente (FIGURA 22B), que puede ser el conjunto que se localizó con microtúbulos como se detectó en la FIGURA 23A.

[0231] Estos resultados demostraron que algunos de rHlgM12 se asocian con componente(s) de citoesqueleto, posiblemente microtubos. El hallazgo de que rHlgM12, que se asoció con moléculas "solubles en detergente" en el sobrenadante (FIGURA 22A y FIGURA 23B), se coinmunoprecipitó con β 3-tubulina (FIGURA 23B), indica que la(s) molécula(s) unida(s) a rHlgM12 y β 3-tubulina puede(n) existir como un complejo en balsas lipídicas. Sin embargo, no es probable que rHlgM12 interactúe directamente con β 3-tubulina porque rHlgM12 no disminuyó β 3-tubulina en células de neuroblastoma N2A a las que rHlgM12 no se une (FIGURA 25). Por lo tanto, tanto el citoesqueleto como el rHlgM12 asociado a la balsa lipídica se unen a moléculas que se localizan en las proximidades de la tubulina. Este concepto se refuerza aún más por las observaciones de que rHlgM12 se colocó con GM1 (FIGURA 21C), y

que GM1 se bajó por un anticuerpo de anti-tubulina después de una reacción de entrecruzamiento (Palestini et al., 2000).

[0232] Las moléculas unidas a rHlgM12 en los dominios de balsa de lípidos se pueden incorporar constantemente en los citoesqueletos durante el proceso de crecimiento de las neuritas y la extensión de axones. Esta hipótesis está respaldada por los hallazgos de que, en la región del cono de crecimiento, rHlgM12 se agregaba en el dominio central (Fig. 3 y 6A), y era insoluble en detergente a 37°C (FIGURA 23A). Tomados en conjunto, se revela que HlgM12 se une a y afecta la dinámica de las balsas lipídicas que median la señalización de HlgM12 a los microtúbulos.

[0233] No está claro si la F-actina está implicada en la señalización inducida por rHlgM12. Varias líneas de evidencias indican que actina y las proteínas de unión a actina están asociadas con las balsas lipídicas (Levit y Gooch, 2007). Los filamentos de actina y los microtúbulos interactúan activamente en el movimiento celular coordinado (Rodríguez et al., 2003) que también incluye neuronas. Por lo tanto, es probable que la actina también desempeñe un papel en la señalización inducida por rHlgM12. Junto con β 3-tubulina, una pequeña cantidad de actina fue arrastrada hacia abajo por rHlgM12 (FIGURA 26B). Por lo tanto, rHlgM12 se une a balsas lipídicas que contienen tanto actina como β 3-tubulina.

[0234] Sin embargo, puntos marcados con rHlgM12 permanecieron en el mismo borde del cono de crecimiento, mientras que las redes de F-actina se redujeron de la periferia del cono de crecimiento cuando las neuronas se trataron a 4°C (Figura 26A). Después del fraccionamiento en gradiente de sacarosa, la actina se localizó principalmente en la fracción no tratada, y solo se detectó una pequeña cantidad de actina en el sedimento insoluble en detergente (FIGURA 22B). Estas observaciones indican que la F-actina es muy dinámica y la mayoría se despolimeriza en condiciones frías y/o mediante extracción con detergente. Por lo tanto, la actina puede estar involucrada en la señalización mediada por rHlgM12.

[0235] Concluimos que la IgM humana rHlgM12 se une y reorganiza las balsas lipídicas, y que los microtúbulos son uno de los objetivos aguas abajo. rHlgM12 promueve la extensión del axón solo cuando se presenta como sustrato. Como sustrato, rHlgM12 se inmovilizó y se restringió en su interacción con la membrana neuronal. El rHlgM12 inmovilizado puede haber creado un gradiente de señales a través de las membranas neuronales como se observa con frecuencia en la señalización inducida por morfógeno (Schmitt et al., 2006). Por el contrario, la aplicación en baño de rHlgM12 solo puede facilitar el agrupamiento aleatorio de balsa lipídica (FIGURA 20) y puede no ser suficiente para romper el crecimiento de neuritas simétricas y mejorar la extensión del axón. En resumen, nuestros resultados apoyan el modelo propuesto en la Figura 24. Las membranas de neuronas contienen microdominios tanto en balsas como no en balsa. Hay dos grupos de dominios de balsas con uno de ellos asociado a microtúbulos (FIGURA 24A). 2) rHlgM12 se une a y agrupa los dominios de balsas, lo que promueve la estabilización de microtúbulos y el anclaje de la membrana (FIGURA 24B). 3) En el cono de crecimiento, el agrupamiento en balsas inducido por rHlgM12 puede mejorar la periferia del cono de crecimiento a la transición al dominio central, rompiendo el crecimiento de neuritas simétricas para especificar la formación de axones (FIGURA 24C).

REFERENCIAS

[0236]

- Allen JA, Halverson-Tamboli RA, Rasenick MM (2007) Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci* 8:128-140.
- Barnes AP, Polleux F (2009) Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci* 32:347-381.
- Chen ZL, Haegeli V, Yu H, Strickland S (2009) Cortical deficiency of laminin gamma1 impairs the AKT/GSK-3beta signaling pathway and leads to defects in neurite outgrowth and neuronal migration. *Dev Biol* 327:158-168.
- Chichili GR, Rodgers W (2009) Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. *Cell Mol Life Sci* 66:2319-2328.
- Conde C, Caceres A (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10:319-332.
- de Anda FC, Pollarolo G, Da Silva JS, Camoletto PG, Feiguin F, Dotti CG (2005) Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature* 436:704-708.
- Dent EW, Kalil K (2001) Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. *J Neurosci* 21:9757-9769.
- Dent EW, Callaway JL, Szebenyi G, Baas PW, Kalil K (1999) Reorganization and movement of microtubules in axonal growth cones and developing interstitial branches. *J Neurosci* 19:8894-8908.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8:1454-1468.
- Forscher P, Smith SJ (1988) Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J Cell Biol* 107:1505-1516.
- Goslin K, Banker G (1989) Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* 108:1507-1516.

- Herdegen T, Skene P, Bahr M (1997) The c-Jun transcription factor--bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends Neurosci* 20:227-231.
- Higginbotham HR, Gleeson JG (2007) The centrosome in neuronal development. *Trends Neurosci* 30:276-283.
- 5 Kanai Y, Hirokawa N (1995) Sorting mechanisms of tau and MAP2 in neurons: suppressed axonal transit of MAP2 and locally regulated microtubule binding. *Neuron* 14:421-432.
- Ko M, Zou K, Minagawa H, Yu W, Gong JS, Yanagisawa K, Michikawa M (2005) Cholesterol-mediated neurite outgrowth is differently regulated between cortical and hippocampal neurons. *J Biol Chem* 280:42759-42765.
- Levitan I, Gooch KJ (2007) Lipid rafts in membrane-cytoskeleton interactions and control of cellular biomechanics: actions of oxLDL. *Antioxid Redox Signal* 9:1519-1534.
- 10 Lewis SA, Ivanov IE, Lee GH, Cowan NJ (1989) Organization of microtubules in dendrites and axons is determined by a short hydrophobic zipper in microtubule-associated proteins MAP2 and tau. *Nature* 342:498-505.
- Lingwood D, Simons K Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327:46-50.
- Niethammer P, Delling M, Sytnyk V, Dityatev A, Fukami K, Schachner M (2002) Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *J Cell Biol* 157:521-532.
- 15 Palestini P, Pitto M, Tedeschi G, Ferraretto A, Parenti M, Brunner J, Masserini M (2000) Tubulin anchoring to glycolipid-enriched, detergent-resistant domains of the neuronal plasma membrane. *J Biol Chem* 275:9978-9985.
- Rodriguez M, Warrington AE, Pease LR (2009) Invited Article: Human natural autoantibodies in the treatment of neurologic disease. *Neurology* 72:1269-1276.
- Rodriguez OC, Schaefer AW, Mandato CA, Forscher P, Bement WM, Waterman-Storer CM (2003) Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol* 5:599-609.
- Samsonov AV, Mihalyov I, Cohen FS (2001) Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. *Biophys J* 81:1486-1500.
- Schmid RS, Maness PF (2008) L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth. *Curr Opin Neurobiol* 18:245-250.
- 25 Schmitt AM, Shi J, Wolf AM, Lu CC, King LA, Zou Y (2006) Wnt-Ryk signalling mediates medial-lateral retinotectal topographic mapping. *Nature* 439:31-37.
- Segal RA (2003) Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annu Rev Neurosci* 26:299-330.
- Shogomori H, Futerman AH (2001) Cholera toxin is found in detergent-insoluble rafts/domains at the cell surface of hippocampal neurons but is internalized via a raft-independent mechanism. *J Biol Chem* 276:9182-9188.
- 30 Sorice M, Matarrese P, Tinari A, Giammarioli AM, Garofalo T, Manganeli V, Ciarlo L, Gambardella L, Maccari G, Botta M, Misasi R, Malorni W (2009) Raft component GD3 associates with tubulin following CD95/Fas ligation. *Faseb J* 23:3298-3308.
- Warrington AE, Bieber AJ, Van Keulen V, Ciric B, Pease LR, Rodriguez M (2004) Neuron-binding human monoclonal antibodies support central nervous system neurite extension. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:461-473.
- 35 Witte H, Bradke F (2008) The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Curr Opin Neurobiol* 18:479-487. Witte H, Neukirchen D, Bradke F (2008) Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol* 180:619-632.

EJEMPLO 12: Ensayos de biosensores ópticos de nanoporos para anticuerpos monoclonales humanos beneficiosos para la lesión de la médula espinal

40 [0237] La protección y reparación del axón después de una lesión de la médula espinal (LME) tiene un gran potencial como una estrategia efectiva para prevenir la pérdida de la neurona motora y la discapacidad permanente. La protección de neuronas se ha logrado utilizando factores tróficos específicos para prevenir daños y promover la

45 reparación de axones después de una lesión. Estas moléculas se identificaron predominantemente usando estrategias de selección basadas en sistemas *in vitro* que se centraron en seleccionar factores neurotróficos de molécula pequeña específicos.

50 [0238] Los anticuerpos monoclonales autorreactivos naturales han demostrado funciones biológicas beneficiosas en células del SNC usando modelos múltiples de lesión y enfermedad. La promoción mediada por anticuerpos de la supervivencia neuronal, la regeneración axonal y la recuperación funcional se ha demostrado *in vivo* usando la IgM monoclonal de ratón, IN-1 (Bregman 1995, Caroni y Schwab 1988). Se obtuvieron resultados similares utilizando la inmunización de homogeneizado de médula espinal (SCH) antes del daño del SNC (Ellezam 2003, Huang 1999).

55 [0239] En base a nuestros datos de anticuerpos humanos que se unen a neuronas incluyendo IgM12 y el anticuerpo remielinizante IgM22, se revela que las interacciones de anticuerpos monoclonales humanos que protegen a los axones del daño mediante la promoción de la supervivencia y función neuronal, y son beneficiosas para tratar lesiones y/o enfermedades del SNC tales como LME, dependen de las interacciones bicapa de proteínas de la membrana plasmática de la superficie en condiciones patológicas/fisiológicas.

60 [0240] Los anticuerpos humanos que promueven la supervivencia neuronal después de una lesión o daño del nervio (por ejemplo, en LME) o que protegen a las neuronas de lesiones o muerte, resultando en cada caso en la preservación de la función neurológica, se evalúan, se caracterizan y/o se identifican utilizando tecnologías que mantienen las bicapas lipídicas proteicas de la membrana plasmática patológica/fisiológica de la superficie.

65 [0241] En este estudio, determinamos la cinética de interacción de unión superficial de los anticuerpos monoclonales

humanos utilizando sensores de resonancia de plasmón de superficie de bicapa de proteína-lípido (SPR). Los anticuerpos monoclonales humanos se caracterizan o identifican utilizando unión en lesiones de la médula espinal de secciones de tejido *ex vivo* de roedores después de lesión de la médula espinal. A continuación, se usa un modelo de lesión por aplastamiento de la médula espinal de roedores para evaluar más a fondo la capacidad de los anticuerpos humanos para promover la supervivencia neuronal, la extensión de neuritas o la remielinización *in vivo*, lo que resulta en una patología reducida y una mejor función neurológica.

[0242] Un sensor de bicapa de lípidos SPR novedoso proporciona una tecnología rápida, sin etiquetas, que permite la caracterización de la cinética de unión a proteína-lípido superficial y la afinidad de anticuerpos de IgM humanas beneficiosos. Esta tecnología de sensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) se desarrolló en base a matrices de nanoporos periódicas en películas metálicas combinadas con bicapa lipídica planar fisiológica. La tecnología SPR ha permitido la caracterización rápida y sin etiquetas de la cinética de unión a anticuerpos IgM y la afinidad con antígenos relevantes.

[0243] La cinética de unión importante para cuantificar pequeñas diferencias proporciona una justificación para seleccionar moléculas principales durante el desarrollo e impacta tanto la dosificación como la potencia de una molécula terapéutica *in vivo*. SPR se ha convertido en un estándar aceptado en ambientes industriales y académicos, en los que típicamente se caracteriza la interacción molecular entre un par de compañeros de unión solubles. Sin embargo, la tecnología solo está comenzando a adaptarse a las necesidades de los antígenos unidos a la membrana. El sustrato de oro utilizado en la detección de SPR no es susceptible a la formación de una membrana lipídica compatible. Además, las proteínas de membrana en contacto directo con la superficie de oro a menudo pierden su funcionalidad. Sin embargo, el desarrollo de la nueva tecnología de arquitectura de detección de nanoporos que utiliza una fina película de oro perforada con series periódicas de nanoporos ha superado estos desafíos (véase, por ejemplo, la FIGURA 27). Cada nanoporo se asienta sobre un sustrato de vidrio y forma un pequeño pocillo para confinar las membranas lipídicas soportadas, mientras que la película dorada circundante proporciona efectos SPR para monitorizar dinámicamente la unión de las moléculas a la membrana (FIGURA 27B). Las matrices de nanoporos molidas en una película de oro proporcionan una geometría única, ya que una bicapa de lípidos delgada puede suspenderse sobre los nanoporos mientras que mantiene la estabilidad mecánica y está rodeada por un tampón en ambos lados (FIGURA 27B).

[0244] Las proteínas de membrana se pueden integrar sin problemas con la capacidad de detección SPR de las matrices de nanoporo de oro, manteniendo su funcionalidad en un entorno que imita más de cerca su estado natural. Además, las proteínas de membrana integradas en la bicapa lipídica independiente se pueden acceder fácilmente desde ambos lados, haciendo este enfoque más atractivo para estudiar el mecanismo por el cual la unión antígeno-anticuerpo en la superficie celular da como resultado la señalización celular (FIGURA 27B). Este sensor de bicapa lipídica SPR proporciona una tecnología rápida, sin etiquetas, que se utiliza para la evaluación, identificación y caracterización de la cinética de unión de proteínas y lípidos de superficie y la afinidad de anticuerpos de IgM humanas terapéuticos.

[0245] Esta plataforma de sensor caracteriza la cinética de unión de proteína-lípido de superficie y la afinidad de anticuerpos de IgM terapéuticos para ensayos en un modelo animal de lesión de médula espinal. Hemos caracterizado ampliamente ciertos anticuerpos de IgM identificados al unirse a la superficie "fija" viva del tejido cerebral y las células en el SNC. Estos anticuerpos de IgM (ejemplificados por IgM22 e IgM46) estimularon el flujo de calcio *in vitro* y promovieron la remielinización *in vivo*. En base a los mismos criterios, los anticuerpos humanos se han identificado mediante la detección de muestras de banco de suero de dysproteinemia en la Mayo Clinic. Anticuerpos de IgM humanas adicionales (ejemplificados en este documento por IgM12 e IgM42) se unen a la superficie de las neuronas y promueven el crecimiento de neuritas y previenen la muerte neuronal *in vitro*.

[0246] Los anticuerpos de unión a neuronas exhibieron inmunoreactividad específica para células del SNC específicas, estructuras, lesión y patología de la enfermedad usando secciones corticales no fijadas "vivas" de los modelos de múltiples ratones de lesión y enfermedad del SNC.

[0247] Los anticuerpos monoclonales humanos naturales se han demostrado potenciar funciones biológicas beneficiosas en las células del SNC de múltiples modelos de lesión y enfermedad. Los anticuerpos monoclonales humanos se unen a la superficie de una amplia variedad de neuronas en cultivo que incluyen cerebelo, cortical, ganglio retiniano y neuronas de la médula espinal (por ejemplo anticuerpos humanos IgM12 e IgM42). Estos anticuerpos inducen la extensión de neuritas a partir de las neuronas del SNC (FIGURA 28) y anulan la inhibición de la mielina del SNC sobre el crecimiento de neuritas (Warrington et al., 2004).

[0248] Los estudios *in vitro* demuestran la unión de anticuerpos monoclonales humanos a la membrana plasmática de las neuronas. La unión característica es uniforme a 0°C mientras que los reordenamientos de superficie forman estructuras punteadas a 15°C (FIGURA 29). La unión de la superficie celular es característica del agrupamiento de microdominios de membrana asociado con moléculas de señalización que inician cascadas de señal (Howe et al., 2004).

[0249] Los anticuerpos monoclonales humanos entran en el tejido de la médula espinal y se acumulan en los sitios

de daño 4 horas después de la administración intravenosa (Figura 30). La inmunocitoquímica realizada en secciones de vibrato de la médula espinal detecta la IgM humana dentro de las lesiones después de la administración de anticuerpos que se unen a la neurona, pero no después de la administración de una IgM humana de control. Ratones con enfermedad crónica de la médula espinal (ratones infectados con TMEV) recibieron 0,5 mg de sHlgM42 por vía intraperitoneal, las médulas espinales se retiraron 4 horas más tarde y se detectó IgM humana en las secciones transversales de la médula espinal (FIGURA 30). Las áreas lesionadas de la médula espinal de un ratón al que se ha administrado sHlgM42 demuestran fibras paralelas que se unen a una IgM antihumana marcada fluorescentemente (FIGURA 30A). Las áreas lesionadas de la médula espinal de un ratón que recibió una IgM humana de control no contienen IgM humana (FIGURA 30B).

[0250] Los anticuerpos monoclonales humanos se han identificado usando ensayos de la función biológica para cribar muestras desde el banco de suero de disproteinemia Mayo Clinic. Las muestras de suero, 115,000 recogidas durante 40 años, contienen altas concentraciones de anticuerpos monoclonales de pacientes con gammapatía monoclonal. Hemos sintetizado y ensayado la IgM 22 humana recombinante, que tiene actividad promotora de remielinización en modelos animales (Mitsunaga 2002, Warrington 2000).

[0251] En una realización, el presente Ejemplo genera anticuerpos monoclonales de calidad GMP útiles para aplicaciones terapéuticas, de pronóstico, de diagnóstico y/o profilácticas en condiciones de degeneración nerviosa, lesión y/o daño nervioso, como en LME humana o en condiciones desmielinizantes que exponen las neuronas del SNC.

[0252] Estos estudios caracterizan y evalúan adicionalmente anticuerpos de IgM humanas que promueven la supervivencia neuronal después de una LME traumática que da como resultado la preservación de la función neurológica. Se evalúan las pruebas de comportamiento y las mediciones morfológicas del número de axones después de LME y se determinan las diferencias entre la preservación endógena y mediada por anticuerpos de la función neurológica. Los tratamientos con los anticuerpos protectores de axones y que extienden axones en comparación con los controles de anticuerpos después de LME se utilizan para caracterizar las diferencias de la preservación de la función neurológica para actividades específicas mediadas por anticuerpos.

[0253] Las vesículas de membrana que contienen la bicapa de proteína-lípido de la membrana plasmática se aíslan de las células en condiciones fisiológicas. Los nanoporos de los sensores de SPR se recubren utilizando preparaciones de microvesículas de neuronas aisladas, glía, sinaptosoma y membranas de mielina del SNC normal y tejidos lesionados de la médula espinal. Se rastrean muestras de suero de anticuerpo monoclonal humano y muestras de anticuerpos recombinantes para determinar la cinética de unión para tipos de membrana específicos.

[0254] Los anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a la membrana plasmática superficial de las células no congeladas no fijadas "vivas" y tejidos en condiciones fisiológicas como se confirma por medio de sensores de SPR se ensayan para la unión específica usando tejidos no congelados, no fijados, "vivos", patológicos tras LME. Los anticuerpos monoclonales humanos que demuestran la unión a lesiones de la médula espinal se caracterizan adicionalmente por su aplicabilidad y actividad en el tratamiento después de una LME en el roedor.

[0255] Diseño de protocolo. La lesión por compresión se genera a nivel de T9 en ratones C57BL/6J hembras (18-22 g) de diez semanas de edad (Jackson Laboratories) usando un clip de aneurisma modificado (clip de ratón FEJOTA, fuerza de cierre de 3g u 8g). Este modelo de LME incluye no solo un impacto inicial, sino también una fase de compresión persistente que promueve la cavitación microquística, la degeneración de los axones y la astrogliosis robusta, todas ellas características de la LME traumática humana (Joshi y Fehlings 2002). Las pruebas conductuales usando la escala de clasificación locomotora Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) para ratas y la Basso Mouse Scale (BMS) para Locomoción se determinan después de LME para evaluar los déficits neurológicos. La técnica se representa en la FIGURA 31.

[0256] Se preparan entonces secciones de tejido *vivo*, no congeladas, no fijadas, en *vivo*, a partir de lesiones patológicas después de una lesión por compresión de la médula espinal en roedores. La inmunorreactividad de la unión de anticuerpos de IgM humanas se criba utilizando tinción inmunofluorescente (IF) de las secciones mantenidas en condiciones fisiológicas.

[0257] Los ratones se tratan de manera aguda después de una lesión por compresión de la médula espinal con anticuerpos humanos, que incluyen rHlgM12 y sHlgM42 o rHlgM42, administrados por vía intraperitoneal. Se mide la capacidad de los anticuerpos humanos para promover la preservación del axón o la reparación del tejido. Las pruebas de comportamiento que usan la escala BBB y BMS se realizan a intervalos regulares durante el período de 5 semanas después de LME. Una sola dosis de 0,5 mg de anticuerpo humano se administra por vía i.p. a los ratones 30 minutos después de LME. Los grupos de ratones (15 ratones) reciben anticuerpos humanos que promueven la protección de las neuronas, el crecimiento de neuritas, controlan los anticuerpos humanos que no se unen a las células ni controlan. Los ratones individuales se alojan durante la noche una vez a la semana en cajas automáticas de actividad infrarroja (Mikami et al., 2002) y la crianza espontánea, una medida de la discapacidad de las extremidades posteriores y la actividad horizontal grabada (Accuscan Inc, Ohio). Las puntuaciones tradicionales de BBB también se recogen semanalmente. Las evaluaciones funcionales se realizan cegadas.

[0258] Fluoro-oro y azul rápido, 4 semanas después del tratamiento, se inyectan en las médulas espinales de cuatro ratones en el nivel torácico inferior. Una semana más tarde, se perfunden los ratones y se extirpan los cerebros y la médula espinal. Los cuerpos celulares marcados retrógrados en los núcleos reticular, vestibular y rojo del tronco encefálico se cuentan entre los grupos mediante microscopía de fluorescencia (Ure y Rodríguez 2002). La cantidad de cuerpos celulares marcados en el tallo cerebral (sección de vibrátomo) refleja el nivel de axones funcionales en toda la médula espinal. La inmunocitoquímica para la acumulación de proteína β amiloide se realiza en secciones transversales de tejido tomadas cada 1 mm a lo largo de la médula espinal. El número de agregados β amiloides en una sección refleja el transporte de axones deteriorado y la disfunción axonal a ese nivel.

[0259] Cinco semanas después de la lesión, los ratones restantes se perfunden, con formaldehído/glutaraldehído y se retiran las médulas espinales. Cada otro bloque de 1 mm que comprende el sitio de la lesión de la médula espinal está incrustado en plástico de araldita y seccionado (1 micra) y teñido con parafenileno para visualizar los axones conservados rodeados por mielina. El área de la sección transversal de la lesión, el número de axones preservados y la infiltración de la célula inmune de la lesión se miden usando el software Microsuite (Olympus). La frecuencia del axón se mide y se compara entre los grupos (McGavern et al., 2000, Rodríguez et al., 1987). Todos los análisis se realizan en muestras codificadas y ciegas sin conocimiento del grupo experimental. Axones conservados se expresan como el número de axones conservados/mm² de la lesión. La comparación por pares de datos entre los grupos experimentales y de control usa la prueba Mann-Whitney Rank Sum.

Referencias

[0260]

Rodriguez M, Warrington AE, Pease LR. Human Natural Autoantibodies in the Treatment of Neurologic Disease. *Neurology* 2009; 72: 1269-1276.

Im H, Lesuffleur A, Lindquist NC, Oh SH. Plasmonic nanoholes in a multichannel microarray format for parallel kinetic assays and differential sensing. *Analytical Chemistry*. 2009;81:2854-2859

Maynard JA, Lindquist NC, Sutherland JN, Lesuffleur A, Warrington AE, Rodriguez M, y Oh S-H. Next generation SPR technology of membrane-bound proteins for ligand screening and biomarker discovery. *J Biotech* 2009; 4(11):1542-1558

Nagpal P, Lindquist NC, Oh SH, Norris DJ. Ultrasoother patterned metals for plasmonics and metamaterials. *Science*. 2009;325:594-597.

Bieber AJ, Warrington A, Asakura K, Ciric B, Kaveri SV, Pease LR, Rodriguez M. 2002. Human antibodies accelerate the rate of remyelination following lyssolecithin-induced demyelination in mice. *Glia* 37(3):241-249.

Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME. 1995. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 378(6556):498-501.

Caroni P, Schwab ME. 1988. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1(1):85-96.

Corse AM, Bilak MM, Bilak SR, Lehar M, Rothstein JD, Kuncl RW. 1999. Preclinical testing of neuroprotective neurotrophic factors in a model of chronic motor neuron degeneration. *Neurobiol Dis* 6(5):335-346.

Ellezam B, Bertrand J, Dergham P, McKerracher L. 2003. Vaccination stimulates retinal ganglion cell regeneration in the adult optic nerve. *Neurobiol Dis* 12(1):1-10.

Estevez AG, Spear N, Manuel SM, Radi R, Henderson CE, Barbeito L, Beckman JS. 1998. Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. *J Neurosci* 18(3):923-931.

Festoff BW, Ameenuddin S, Arnold PM, Wong A, Santacruz KS, Citron BA. 2006. Minocycline neuroprotects, reduces microgliosis, and inhibits caspase protease expression early after spinal cord injury. *J Neurochem* 97(5):1314-1326.

Hemendinger RA, Armstrong EJ, 3rd, Persinski R, Todd J, Mougeot JL, Volvovitz F, Rosenfeld J. 2008. Huperzine A provides neuroprotection against several cell death inducers using in vitro model systems of motor neuron cell death. *Neurotox Res* 13(1):49-61.

Howe CL, Bieber AJ, Warrington AE, Pease LR, Rodriguez M. 2004. Antiapoptotic signaling by a remyelination-promoting human antimyelin antibody. *Neurobiol Dis* 15(1):120-131.

Huang DW, McKerracher L, Braun PE, David S. 1999. A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron* 24(3):639-647.

Joshi M, Fehlings MG. 2002. Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: Part 1. Clip design, behavioral outcomes, and histopathology. *J Neurotrauma* 19(2):175-190.

McGavern DB, Murray PD, Rivera-Quinones C, Schmelzer JD, Low PA, Rodriguez M. 2000. Axonal loss results in spinal cord atrophy, electrophysiological abnormalities and neurological deficits following demyelination in a chronic inflammatory model of multiple sclerosis. *Brain* 123 Pt 3:519-531.

McTigue DM, Tripathi R, Wei P. 2006. NG2 colocalizes with axons and is expressed by a mixed cell population in spinal cord lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 65(4):406-420.

Mikami Y, Toda M, Watanabe M, Nakamura M, Toyama Y, Kawakami Y. 2002. A simple and reliable behavioral analysis of locomotor function after spinal cord injury in mice. Technical note. *J Neurosurg* 97(1 Suppl):142-147.

Mitsunaga Y, Ciric B, Van Keulen V, Warrington AE, Paz Soldan M, Bieber AJ, Rodriguez M, Pease LR. 2002. Direct evidence that a human antibody derived from patient serum can promote myelin repair in a mouse model of chronic-progressive demyelinating disease. *Faseb J* 16(10):1325-1327.

Pannu R, Christie DK, Barbosa E, Singh I, Singh AK. 2007. Post-trauma Lipitor treatment prevents endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection, and promotes locomotor recovery following spinal cord injury. *J Neurochem* 101(1):182-200.

Pirko I, Ciric B, Gamez J, Bieber AJ, Warrington AE, Johnson AJ, Hanson DP, Pease LR, Macura SI, Rodriguez M. 2004. A human antibody that promotes remyelination enters the CNS and decreases lesion load as detected by T2-weighted spinal cord MRI in a virus-induced murine model of MS. *FASEB J* 18(13):1577-1579.

Rodriguez M, Lennon VA, Benveniste EN, Merrill JE. 1987. Remyelination by oligodendrocytes stimulated by antiserum to spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol* 46(1):84-95.

Warrington AE, Asakura K, Bieber AJ, Ciric B, Van Keulen V, Kaveri SV, Kyle RA, Pease LR, Rodriguez M. 2000. Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12):6820-6825.

Warrington AE, Bieber AJ, Ciric B, Pease LR, Van Keulen V, Rodriguez M. 2007. A recombinant human IgM promotes myelin repair after a single, very low dose. *J Neurosci Res* 85(5):967-976.

Warrington AE, Bieber AJ, Van Keulen V, Ciric B, Pease LR, Rodriguez M. 2004. Neuron-binding human monoclonal antibodies support central nervous system neurite extension. *J Neuropathol Exp Neurol* 63(5):461-473.

Ejemplo 13: Modelo de esclerosis múltiple - Dosis: Evaluación de respuesta

[0261] Los anticuerpos de IgM se evalúan por su capacidad para promover la mejora funcional y aumentar los procesos de remielinización, crecimiento de neuritas o ambos en un modelo de esclerosis múltiple en ratones. El modelo involucra el uso del picornavirus Virus de la Encefalomiелitis Murina de Theiler (TMEV) para inducir lesiones desmielinizantes crónicas progresivas persistentes del SNC con características similares a las encontradas en la EM humana utilizando un método similar al de Warrington et al., 2007.

[0262] Ratones hembras y machos (aproximadamente 8 w, SJL/J cepa) son inyectados con Virus de la Encefalomiелitis Murina de Theiler (2×10^5 unidades formadoras de placa de cepa de Daniel, 10 μ l intracerebroventricularmente). Los ratones pueden recuperarse durante un período de 6 meses antes de la aleatorización para el tratamiento. Luego se examina a los ratones para determinar el estado del recubrimiento, la marcha y el reflejo de enderezamiento y se les asigna aleatoriamente a los grupos de tratamiento (como se indica en las tablas de tratamiento). Los ratones se tratan con una sola inyección intravenosa de vehículo (solución salina normal) o anticuerpo de IgM humana recombinante (0,025 a 2,5 mg/kg). La función neurológica se controla a las 2 semanas, 1 mes y 2 meses después del tratamiento.

[0263] Los puntos finales funcionales incluyeron puntuación basada en la condición del recubrimiento, la marcha y el rendimiento de Rotarod. Para la apariencia del recubrimiento, la puntuación es la siguiente: sin enfermedad (0); cambios mínimos de la capa (1); capa desaliñada (2); incontinencia y capa manchada (3). Los cambios de actividad se cuantifican en un cuadro de actividad automatizado. Además, la forma de andar se analiza usando la adquisición digital de la marcha (DigiGait) usando velocidades de marcha >90 cm/s. Los puntos finales cuantitativos de análisis de la marcha incluyen el ancho y la duración de la postura, la longitud y frecuencia de la zancada, el ángulo de la pata así como la oscilación, el frenado y la duración de la propulsión. Se cuantifican los cambios de marcha desde la línea de base. El rendimiento de Rotarod (una medida de coordinación sensorial y de equilibrio evaluada por la capacidad del animal para caminar sobre un eje giratorio que mide el motor en términos de velocidad y duración en el eje giratorio) se cuantifica como la cantidad de tiempo que los animales permanecen en el aparato giratorio en una serie de ensayos.

[0264] Al finalizar el experimento, los animales son sacrificados por sobreexposición a CO₂. Los cerebros y la médula espinal se eliminan para evaluar 1) grado de mielinización (análisis microscópico de electrones de paraformaldehído/glutaraldehído fijado en plástico tejido osmótico fijo) y 2) crecimiento de neuritas (evaluación de la densidad de neuritas mediante evaluación estereográfica).

[0265] En la primera realización, los anticuerpos humanos recombinantes se administran solos en tres niveles de dosis como se indica en la Tabla 3A y la Tabla 3B.

Tabla 3A. Resumen de grupos de tratamiento y puntos finales - anticuerpos de IgM recombinantes individuales

Tratamiento	Resultado histológico propuesto	Nivel de dosis (mg/kg, iv)	Evaluaciones neurológicas	Evaluaciones histológicas
Vehículo (salina)	NA	0	Condición de capa Análisis de forma de andar Rotarod	Mielinación por EM Resultado de neurita por estereología
IgM12	Resultado de neurita	0,025 0,25 2,50	Condición de capa Análisis de forma de andar Rotarod	Mielinación por EM Resultado de neurita por estereología
IgM42	Resultado de neurita	0,025 0,25 2,50	Condición de capa Análisis de forma de andar Rotarod	Mielinación por EM Resultado de neurita por estereología
IgM22	Remielinación	0,025 0,25 2,50	Condición de capa Análisis de forma de andar Rotarod	Mielinación por EM Resultado de neurita por estereología
IgM46	Remielinación	0,025 0,25 2,50	Condición de capa Análisis de forma de andar Rotarod	Mielinación por EM Resultado de neurita por estereología

Tabla 3B. Resumen de resultados para grupos de tratamiento

Tratamiento	Función propuesta	Nivel de dosis Ab (mg/kg; iv)	Tipo(s) de resultado histológico	Resultado histológico relativo	Resultado neurológico relativo - Condición de capa combinada, análisis de marcha & puntuaciones de rotarod (*)
Vehículo (salina)	NA	0	Ninguno	0	0
IgM12	Resultado de neurita	0,025 0,25 2,50	Resultado de neurita	X (0,025) X+ (0,25) X ++(2,50)	X (0,025) X+ (0,25) X ++(2,50)
IgM42	Resultado de neurita	0,025 0,25 2,50	Resultado de neurita	X (0,025) X+ (0,25) X ++(2,50)	X (0,025) X+ (0,25) X ++(2,50)
IgM22	Remielinación	0,025 0,25 2,50	Remielinación	X (0,025) X+ (0,25) X ++(2,50)	X (0,025) X+ (0,25) X ++(2,50)
IgM46	Remielinación	0,025 0,25 2,50	Remielinación	X (0,025) X+ (0,25) X ++(2,50)	X (0,025) X+ (0,25) X ++(2,50)

[000309] (*) X indica la mejora, X+ indica más mejora, y X++ indica aún más mejora. Los valores de puntuación de mejora son relativos a la dosificación de un anticuerpo dado. Por lo tanto, X+ es una mayor mejora que X para el mismo Ab. La X de mejora para un Ab no es necesariamente la misma que el valor X para otro Ab; el valor X+ de una Ab no es necesariamente igual que el valor X+ de otro Ab, y el valor X+++ de un Ab no es necesariamente igual que el valor X+++ de otro Ab.

[0266] En este ejemplo, los anticuerpos recombinantes IgM12, IgM42, IgM22 y IgM46 cada uno producen mejoras estadísticamente significativas, dependientes de la dosis en varios puntos finales sensoriomotores incluyendo las condiciones de recubrimiento, parámetros de la marcha y la puntuación Rotarod ($P < 0,05$) para cada punto final comparado con el tratamiento del vehículo). Los animales tratados con vehículo producen déficits estables en varios puntos terminales sensoriomotores, que incluyen la condición de recubrimiento, los parámetros de la marcha y la puntuación de Rotarod dentro de los 6 meses de la lesión por TMEV. Se encuentra un cambio significativo, dependiente de la dosis, en los puntos finales sensoriomotores en el rango de dosis de 0,025-2,5 mg/kg, donde X es una mejora, para cada Ab, con un aumento X de mejora en los puntos finales sensoriomotores a la dosis baja, una mayor aumento X+ de mejora en puntos finales sensoriomotores con 0,25 mg/kg y una mejora aún mayor X+++ en puntos finales sensoriomotores en la dosis de 2,5 mg/kg. Esta tendencia se observa para grupos de 12 animales alimentados a un nivel de 0,8 y un nivel alfa de 0,05. Por lo tanto, cada uno de los anticuerpos IgM12, IgM42, IgM22

e IgM46 produce mejoras estadísticamente significativas dependientes de la dosis en diversos puntos finales sensoriomotores incluyendo la condición del recubrimiento, los parámetros de la marcha y la puntuación de Rotarod ($P < 0,05$ para cada punto final) en comparación con el tratamiento del vehículo. No se encuentran distinciones en la mejora en función del género.

5
[0267] En este Ejemplo, se ha encontrado que IgM12 y IgM42 producen incrementos estadísticamente significativos, dependientes de la dosis en el crecimiento de neuritas en las secciones del cerebro y la médula espinal de ratones infectados con TMEV según la evaluación de la estereología en comparación con los controles tratados con vehículo. Cambios significativos, dependientes de la dosis, en el crecimiento de neuritas en el rango de dosis de 0,025-2,5 mg/kg, donde X es una mejora, se encuentran para cada Ab, con un aumento X de mejora en el crecimiento neurítico en la dosis baja, un mayor aumento de X+ de mejora en el crecimiento de neuritas con 0,25 mg/kg y un incremento aún mayor en el crecimiento de neuritas X+++ en la dosis de 2,5 mg/kg. Esta tendencia se observa para grupos de 12 animales alimentados a un nivel de 0,8 y un nivel alfa de 0,05.

15
[0268] Se ha encontrado que IgM22 y IgM46 producen incrementos estadísticamente significativos, dependientes de la dosis en la remielinización en secciones del cerebro y la médula espinal de ratones infectados con TMEV según la evaluación de la estereología en comparación con los controles tratados con vehículo. Cambios significativos, dependientes de la dosis, en la remielinización sobre el rango de dosis de 0,025-2,5 mg/kg, donde X es una mejora, se encuentran para cada Ab, con un aumento X de mejora en la remielinización en la dosis baja, un mayor aumento X+ de mejora en la remielinización con 0,25 mg/kg y un aumento aún mayor en la remielinización X+++ en la dosis de 2,5 mg/kg. Esta tendencia se observa para grupos de 12 animales alimentados a un nivel de 0,8 y un nivel alfa de 0,05.

Ejemplo 14: Modelo de esclerosis múltiple - combinaciones de Ab

25
[0269] En este experimento, varias combinaciones de relaciones de dosis fijas de anticuerpos de IgM recombinantes se examinan para la mejora del resultado neurológico en el modelo de TMEV de EM como se describe en el ejemplo anterior. Seis meses después de la exposición a TMEV, el tratamiento con combinaciones de IgM recombinante se inicia en ratones. En esta serie de estudios, a los ratones se les administra vehículo solo o varias combinaciones de IgM en una sola administración intravenosa (mezcla). Los puntos finales sensorio-motrices se controlan como se indicó anteriormente. La mielinización y el crecimiento de neuritas se evalúan para examinar los cambios producidos por las combinaciones de anticuerpos. Las combinaciones bajo evaluación se muestran en la Tabla 4A y la Tabla 4B.

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 4A. Resumen de grupos de tratamiento - Combinaciones de anticuerpo de IgM recombinante

Tratamiento	Función propuesta	Nivel de dosis (mg/kg, iv)	Evaluación neurológica	Evaluación histológica
Vehículo (salina)	NA	0	Condición de recubrimiento Análisis de marcha Rotarod	Mielinación por EM Resultado de neurita por estereología
IgM12 + IgM42	Resultado de neurita + Resultado de neurita	0,25 0,25	Condición de recubrimiento Análisis de marcha Rotarod	Mielinación por EM Resultado de neurita por estereología
IgM22 + IgM46	Remielinación + Remielinación	0,25 0,25	Condición de recubrimiento Análisis de marcha Rotarod	Mielinación por EM Resultado de neurita por estereología
IgM22 + IgM12	Remielinación + Resultado de neurita	0,25 0,25	Condición de recubrimiento Análisis de marcha Rotarod	Mielinación por EM Resultado de neurita por estereología
IgM46 + IgM12	Remielinación + Resultado de neurita	0,25 0,25	Condición de recubrimiento Análisis de marcha Rotarod	Mielinación por EM Resultado de neurita por estereología
IgM22 + IgM42	Remielinación + Resultado de neurita	0,25 0,25	Condición de recubrimiento Análisis de marcha Rotarod	Mielinación por EM Resultado de neurita por estereología
IgM46 + IgM42	Remielinación + Resultado de neurita	0,25 0,25	Condición de recubrimiento Análisis de marcha Rotarod	Mielinación por EM Resultado de neurita por estereología

Tabla 4B. Resumen de resultados - Combinaciones de anticuerpo de IgM recombinante

Tratamiento	Resultado histológico propuesto	Nivel de dosis (mg/kg, iv)	Tipo(s) de resultado histológico	Resultado histológico relativo y tipo(s) de resultado ^(*)	Resultado neurológico sensorimotor relativo ^(*) - Condición de recubrimiento, Análisis de marcha & Rotarod
Vehículo (salina)	NA	0	Ninguno	Ninguno	Ninguno
IgM12 + IgM42	Resultado de neurita + Resultado de neurita	0,25 0,25	Resultado de neurita	> incremento de neurita que: (X+ IgM12 resultado de neurita) y (X+ IgM42 resultado de neurita)	> mejora de sensorimotor que: (X+ IgM12 mejora de sensorimotor) y (X+ IgM42 mejora de sensorimotor)
IgM22 + IgM46	Remielinación + Remielinación	0,25 0,25	Mielinación	> remielinación que: (X+ IgM22 remielinación) y (X+ IgM46 remielinación)	> mejora de sensorimotor que: (X+ IgM22 mejora de sensorimotor) y (X+ IgM46 mejora de sensorimotor)
IgM12 + IgM22	Resultado de neurita + Remielinación	0,25 0,25	Resultado de neurita + Remielinación	> remielinación > resultado de neurita que: (X+ IgM12 resultado de neurita) y (X+ IgM22 remielinación)	> mejora de sensorimotor que: (X+ IgM12 mejora de sensorimotor) y (X+ IgM22 mejora de sensorimotor)
IgM22 + IgM42	Resultado de neurita + Remielinación	0,25 0,25	Resultado de neurita + Remielinación	> remielinación > resultado de neurita que: (X+ IgM12 resultado de neurita) y (X+ IgM46 remielinación)	> mejora de sensorimotor que: (X+ IgM12 mejora de sensorimotor) y (X+ IgM46 mejora de sensorimotor)
IgM42 + IgM22	Resultado de neurita + Remielinación	0,25 0,25	Resultado de neurita + Remielinación	> remielinación > resultado de neurita que: (X+ IgM42 resultado de neurita) y (X+ IgM22 remielinación)	> mejora de sensorimotor que: (X+ IgM42 mejora de sensorimotor) y (X+ IgM22 mejora de sensorimotor)
IgM42 + IgM46	Resultado de neurita + Remielinación	0,25 0,25	Resultado de neurita + Remielinación	> remielinación > resultado de neurita que: (X+ IgM42 resultado de neurita) y (X+ IgM46 remielinación)	> mejora de sensorimotor que: (X+ IgM42 mejora de sensorimotor) y (X+ IgM46 mejora de sensorimotor)

(*) X indica mejora, X+ indica más mejora, y X++ indica aún más mejora. Los valores de puntuación de mejora son relativos a la dosificación de un anticuerpo dado. Por lo tanto X+ es una mayor mejora que X para el mismo Ab. La X de mejora para un Ab no es necesariamente igual que el valor X para otro Ab; el valor X+ de un Ab no es necesariamente igual que el valor X+ de otro Ab, y el valor X+++ de un Ab no es necesariamente igual que el valor X+++ de otro Ab.

[0270] En este ejemplo, las combinaciones de anticuerpos recombinantes de IgM12 + IgM42, IgM22 + IgM46, IgM12 + IgM22, IgM12 + IgM46, IgM42 + IgM22, y IgM42 + IgM46 producen mejoras estadísticamente significativas, dependientes de la dosis en varios puntos finales sensoriomotores incluyendo condición de recubrimiento, parámetros de la marcha y puntuación de Rotarod en comparación con el tratamiento del vehículo (P<0,05 para cada punto final en comparación con el tratamiento del vehículo). No se encuentran distinciones en la mejora en función del género.

5 [0271] Además, el grado de mejora de punto final sensoriomotor con cada una de estas combinaciones es supraaditivo (sinergismo exhibido) de una manera estadísticamente significativa, dependiente de la dosis en comparación con las mejoras aditivas predichas de cada uno de los anticuerpos solos. Una vez más, no se encuentran distinciones en la mejora en función del género.

10 [0272] Además de producir mejoras estadísticamente significativas dependientes de la dosis en varios puntos terminales sensoriomotor incluyendo condición de recubrimiento, parámetros de marcha y puntaje Rotarod en comparación con el tratamiento del vehículo ($P < 0,05$ para cada punto final comparado con el tratamiento del vehículo), la combinación de IgM12 + IgM42 mejoró significativamente el crecimiento de neuritas en comparación con los controles del vehículo ($P < 0,05$). El grado de crecimiento de neuritas es supraaditivo comparado con el efecto aditivo de cada anticuerpo administrado solo. Por lo tanto, se entiende que estos anticuerpos desencadenan el crecimiento por mecanismos de acción distintos; esto es consistente con los patrones de unión distintos respectivos de estos anticuerpos al tejido neural.

15 [0273] Además de producir mejoras estadísticamente significativas dependientes de la dosis en varios puntos terminales sensoriomotores incluyendo condición de recubrimiento, parámetros de marcha y puntaje Rotarod en comparación con el tratamiento del vehículo ($P < 0,05$ para cada punto final comparado con el tratamiento del vehículo), la combinación de IgM22 + IgM46 produjo un aumento significativo en la mielinización en comparación con los controles tratados con vehículo ($P < 0,05$). Además, el grado de remielinización es supraaditivo comparado con el efecto aditivo predicho de IgM22 o IgM46 administrado solo. Sin estar obligado por la teoría, esto se entiende como el resultado de la actividad paracrina. En consecuencia, cuando las neuronas en crecimiento y los oligodendrocitos en crecimiento están presentes, las células respectivamente provocan una producción paracrina que afecta positivamente al otro tipo de célula en evaluación.

20 [0274] Además de producir mejoras estadísticamente significativas dependientes de la dosis en varios puntos terminales sensoriomotores incluyendo condición de recubrimiento, parámetros de la marcha y puntaje Rotarod en comparación con el tratamiento del vehículo ($P < 0,05$ para cada punto final comparado con el tratamiento del vehículo), la combinación de IgM12 + IgM22 produce un aumento significativo en la mielinización, así como el crecimiento de neuronas en comparación con los controles tratados con vehículo en la médula espinal lesionada ($P < 0,05$). Además, el grado de crecimiento de neuronas y remielinización es supraaditivo comparado con el efecto de IgM12 o IgM22, respectivamente, administrados solos a las dosis utilizadas aquí. Sin estar obligado por la teoría, esto se entiende como el resultado de la actividad paracrina. En consecuencia, cuando las neuronas en crecimiento y los oligodendrocitos en crecimiento están presentes, estas células respectivamente provocan una producción paracrina que afecta positivamente al otro tipo de célula en evaluación.

25 [0275] Además de producir mejoras estadísticamente significativas, dependientes de la dosis en varios puntos terminales sensoriomotores incluyendo condición de recubrimiento, parámetros de marcha y puntaje Rotarod en comparación con el tratamiento del vehículo ($P < 0,05$ para cada punto final comparado con el tratamiento del vehículo), la combinación de IgM12 + IgM46 produce un aumento significativo en la mielinización, así como el crecimiento de neuronas en comparación con los controles tratados con vehículo ($P < 0,05$). Además, el grado de crecimiento de neuronas y remielinización es supraaditivo comparado con el efecto de IgM12 o IgM46, respectivamente, administrados solos a las dosis utilizadas aquí. Sin estar obligado por la teoría, esto se entiende como el resultado de la actividad paracrina. En consecuencia, cuando las neuronas en crecimiento y los oligodendrocitos en crecimiento están presentes, las células respectivamente provocan una producción paracrina que afecta positivamente al otro tipo de célula en evaluación.

30 [0276] Además de producir mejoras estadísticamente significativas dependientes de la dosis en varios puntos terminales sensoriomotores incluyendo condición de recubrimiento, parámetros de marcha y puntaje Rotarod en comparación con el tratamiento del vehículo ($P < 0,05$ para cada punto final comparado con el tratamiento del vehículo), la combinación de IgM22 + IgM42 produce un aumento significativo en la mielinización, así como el crecimiento de neuronas en comparación con los controles tratados con vehículo ($P < 0,05$). Además, el grado de crecimiento de neuronas y remielinización es supraaditivo comparado con el efecto de IgM22 o IgM42, respectivamente, administrados solos a las dosis utilizadas aquí. Sin estar obligado por la teoría, esto se entiende como el resultado de la actividad paracrina. En consecuencia, cuando las neuronas en crecimiento y los oligodendrocitos en crecimiento están presentes, las células respectivamente provocan una producción paracrina que afecta positivamente al otro tipo de célula en evaluación.

35 [0277] Además de producir mejoras estadísticamente significativas, dependientes de la dosis en puntos finales diferentes sensoriomotores incluyendo las condiciones del recubrimiento, parámetros de la marcha y la puntaje Rotarod en comparación con el tratamiento con vehículo ($P < 0,05$ para cada punto final en comparación con el tratamiento con vehículo), la combinación de IgM46 + IgM42 produce un aumento significativo en la mielinización, así como el crecimiento de neuronas en comparación con los controles tratados con vehículo ($P < 0,05$). Además, el grado de crecimiento de neuronas y remielinización es supraaditivo comparado con el efecto de IgM46 o IgM42, respectivamente, administrados solos a las dosis utilizadas aquí. Sin estar obligado por la teoría, esto se entiende como el resultado de la actividad paracrina. En consecuencia, cuando las neuronas en crecimiento y los oligodendrocitos en crecimiento están presentes, las células respectivamente provocan una producción paracrina

que afectan positivamente al otro tipo de célula en evaluación.

Ejemplo 15: Modelo de lesión de la médula espinal

5 **[0278]** Los anticuerpos de IgM se evalúan por su capacidad para promover la mejora funcional y aumentar los procesos de remielinización, crecimiento de neuritas o ambos en un modelo de lesión de la médula espinal en ratas. El modelo consiste en comprimir lateralmente la médula espinal entre las cuchillas de las pinzas protectoras deslizantes modificadas, donde el ancho de la cuchilla de las pinzas es de 2,5 mm, y una separación preestablecida de las cuchillas de 0,9 mm durante un período de 15 segundos. La lesión resultante tiene características similares a las encontradas en LME humana (Gruner et al., 1995).

15 **[0279]** Ratas macho y hembra (aproximadamente 200-225 g, Long Evans) se someten a cirugía para producir una lesión de la médula espinal como se describió anteriormente. Los anticuerpos de IgM recombinantes o el tratamiento con vehículo se administran por vía intravenosa 10 minutos después de la cirugía. La función locomotora del miembro posterior y la marcha se evalúan durante un período de 12 semanas utilizando la escala de clasificación locomotora BBB (véase, por ejemplo, Basso DM, Beattie EM, Bresnahan JC, Anderson DK, Faden AI, Gruner JA, Holford TR, Hsu CY, Noble LJ, Nockels R, Perot PL, Salzman SK, Young W. (1996) MASCIS evaluation of open field locomotor scores: Effects of experience and teamwork on reliability. Journal of Neurotrauma, 13: 343-359; Basso DM, Beattie EM, Bresnahan JC. (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. Journal of Neurotrauma, 12: 1-21) Las ratas se ensayan a 1, 3, 5, 7 y 10 días, y luego semanalmente después de LME durante 9-12 semanas en el BBB. Se cuantifican los cambios desde el inicio del estudio.

25 **[0280]** Al finalizar el experimento, los animales son sacrificados por sobreexposición a CO₂. Los cerebros y la médula espinal se eliminan para evaluar 1) grado de mielinización (análisis microscópico de electrones de tejido osmótico fijado por paraformaldehído/glutaraldehído de plástico incrustado) y 2) crecimiento de neuritas (evaluación de la densidad de neuritas mediante evaluación estereográfica).

Ejemplo 16: Uso de anticuerpos individuales en un modelo de lesión de la médula espinal

30 **[0281]** En este experimento, los anticuerpos humanos recombinantes se administran solos a tres niveles de dosis como se indica en la Tabla 5A y la Tabla 5B.

Tabla 5A. Resumen de grupos de tratamiento y puntos finales - anticuerpos de IgM recombinantes individuales

35

Tratamiento	Resultado histológico propuesto	Nivel de dosis (mg/kg, iv)	Evaluaciones neurológicas	Evaluaciones histológicas
Vehículo (salina)	NA	0	Puntaje BBB	Mielinación por EM Resultado de neurita por estereología
IgM12	Resultado de neurita	0,025 0,25 2,50	Puntaje BBB	Mielinación por EM Resultado de neurita por estereología
IgM42	Resultado de neurita	0,025 0,25 2,50	Puntaje BBB	Mielinación por EM Resultado de neurita por estereología
IgM22	Remielinación	0,025 0,25 2,50	Puntaje BBB	Mielinación por EM Resultado de neurita por estereología
IgM46	Remielinación	0,025 0,25 2,50	Puntaje BBB	Mielinación por EM Resultado de neurita por estereología

55

60

65

Tabla 5B. Resumen de resultados para grupos de tratamiento

Tratamiento	Función propuesta	Nivel de dosis Ab (mg/kg, iv)	Tipo de resultado histológico	Resultado histológico relativo ^(*)	Resultado neurológico relativo - Puntaje BBB ^(*)
Vehículo (salina)	NA	0	Ninguno	0	0
IgM12	Resultado de neurita	0,025 0,25 2,50	Resultado de neurita	X 0,025 X+ 0,25 X++ 2,50	X 0,025 X+ 0,25 X++ 2,50
IgM42	Resultado de neurita	0,025 0,25 2,50	Resultado de neurita	X 0,025 X+ 0,25 X++ 2,50	X 0,025 X+ 0,25 X++ 2,50
IgM22	Remielinación	0,025 0,25 2,50	Remielinación	X 0,025 X+ 0,25 X++ 2,50	X 0,025 X+ 0,25 X++ 2,50
IgM46	Remielinación	0,025 0,25 2,50	Remielinación	X 0,025 X+ 0,25 X++ 2,50	X 0,025 X+ 0,25 X++ 2,50

(*) X indica mejora, X+ indica más mejora, y X++ indica aún más mejora. Los valores de puntaje de mejora son relativos a la dosificación de un anticuerpo dado. Por lo tanto, un X+ es una mayor mejora que X para el mismo Ab. La X de mejora para un Ab no es necesariamente igual que el valor X para otro Ab; el valor X+ de un Ab no es necesariamente igual que el valor X+ de otro Ab, y el valor X+++ de un Ab no es necesariamente igual que el valor X+++ de otro Ab.

[0282] En este ejemplo, se ha encontrado que los anticuerpos recombinantes IgM12, IgM 42, IgM22 y IgM46 producen mejoras estadísticamente significativas, dependientes de la dosis en función de la extremidad locomotora trasera con mejores parámetros de BBB ($P < 0,05$ para cada punto final en comparación con el tratamiento con vehículo). Los animales tratados con vehículo producen una puntuación estable de BBB dentro de las 6 semanas de un nivel moderado de lesión de la médula espinal. Se encuentra un cambio significativo, dependiente de la dosis, en la puntuación BBB sobre el rango de dosis de 0,025-2,5 mg/kg, donde X es una mejora, para cada Ab, con un aumento X de mejora en el nivel BBB a dosis baja, un mayor aumento de X+ BBB de mejora con 0,25 mg/kg y una mejora de BBB X+++ incluso mayor en la dosis de 2,5 mg/kg. Esta tendencia se observa para grupos de 12 animales alimentados a un nivel de 0,8 y un nivel alfa de 0,05. Por lo tanto, cada uno de los anticuerpos IgM12, IgM42, IgM22 e IgM46. No se observan distinciones en la mejora en función del sexo. Se producen mejoras estadísticamente significativas, dependientes de la dosis, en la función locomotora de la extremidad posterior con una mejora de la BHE ($P < 0,05$ para cada punto final) en comparación con el tratamiento con vehículo.

[0283] Se ha observado que IgM12 y IgM42 producen incrementos estadísticamente significativos, dependientes de la dosis en el crecimiento de neuritas en las secciones del cerebro y la médula espinal de ratones infectados con TMEV según la evaluación de la estereología en comparación con los controles tratados con vehículo. Cambios significativos, dependientes de la dosis, en el crecimiento de neuritas en el rango de dosis de 0,025-2,5 mg/kg, donde X es una mejora, se encuentran para cada Ab, con un aumento X de mejora en el crecimiento neurítico en la dosis baja, un mayor aumento X+ de mejora en el crecimiento de neuritas con 0,25 mg/kg y un incremento aún mayor en el crecimiento de neuritas X+++ en la dosis de 2,5 mg/kg. Esta tendencia se observa para grupos de 12 animales alimentados a un nivel de 0,8 y un nivel alfa de 0,05.

[0284] Se ha encontrado que IgM22 y IgM46 producen incrementos estadísticamente significativos, dependientes de la dosis en la remielinización en secciones del cerebro y la médula espinal de ratones infectados con TMEV según la evaluación de la estereología en comparación con los controles tratados con vehículo. Cambios significativos, dependientes de la dosis, en la remielinización sobre el rango de dosis de 0,025-2,5 mg/kg, donde X es una mejora, se encuentran para cada Ab, con un aumento X de mejora en la remielinización en la dosis baja, un mayor aumento X+ de mejora en la remielinización con 0,25 mg/kg y un aumento aún mayor en la remielinización X+++ en la dosis de 2,5 mg/kg. Esta tendencia se observa para grupos de 12 animales alimentados a un nivel de 0,8 y un nivel alfa de 0,05.

Ejemplo 17: Combinaciones de lesión de médula espinal y anticuerpo

[0285] En este Ejemplo, se examinan diversas combinaciones de relaciones de dosis fija de anticuerpos de IgM recombinantes para la mejora del resultado neurológico en el modelo de lesión de la médula espinal como se describe en el Ejemplo 14 de este documento. En consecuencia, el tratamiento intravenoso con combinaciones de anticuerpos de IgM (como aditivos) o el control del vehículo se administra 10 minutos después de la lesión. Los puntos finales locomotores se controlan como se indicó anteriormente. Además, la mielinización y el crecimiento de neuritas se evalúan para examinar los cambios producidos por las combinaciones de anticuerpos. Las

combinaciones evaluadas se muestran en la Tabla 6A y la Tabla 6B.

Tabla 6A. Resumen de grupos de tratamiento - combinaciones de anticuerpo de IgM recombinantes

Tratamiento	Resultado histológico propuesto	Nivel de dosis (mg/kg, iv)	Evaluaciones neurológicas	Evaluaciones histológicas
Vehículo (salina)	NA	0	Puntaje BBB	Mielinación por EM Incremento de neurita por esteología
IgM12 + IgM42	Resultado de neurita + Resultado de neurita	0,25 0,25	Puntaje BBB	Mielinación por EM Incremento de neurita por esteología
IgM22 + IgM46	Remielinación + Remielinación	0,25 0,25	Puntaje BBB	Mielinación por EM Incremento de neurita por esteología
IgM12 + IgM22	Resultado de neurita + Remielinación	0,25 0,25	Puntaje BBB	Mielinación por EM Incremento de neurita por esteología
IgM12 + IgM46	Resultado de neurita + Remielinación	0,25 0,25	Puntaje BBB	Mielinación por EM Incremento de neurita por esteología
IgM42 + IgM22	Resultado de neurita + Remielinación	0,25 0,25	Puntaje BBB	Mielinación por EM Incremento de neurita por esteología
IgM42 + IgM46	Resultado de neurita + Remielinación	0,25 0,25	Puntaje BBB	Mielinación por EM Incremento de neurita por esteología

Tabla 6B. Resumen de grupos de tratamiento - Resultados

Tratamiento	Resultado histológico propuesto	Nivel de dosis (mg/kg, iv)	Tipo(s) de resultado histológico	Resultado histológico relativo: Tipo(s) de resultado(*)	Resultado neurológico relativo - Puntaje BBB(*)
Vehículo (salina)	NA	0	Ninguno	Ninguno	Ninguno
IgM12 + IgM42	Resultado de neurita + Resultado de neurita	0,25 0,25	Incremento de neurita	> incremento de neurita: (X+ IgM12 incremento de neurita) y (X+ IgM42 incremento de neurita)	> Mejora de BBB que: (X+ IgM12 BBB) y (X+ IgM42 BBB)
IgM22 + IgM46	Remielinación + Remielinación	0,25 0,25	Mielinación	> remielinación que: (X+ IgM22 remielinación) y (X+ IgM46 remielinación)	> Mejora de BBB que: (X+ IgM22 BBB) y (X+ IgM46 BBB)
IgM12 + IgM22	Resultado de neurita + Remielinación	0,25 0,25	Resultado de neurita + Remielinación	> remielinación y > incremento de neurita que: (X+ IgM12 incremento de neurita) y (X+ IgM22 remielinación)	> Mejora de BBB que: (X+ IgM12 BBB) y (X+ IgM22 BBB)
IgM12 + IgM46	Resultado de neurita + Remielinación	0,25 0,25	Resultado de neurita + Remielinación	> remielinación y > incremento de neurita que: (X+ IgM12 incremento de neurita) y (X+ IgM46 remielinación)	> Mejora de BBB que: (X+ IgM12 BBB) y (X+ IgM46 BBB)
IgM42 + IgM22	Resultado de neurita + Remielinación	0,25 0,25	Resultado de neurita + Remielinación	> remielinación y > incremento de neurita que: (X+ IgM42 incremento de neurita) y (X+ IgM22 remielinación)	> Mejora de BBB que: (X+ IgM42 BBB) y (X+ IgM22 BBB)
IgM42 + IgM46	Resultado de neurita + Remielinación	0,25 0,25	Resultado de neurita + Remielinación	> remielinación y > incremento de neurita que: (X+ IgM42 incremento de neurita) y (X+ IgM46 remielinación)	> Mejora de BBB que: (X+ IgM42 BBB) y (X+ IgM46 BBB)

(*) X indica mejora, X+ indica más mejora, y X++ indica aún más mejora. Los valores de puntuación de mejora son relativos a la dosificación de un anticuerpo dado. Por lo tanto X+ es una mayor mejora que X para el mismo Ab. La X de mejora para un Ab no es necesariamente igual que el valor X para otro Ab; el valor X+ de un Ab no es necesariamente igual que el valor X+ de otro Ab, y el valor X+++ de un Ab no es necesariamente igual que el valor X+++ de otro Ab.

[0286] En este experimento, se ha encontrado que cada una de las combinaciones de anticuerpos recombinantes IgM12 + IgM42, IgM22 + IgM46, IgM12 + IgM22, IgM12 + IgM46, IgM42 + IgM22 e IgM42 + IgM46 producen mejoras estadísticamente significativas y dependientes de la dosis en la función de las extremidades posteriores (puntos finales locomotores) tal como se ha encontrado por los parámetros de BBB. No se encuentran distinciones en la mejora en función del género.

[0287] Por otra parte, se ha encontrado que cada una de las combinaciones mejora la función locomotora de una manera supra-aditiva (es decir sinérgica) en comparación con las mejoras de cada uno de los anticuerpos solos en la misma dosis. Nuevamente, no se ha encontrado distinciones en la mejora basadas en el género.

5 **[0288]** Además de producir mejoras estadísticamente significativas dependientes de la dosis en varios puntos terminales sensoriomotores incluyendo condición de recubrimiento, parámetros de marcha y puntaje Rotarod en comparación con el tratamiento del vehículo ($P < 0,05$ para cada punto final comparado con el tratamiento del vehículo), la combinación de IgM12 + IgM42 mejoró significativamente el crecimiento de neuritas en comparación con los controles del vehículo ($P < 0,05$). El grado de crecimiento de neuritas es supraaditivo comparado con el efecto aditivo de cada anticuerpo administrado solo. Por lo tanto, se entiende que estos anticuerpos desencadenan el crecimiento por mecanismos de acción distintos; esto es consistente con los patrones de unión distintos respectivos de estos anticuerpos al tejido neural.

10 **[0289]** Además de producir mejoras estadísticamente significativas, dependientes de la dosis en diversos puntos terminales sensoriomotores incluyendo condición de recubrimiento, parámetros de marcha y puntuación Rotarod en comparación con el tratamiento del vehículo ($P < 0,05$ para cada punto final en comparación con el tratamiento del vehículo), la combinación de IgM22 + IgM46 produjo un aumento significativo en la mielinización en comparación con los controles tratados con vehículo ($P < 0,05$). Además, el grado de remielinización es supraaditivo comparado con el efecto aditivo predicho de IgM22 o IgM46 administrado solo. Sin estar obligado por la teoría, esto se entiende como el resultado de la actividad paracrina. En consecuencia, cuando las neuronas en crecimiento y los oligodendrocitos en crecimiento están presentes, las células respectivamente provocan una producción paracrina que afecta positivamente al otro tipo de célula en evaluación.

20 **[0290]** Además de producir mejoras estadísticamente significativas dependientes de la dosis en varios puntos terminales sensoriomotores incluyendo condición de recubrimiento, parámetros de marcha y puntaje Rotarod en comparación con el tratamiento del vehículo ($P < 0,05$ para cada punto final comparado con el tratamiento del vehículo), la combinación de IgM12 + IgM22 produce un aumento significativo en la mielinización, así como el crecimiento de neuronas en comparación con los controles tratados con vehículo en la médula espinal lesionada ($P < 0,05$). Además, el grado de crecimiento de neuronas y remielinización es supraaditivo comparado con el efecto de IgM12 o IgM22, respectivamente, administrados solos a las dosis utilizadas aquí. Sin estar obligado por la teoría, esto se entiende como el resultado de la actividad paracrina. En consecuencia, cuando las neuronas en crecimiento y los oligodendrocitos en crecimiento están presentes, estas células respectivamente provocan una producción paracrina que afecta positivamente al otro tipo de célula en evaluación.

30 **[0291]** Además de producir mejoras estadísticamente significativas dependientes de la dosis en varios puntos terminales sensoriomotores incluyendo condición de recubrimiento, parámetros de la marcha y puntaje Rotarod en comparación con el tratamiento del vehículo ($P < 0,05$ para cada punto final comparado con el tratamiento del vehículo), la combinación de IgM12 + IgM46 produce un aumento significativo en la mielinización, así como el crecimiento de neuronas en comparación con los controles tratados con vehículo ($P < 0,05$). Además, el grado de crecimiento de neuronas y remielinización es supraaditivo en comparación con el efecto de IgM12 o IgM46, respectivamente, administrados solos a las dosis utilizadas aquí. Sin estar obligado por la teoría, esto se entiende como el resultado de la actividad paracrina. En consecuencia, cuando las neuronas en crecimiento y los oligodendrocitos en crecimiento están presentes, las células respectivamente provocan una producción paracrina que afecta positivamente al otro tipo de célula en evaluación.

45 **[0292]** Además de producir mejoras estadísticamente significativas dependientes de la dosis en varios puntos terminales sensoriomotores incluyendo condición de recubrimiento, parámetros de marcha y puntaje Rotarod en comparación con el tratamiento del vehículo ($P < 0,05$ para cada punto final comparado con el tratamiento del vehículo), la combinación de IgM22 + IgM42 produce un aumento significativo en la mielinización, así como el crecimiento de neuronas en comparación con los controles tratados con vehículo ($P < 0,05$). Además, el grado de crecimiento de neuronas y remielinización es supraaditivo comparado con el efecto de IgM22 o IgM42, respectivamente, administrados solos a las dosis utilizadas aquí. Sin estar obligado por la teoría, esto se entiende como el resultado de la actividad paracrina. En consecuencia, cuando las neuronas en crecimiento y los oligodendrocitos en crecimiento están presentes, las células respectivamente provocan una producción paracrina que afecta positivamente al otro tipo de célula en evaluación.

55 **[0293]** Además de producir mejoras estadísticamente significativas, dependientes de la dosis en diversos puntos terminales sensoriomotores incluyendo condición de recubrimiento, parámetros de la marcha y puntaje Rotarod en comparación con el tratamiento del vehículo ($P < 0,05$ para cada punto final en comparación con el tratamiento del vehículo), la combinación de IgM46 + IgM42 produce un aumento significativo en la mielinización, así como el crecimiento de neuronas en comparación con los controles tratados con vehículo ($P < 0,05$). Además, el grado de crecimiento de neuronas y remielinización es supraaditivo comparado con el efecto de IgM46 o IgM42, respectivamente, administrados solos a las dosis utilizadas aquí. Sin estar obligado por la teoría, esto se entiende como el resultado de la actividad paracrina. En consecuencia, cuando las neuronas en crecimiento y los oligodendrocitos en crecimiento están presentes, las células respectivamente provocan una producción paracrina que afecta positivamente al otro tipo de célula en evaluación.

65 **Ejemplo 18: Anticuerpo rHIgM12 recombinante, una IgM de unión a neurona humana, protege los axones de la médula espinal**

[0294] Hemos demostrado que un anticuerpo de suero humano natural, sHlgM12, se une a neuronas *in vitro* y promueve el crecimiento de neuritas. Generamos una forma recombinante, rHlgM12, con propiedades idénticas. La infección intracerebral con el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV) de cepas de ratón susceptibles causa una enfermedad desmielinizante crónica con pérdida axonal progresiva y disfunción neurológica similar a las formas progresivas de esclerosis múltiple. El tratamiento de este modelo con anticuerpos de clase IgM que se unen a oligodendrocitos mejora la remielinización del SNC (Warrington et al (2007) J Neurosci Res 85: 967-976). Por el contrario, el anticuerpo monoclonal humano derivado del suero (sHlgM12) que se une a las neuronas, promueve un crecimiento de neuritas robusto en el mismo grado que laminina y reduce los efectos inhibidores de la mielina del SNC sobre el crecimiento de neuritas (Warrington et al (2004) J Neuropathol Exp Neurol 63 (5): 461 - 473). Más recientemente, se generó una forma recombinante de sHlgM12 humano (rHlgM12) con propiedades biológicas idénticas, tal como se describió anteriormente. Para estudiar los efectos de rHlgM12 en la integridad axonal de la médula espinal realizamos el etiquetado retrógrado, una técnica que se basa en axones anatómicamente continuos y funcionalmente preservados.

MÉTODOS

[0295] Etiquetado retrógrado: Después de anestesiarse los ratones, laminectomía dorsal se realizó en las vértebras torácicas inferiores (T10-11). La médula espinal se hemiseccionó en el lado derecho y el sitio de hemisección se empaquetó con una solución estéril de Fluorogold al 4%. Una semana después de la cirugía, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los cerebros. Se realizaron secciones seriales (40 mm de grosor) del tallo encefálico y se analizó cada cuarta sección. Las neuronas grandes y brillantes fluorescentes se contaron con aumentos de 200x a partir de 16 cortes cerebrales.

RESULTADOS

[0296] El modelo TMEV ofrece una plataforma para desarrollar estrategias para promover la neuroprotección y prevenir la pérdida de axones. Las primeras etapas de la enfermedad incluyen inflamación y desmielinización; las etapas posteriores se presentan con pérdida de axón y déficits funcionales. Como se detalla en los ejemplos anteriores, rHlgM12 ingresa a la médula espinal y se localiza en neurofilamentos + (NF) axones después de una única inyección i.p. de 1 mg, como se confirma por las imágenes confocales (FIGURA 15). rHlgM12 también se colocalizó como haces de fibras NF+ cortadas transversalmente (FIGURA 15D). En estudios con animales, rHlgM12 mejora la cantidad de neuronas del tronco encefálico marcadas retrógradamente. rHlgM12 o solución salina se administraron a ratones SJL 90 días después de la infección (ppp). La cirugía de médula espinal para el etiquetado retrógrado se realizó 9 semanas después del tratamiento. Una semana después de la cirugía, se sacrificaron los ratones y se cuantificaron las neuronas marcadas fluorescentemente en secciones de tronco encefálico en serie. rHlgM12 mejora el número de neuronas del tronco encefálico marcadas retrógradas en comparación con el control de solución salina (datos no mostrados). Por lo tanto, los ratones tratados con rHlgM12 tenían neuronas del tronco cerebral marcadas más retrógradas en comparación con los controles tratados con solución salina.

Ejemplo 19: Una dosis única de anticuerpo monoclonal humano de unión a neuronas mejora la actividad espontánea en un modelo murino de desmielinización

[0297] Nuestro laboratorio demostró que un anticuerpo de suero humano natural, sHlgM12, se une a las neuronas *in vitro* y promueve el crecimiento de neuritas. Generamos una forma recombinante, rHlgM12, con propiedades idénticas. La infección intracerebral con el virus de encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV) de cepas de ratón susceptibles produce una enfermedad desmielinizante crónica con pérdida axonal progresiva y disfunción neurológica similar a formas progresivas de esclerosis múltiple. Para estudiar los efectos de rHlgM12 en la función motora de ratones infectados con TMEV, controlamos la actividad nocturna espontánea durante muchas semanas. El comportamiento nocturno es una medida sensible de la función neurológica de los roedores porque se espera que ocurran cambios máximos de actividad durante el período de monitoreo nocturno normalmente activo. Los ratones se colocaron en cajas de actividad ocho días antes del tratamiento para recoger la actividad espontánea inicial. Después del tratamiento, la actividad en cada grupo se registró continuamente durante 8 semanas. Elegimos un largo período de monitoreo de 8 semanas por dos razones: (1) demostramos previamente que la remielinización inducida por IgM está presente 5 semanas después del tratamiento, y (2) la enfermedad desmielinizante inducida por TMEV en esta cepa progresa muy lentamente. Debido a los largos períodos de observación y los grandes conjuntos de datos, las diferencias entre los grupos de tratamiento pueden ser difíciles de apreciar al estudiar las grabaciones originales sin filtrar. Para delinear claramente los cambios en los datos originales altamente fluctuantes, aplicamos tres métodos diferentes: (1) binning, (2) aplicación de filtros de paso bajo gaussianos (GF) y (3) adaptación polinómica. Usando cada uno de los tres métodos mostramos que, en comparación con el control de IgM y solución salina, el tratamiento temprano con rHlgM12 indujo una mejora en la función motora tanto horizontal como vertical, mientras que el tratamiento posterior mejoró solo la actividad horizontal. rHlgM12 no alteró la actividad de ratones normales no infectados. Este estudio respalda la hipótesis de que el tratamiento con una IgM de unión a neuronas no solo protege las neuronas *in vitro*, sino que también influye en la mejora motora funcional.

Introducción

[0298] La monitorización a largo plazo y el análisis de la función neurológica en modelos de enfermedades de roedores sigue siendo un desafío. El comportamiento nocturno es una medida sensible de la función neurológica de los roedores porque se espera que ocurran cambios máximos de actividad durante el período de monitoreo nocturno normalmente activo [1]. Sin embargo, en los modelos animales de enfermedades lentamente progresivas, la monitorización del rendimiento a menudo se extiende a lo largo de varias semanas. Anteriormente informamos que el anticuerpo de unión a oligodendrocitos (rHlgM22) realizó la remielinización a las 5 semanas después del tratamiento [2]. Tomados en conjunto que tanto la evolución de la enfermedad como la reparación es un proceso lento y para asegurar que se tenga en cuenta cualquier fluctuación en la actividad, monitoreamos la actividad prolongada con la misma densidad de muestreo utilizada en el monitoreo a corto plazo. Esto creó conjuntos de datos grandes y altamente fluctuantes (Figura 32A, C). Para delinear claramente los cambios posteriores al tratamiento y recuperar las tendencias generales en la actividad a largo plazo, comparamos el uso del agrupamiento de datos, el filtrado gaussiano y el ajuste polinómico mediante el uso de Mathematica (Wolfram Research, Inc.).

[0299] La infección intracerebral con el virus de encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV) de cepas de ratón susceptibles da como resultado una enfermedad desmielinizante crónica con disfunción neurológica progresiva similar a las formas progresivas de esclerosis múltiple [3]. El tratamiento de este modelo con anticuerpos de clase IgM que se unen a los oligodendrocitos mejora la remielinización del SNC [4]. Por el contrario, un anticuerpo monoclonal humano derivado del suero (sHlgM12) que se une a las neuronas, promueve el crecimiento robusto de neuritas en el mismo grado que la laminina y reduce los efectos inhibidores de la mielina del SNC sobre el crecimiento de neuritas [5]. Más recientemente, se generó una forma recombinante de sHlgM12 humano (rHlgM12) con propiedades biológicas idénticas. Mostramos previamente que rHlgM12 tiene una vida media de 3,6 horas, pero aún cruza la barrera hematoencefálica y se une a los tejidos nerviosos (observación no publicada). Para estudiar los efectos de rHlgM12 sobre la actividad de ratones infectados con TMEV, monitorizamos la actividad espontánea durante varias semanas usando cajas de actividad AccuScan (Accuscan Instruments, Inc., Columbus, OH). Elegimos un período de monitoreo de 8 semanas relativamente largo por dos razones: (1) la remielinización inducida por IgM está presente 5 semanas después del tratamiento, y (2) la enfermedad desmielinizante inducida por TMEV en esta cepa progresa muy lentamente en comparación con los modelos de EAE puramente autoinmunes de EM [6]. Debido a los largos períodos de observación en comparación con los estudios publicados anteriormente (TABLA 7), resultó difícil identificar los cambios por inspección visual de los datos brutos.

TABLA 7

Duración del monitoreo de la actividad espontánea en estudios publicados en comparación con el estudio actual	
Publicación	Duración de la sesión de actividad locomotora registrada
Mikami et al. 2002, 2004 [14, 15]	10 minutos (10 minutos de habituación)
Melnick y Dow-Edwards 2001 [16]	60 minutos (sin habituación)
Chen et al. 2005 [17]	30 minutos (sin habituación)
Torres-Reveron y Dow-Edwards 2006 [18]	60 minutos (20 minutos de habituación)
Zhu et al. 2007 [19]	60 minutos (sin habituación)
Li et al. 2009 [20]	3 horas (1 hora de habituación)
(Rivera-Quinones et al., 1998; McGavern et al., 1999 [1, 21])	3 días (sin habituación)
Estudio actual	64 días (8 días de habituación)

Materiales y métodos:

[0300] **Ratones:** Ratones SJL/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) fueron alojados y criados en la instalación de cuidado de animales de Mayo Clinic. Los protocolos animales fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso Animal de la Mayo Clinic.

[0301] **Modelo de virus de Theiler de desmielinización:** La enfermedad desmielinizante fue inducida en ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad, por inyección intracerebral de TMEV. Una aguja de calibre 27 administró 10 μ l que contiene 2,0 x 10⁵ unidades formadoras de placas de la cepa TMEV de Daniel. Esto dio como resultado una incidencia >98% de infección con muertes poco frecuentes. Todos los animales desarrollaron encefalitis leve, que se resolvió en 2 semanas. Los animales se empeoran durante los próximos 6-8 meses con enfermedad desmielinizante crónica de la médula espinal. La lesión y la pérdida de Axon comienzan tres meses después de que la infección se correlaciona con la disfunción neurológica [3].

[0302] **Tratamiento de anticuerpo:** Ratones SJL (no infectados, 45 y 90 días después de la infección) fueron tratados con una sola dosis de 200 μ g intraperitoneal de anticuerpos (rHlgM12 o isotipo de control IgM) disuelta en 0,5 ml de PBS. El tercer grupo se trató solo con 0,5 ml de PBS.

[0303] Monitorización de actividad espontánea: la actividad locomotora espontánea se registró con el aparato de campo abierto Digiscan (OF) (Omnitech Electronics; Columbus, OH) y el software Versamax, v.4.12-1AFE (Accuscan Instruments, Inc., Columbus, OH). El aparato consta de seis jaulas acrílicas (40x40x30,5cm) sostenidas por un marco de metal que contiene dos conjuntos de células fotoeléctricas. El dispositivo mide la cantidad de movimientos horizontales y verticales discretos al tabular el número de interrupciones proyectadas del haz infrarrojo. En todas las jaulas, los ratones se expusieron a condiciones ambientales idénticas: (a) alimentos y agua de libre acceso, (b) un ciclo luz/oscuridad normal de 12 horas, (c) temperatura ambiente de 70°F. En cada experimento, se excluyeron los animales hiperactivos y, en raras ocasiones, sobrepeso, y el resto de los ratones se aleatorizaron. Se colocaron varios grupos de 5 ratones SJL en el centro de cada jaula y se recolectó la actividad espontánea inicial durante el período de 8 días consecutivos. Después de este período, tres grupos de ratones con la actividad inicial más similar se trataron con rHlgM12, anticuerpo IgM de control o solución salina y luego se monitorizaron durante el período de 8 semanas. Los datos se recopilaron como el número de cortes de haz por bloques de 1 hora. Las actividades horizontales y verticales totales se registraron utilizando el programa Versadat, v.3.02-1AFE (Accuscan Instruments). No pudimos poner más de 5 animales por caja de actividad porque este es el número máximo de animales permitido por el Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional (IACUC).

[0304] Análisis de datos: las diferencias entre los grupos de tratamiento pueden ser difíciles de apreciar estudiando los registros originales sin filtrar (Figuras 32A-C). Para recuperar las tendencias lentas en los datos originales altamente fluctuantes aplicamos tres diferentes métodos: 1) agrupación, 2) aplicación del filtro de paso bajo gaussiano (GF) y 3) adaptación polinomial.

[0305] El agrupamiento de datos es el método más simple y reemplaza un grupo de puntos de datos dentro de un intervalo preseleccionado por su valor promedio. En nuestro caso, seleccionamos un contenedor nocturno dado que la actividad murina alcanza su máximo en la noche. Por lo tanto, reemplazamos todas las lecturas nocturnas (12 h/día) por su valor promedio como se muestra en las Figuras 33A, 33B, 35C, 35D, 37C y 37D. La comparación de grupos se puede realizar mediante una simple prueba t para una diferencia de medias, con un tamaño de muestra efectivo de 12 horas por tratamiento. Mientras que estas comparaciones son simples, el tamaño de muestra pequeño en cada punto de tiempo da como resultado grandes errores estándar y las comparaciones estadísticas son de uso limitado. En general, el agrupamiento de datos es un método efectivo para visualizar datos ruidosos, pero tiene un uso limitado para las pruebas estadísticas.

[0306] El filtrado gaussiano (GF) (también conocido como filtrado de paso bajo, suavizado de datos o mejora de la sensibilidad) es un procedimiento de reducción de ruido comúnmente utilizado en Fourier transforman la espectroscopia y el procesamiento de imágenes [7]. GF, realizado con una selección adecuada de ampliación de Gauss (GB, en días) filtró las fluctuaciones de alta frecuencia en un nivel deseado. La elección del filtro es arbitraria y puede estar guiada por la tasa de cambios de actividad esperados. GF es un método de suavizado que utiliza información de puntos tomados de ambos lados de un valor y pondera la influencia de estos puntos de manera que la influencia se atenúa de acuerdo con la función gaussiana. Computacionalmente, el GF se puede implementar de dos maneras equivalentes: 1) Transformación de Fourier (FT) de los datos, seguida de multiplicación por una función gaussiana y FT inversa del producto; y 2) convolución directa de los datos con un kernel gaussiano. En los paquetes de software de alto nivel (Matlab (Mathworks) o Mathematica (Wolfram)) la función de filtro gaussiano está disponible con una programación mínima o nula por parte del usuario. Con la selección adecuada de GB, el método GF detallado anteriormente permite la visualización simplificada de datos altamente complejos y heterogéneos. Una limitación de GF es que, si bien permite una fácil visualización de las tendencias, las comparaciones estadísticas se complican por la elección del GB.

[0307] Para comparar y demostrar un método que permite la comparación estadística simplificada, ajustamos polinomios a los datos. Estos modelos permitieron términos polinómicos a través de cualquier grado (x^n) y parámetros de forma estimados por separado para cada grupo de tratamiento (términos de interacción). Nuestra elección de un polinomio de 6º grado fue arbitraria después de explorar varias opciones, pero permitió suficiente flexibilidad para modelar efectos no lineales a lo largo del tiempo. Debido a que los diferentes grupos de tratamiento se ajustaron de manera óptima utilizando polinomios de orden variable, optamos por permitir una mayor flexibilidad de orden. Los criterios de información de Akaike (AIC) se utilizaron para determinar el "mejor ajuste" de las líneas polinómicas en varios de los grupos de tratamiento [8]. AIC es un método de comparación de modelos que equilibra la ganancia en R^2 agregando términos adicionales, pero penaliza la sobrecomplejidad (es decir, el uso de grados de libertad). En general, el ajuste de 3º orden fue suficiente para capturar la tendencia de los datos, y para algunos casos el 2º orden o incluso el ajuste lineal fue "mejor" según AIC. Sin embargo, nuestro objetivo principal fue comparar los grupos de tratamiento en puntos temporales observados. Debido a la gran cantidad de puntos de datos, y debido a que no estamos usando el ajuste polinómico para predecir (o extrapolar) valores de tratamiento fuera de nuestros datos observados, el impacto del "sobreajuste" en los resultados es mínimo.

[0308] Una ventaja del ajuste polinómico es que la comparación estadística de los grupos de tratamiento es sencilla: los tratamientos se pueden comparar en puntos temporales específicos usando los valores del modelo predicho y los errores estándar respectivos. Se pueden realizar comparaciones directas por parejas de tratamientos a intervalos regulares durante todo el período de tiempo para determinar cuándo los grupos de tratamiento han divergido significativamente. Finalmente, el ajuste polinomial elimina el ruido adicional de frecuencia media y baja que enfoca

la atención visual en la tendencia general durante todo el intervalo de tiempo.

[0309] Sin embargo, dentro de cada uno de los experimentos, algunos grupos de ratones tenían una actividad horizontal y vertical basal algo diferente (8 días). Por lo tanto, primero usamos los valores Z para estandarizar la actividad de la línea de base de forma independiente para cada grupo y luego realizamos el filtrado gaussiano o los polinomios ajustados a estos valores.

[0310] Análisis estadístico: La agrupación de datos y el filtro de paso bajo gaussiano de los datos se realizaron utilizando un macro escrito en Mathematica (Wolfram). Macro e instrucciones están disponibles en mayoresearch.mayo.edu/mayo/request/rodriguez_lab/software.cfm. Los modelos de regresión polinomial y las comparaciones estadísticas de los grupos de tratamiento se realizaron usando los valores del modelo predicho y los errores estándar respectivos basados en la estadística z (SAS Institute, Inc.). Las comparaciones directas por parejas de tratamientos se realizaron para cada día a lo largo de todo el marco de tiempo, y la significación estadística se determinó en el $\alpha = 0,05$ umbral típico. No se hicieron ajustes para comparaciones múltiples.

RESULTADOS

rHlgM12 mejora la actividad horizontal en ratones SJL cuando se les administra a 90dpi

[0311] Se colocaron tres grupos de 5 ratones SJL 90 días después de la infección (ppp) en cajas de actividad y se midió la actividad basal durante 8 días consecutivos. Dos grupos de ratones fueron tratados con una única dosis de 200 μg de rHlgM12 o un control de isotipo IgM. El tercer grupo fue tratado con solución salina. Después del tratamiento, la actividad espontánea se registró continuamente durante 8 semanas. Debido a que los datos se recopilaron en bloques de 1 hora, obtuvimos aproximadamente 900 puntos de datos para cada grupo. Estos datos brutos originales (Figuras 32A-C) son altamente fluctuantes, por lo que las diferencias entre los grupos de tratamiento pueden ser difíciles de apreciar. Los tres métodos (agrupación, filtrado gaussiano y adaptación polinómica) revelaron que los ratones tratados con rHlgM12 mostraron una mejora en la actividad horizontal, mientras que los ratones de control tratados con IgM y solución salina no presentaron cambios en la actividad durante el período de 8 semanas (Figura 33A, C y E). Mediante el uso de comparaciones directas por parejas de tres tratamientos después del ajuste polinómico, determinamos que la mejora en la función motora horizontal en ratones tratados con rHlgM12 se volvió estadísticamente significativa el día 7 después del tratamiento (en comparación con IgM de control) y el día 11 (en comparación con solución salina) (Figura 34). La mejora observada en la actividad nocturna horizontal de los animales tratados con rHlgM12 persistió durante aproximadamente 30 días y luego volvió a los niveles basales. La comparación por pares de los grupos de tratamiento con IgM con solución salina versus control mostró significación estadística para los días 38-52. Sin embargo, cuando se compara con las principales diferencias observadas entre el grupo de tratamiento rHlgM12 y los controles, creemos que estas diferencias entre los grupos de control no son biológicamente significativas. Por otro lado, la actividad vertical no mostró diferencias importantes y fue similar en los tres grupos (Figura 33B, D y F).

rHlgM12 mejora la actividad horizontal y vertical en ratones SJL cuando se administra a 45dpi

[0312] El estudio anterior utilizó la actividad vertical (comportamiento de encabritarse) como lectura primaria [1]. Debido a la deserción axonal en ratones infectados con TMEV crónicamente, las extremidades posteriores se volvieron progresivamente débiles y rígidas por lo que se redujo el acto de encabritarse. En el primer experimento de este estudio, cuando rHlgM12 se administró en el momento de máxima desmielinización (90dpi) y el inicio de la pérdida axonal progresiva, solo se mejoró la actividad horizontal. El comportamiento de encabritarse no se vio afectado y fue equivalente en los tres grupos de tratamiento. Por lo tanto, preguntamos si el tratamiento en un momento anterior puede ser más beneficioso. En un segundo experimento, grupos de 5 ratones se trataron a 45 dpi con una sola dosis de 200 μg de rHlgM12, una IgM de control de isotipo o solución salina. Se utilizó un diseño experimental idéntico; la actividad inicial se recogió durante 8 días y la actividad posterior al tratamiento durante 8 semanas. En este experimento, comenzando alrededor de 2 semanas después del tratamiento, los ratones tratados con rHlgM12 mostraron claras mejoras tanto en la actividad horizontal como en la vertical. Esto fue evidente después de usar los tres métodos: promediar los datos, aplicar filtro Gaussiano o ajuste polinómico (Figura 35C-H). Los ratones control IgM y solución salina mostraron niveles de actividad similares durante el final del estudio. En ratones tratados con rHlgM12, la mejora en la actividad horizontal fue evidente hasta que finalizó el experimento. Por otro lado, la mejora en la actividad vertical duró aproximadamente 4 semanas y luego disminuyó a los valores iniciales. Las comparaciones directas por parejas de tres tratamientos mostraron que la mejora en la función motora horizontal en ratones tratados con rHlgM12 divergía significativamente el día 13 después del tratamiento (en comparación con la IgM de control) y el día 9 (en comparación con la solución salina) (Figura 36A y C). Asimismo, la función motora vertical en ratones tratados con rHlgM12 divergió significativamente el día 14 después del tratamiento (en comparación con la IgM de control) y el día 6 (en comparación con la solución salina) (Figura 36B y D). La comparación de los grupos de control con IgM frente a los tratados con solución salina no reveló diferencias biológicas importantes para la actividad horizontal o vertical (Figura 36E y F).

rHlgM12 no altera la actividad espontánea en ratones normales no infectados

[0313] El tratamiento con rHlgM12 en los dos experimentos previos mostró un claro efecto beneficioso en ratones infectados con discapacidad neurológica. Para excluir la posibilidad de que este anticuerpo pueda tener propiedades irritables y, por lo tanto, provoque un aumento de la función motora, se realizó un experimento similar con ratones no infectados. Tres grupos de ratones no infectados emparejados por edad se trataron con rHlgM12, IgM de control o solución salina. Comparado con la mejora de la actividad en ratones infectados, rHlgM12 así como los otros dos tratamientos no indujeron ningún aumento en la función motora de ratones normales (Figura 37). Los tres grupos mostraron una tendencia a disminuir en la actividad espontánea. Este resultado indica que ninguno de los anticuerpos tiene una influencia en el aumento de la actividad en ratones normales.

10 DISCUSIÓN

[0314] Existe una necesidad crítica para el desarrollo de terapias neuroprotectoras para la esclerosis múltiple así como para otras enfermedades desmielinizantes y neurodegenerativas. Aunque existen algunos fármacos antiinflamatorios que pueden conducir indirectamente a una disminución del daño axonal durante la enfermedad inflamatoria del SNC, no existen medicamentos que actúen directamente a nivel de neuronas/axones. El objetivo principal de la neuroprotección consiste en limitar la disfunción neuronal y tratar de mantener la integridad funcional de las neuronas y los axones. Durante muchos años, la desmielinización, el sello patológico de la EM, se consideró como causa de déficits neurológicos permanentes. Ahora está claro que la desmielinización es necesaria, pero no suficiente para la pérdida axonal permanente [9]. La desmielinización solo predispone a los axones desnudos a la lesión secundaria causada por la citotoxicidad de las células T o la pérdida del soporte neurotrófico local de los oligodendrocitos muertos [10].

[0315] La observación previa de que el anticuerpo de unión a la neurona sHlgM12 promovió la extensión robusta de neuritas [5] representa una clara respuesta *in vitro* beneficiosa. Debido a que la versión recombinante de este anticuerpo mostró propiedades *in vitro* similares, preguntamos si afectaría la actividad motora de ratones con enfermedad desmielinizante inducida por TMEV. El análisis de la función motora se realizó mediante el control de la actividad nocturna espontánea. Primero, tratamos a los ratones en el momento de máxima desmielinización y el inicio de la pérdida axonal (90dpi). Ocho semanas después del tratamiento, rHlgM12 mejoró solo la actividad motora horizontal, mientras que la actividad vertical no se vio afectada. Sin embargo, cuando los ratones fueron tratados antes en la enfermedad (a 45dpi), rHlgM12 mejoró tanto la actividad horizontal como la vertical. En la enfermedad crónica inducida por TMEV, el comportamiento de encabritarse (actividad vertical) es más severamente afectado y parece que la degeneración y la pérdida de axones responsables de esta actividad es irreversible. Por el contrario, la fase temprana de la enfermedad, cuando estos axones no se lesionan irreversiblemente, parece ser el momento ideal para el tratamiento. Jones et al. utilizaron el modelo EAE y al estudiar el abandono axonal y la función motora propusieron un paradigma idéntico; el tratamiento con fármacos neuroprotectores debe comenzar temprano en la enfermedad, incluso antes de la aparición de déficits motores [11]. En segundo lugar, debido a que la mejora funcional ocurre aproximadamente dos semanas después del tratamiento y comienza a desvanecerse aproximadamente entre 25 y 30 días después, es posible que se necesiten tratamientos repetidos para mantener la función motora. Desafortunadamente, en nuestros estudios, no fue posible examinar múltiples dosis de IgM humanas debido a la respuesta inmune del anticuerpo antihumano en ratones, lo que resulta en anafilaxis. A2B5 es un anticuerpo monoclonal de ratón que también promueve el crecimiento de neuritas [5] y representa un posible candidato para evaluar la dosificación única versus múltiple en el resultado funcional y su duración de acción. Finalmente, ninguno de los tratamientos tuvo un efecto sobre la función motora de animales normales no infectados. Independientemente del tratamiento, todos los grupos de ratones normales mostraron una disminución gradual de la actividad espontánea, lo que puede explicarse por la habituación al medio ambiente. Esta disminución de la actividad en animales normales hace que el aumento inducido por rHlgM12 en la actividad de ratones enfermos sea incluso más impresionante.

[0316] Hemos demostrado una mejora en la función motora en un modelo crónico progresivo de enfermedad inflamatoria desmielinizante en la cual ha sido generalmente muy difícil prevenir el desarrollo de déficits neurológicos. Por lo tanto, el anticuerpo monoclonal de unión a neuronas rHlgM12 representa un agente terapéutico muy prometedor para el tratamiento no solo de la EM humana, sino también de otros desórdenes desmielinizantes o neurodegenerativos. Además, debido a que hay ejemplos de ataques de EM clínicamente silenciosos [12, 13], nosotros y otros hemos propuesto que los compuestos neuroprotectores se complementen con agentes inmunomoduladores [11]. Proponemos que el tratamiento combinado de fármacos inmunomoduladores y rHlgM12 puede dar lugar a una mejora significativa de la preservación y reparación del SNC después de una lesión axonal.

[0317] Tomados en conjunto, los resultados de este estudio proporcionan tres conclusiones importantes: 1) la etapa de la enfermedad cuando se administra el tratamiento es crítica (el tratamiento temprano es más beneficioso); 2) para mantener aún más la función motora mejorada, puede haber una necesidad de tratamientos repetidos y 3) rHlgM12 no es tóxico y no afecta la función motora en animales normales no infectados. Los hallazgos son consistentes con la hipótesis de que un anticuerpo recombinante que se dirige a las neuronas mejora la función neurológica en un modelo axonal crónico de desmielinización.

65 REFERENCIAS

[0318]

1. McGavern, D.B., et al., Quantitative assessment of neurologic deficits in a chronic progressive murine model of CNS demyelination. *Exp Neurol*, 1999.158(1): p. 171-81.
- 5 2. Warrington, A.E., et al., Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(12): p. 6820-5.
3. McGavern, D.B., et al., Axonal loss results in spinal cord atrophy, electrophysiological abnormalities and neurological deficits following demyelination in a chronic inflammatory model of multiple sclerosis. *Brain*, 2000. 123 Pt 3: p. 519-31.
- 10 4. Warrington, A.E., et al., A recombinant human IgM promotes myelin repair after a single, very low dose. *J Neurosci Res*, 2007. 85(5): p. 967-76.
5. Warrington, A.E., et al., Neuron-binding human monoclonal antibodies support central nervous system neurite extension. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004. 63(5): p. 461-73.
- 15 6. Denic, A., et al., The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology*, 2010. 18(1): p. 21-9.
7. Hoch, J.C. y A.S. Stern, *NMR Data Processing*. 1 ed1996, New York: Wiley- Liss. 230.
8. Akaike, H., A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 1974. 19(6): p. 716-723.
9. Howe, C.L., J.D. Adelson, y M. Rodriguez, Absence of perforin expression confers axonal protection despite demyelination. *Neurobiol Dis*, 2007. 25(2): p. 354-9.
- 20 10. Rodriguez, M., A function of myelin is to protect axons from subsequent injury: implications for deficits in multiple sclerosis. *Brain*, 2003. 126(Pt 4): p. 751-2.
11. Jones, M.V., et al., Behavioral and pathological outcomes in MOG 35-55 experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 2008. 199(1-2): p. 83-93.
- 25 12. Jacobs, L., P.R. Kinkel, y W.R. Kinkel, Silent brain lesions in patients with isolated idiopathic optic neuritis. A clinical and nuclear magnetic resonance imaging study. *Arch Neurol*, 1986. 43(5): p. 452-5.
13. Pohl, D., et al., Pediatric multiple sclerosis: detection of clinically silent lesions by multimodal evoked potentials. *J Pediatr*, 2006. 149(1): p. 125-7.
- 30 14. Mikami, Y., et al., A simple and reliable behavioral analysis of locomotor function after spinal cord injury in mice. *Technical note. J Neurosurg*, 2002. 97(1 Suppl): p. 142-7.
15. Mikami, Y., et al., Implantation of dendritic cells in injured adult spinal cord results in activation of endogenous neural stem/progenitor cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery. *J Neurosci Res*, 2004. 76(4): p. 453-65.
- 35 16. Melnick, S.M. y D.L. Dow-Edwards, Differential behavioral responses to chronic amphetamine in adult male and female rats exposed to postnatal cocaine treatment. *Pharmacol Biochem Behav*, 2001. 69(1-2): p. 219-24.
17. Shen, H., et al., Inosine reduces ischemic brain injury in rats. *Stroke*, 2005. 36(3): p. 654-9.
18. Torres-Reveron, A. y D.L. Dow-Edwards, Prenatal cocaine dampened behavioral responses to methylphenidate in male and female adolescent rats. *Neurotoxicol Teratol*, 2006. 28(2): p. 165-72.
- 40 19. Zhu, N., J. Weedon, y D.L. Dow-Edwards, Oral methylphenidate improves spatial learning and memory in pre- and periadolescent rats. *Behav Neurosci*, 2007.121(6): p. 1272-9.
20. Li, X., et al., Attenuation of basal and cocaine-enhanced locomotion and nucleus accumbens dopamine in cannabinoid CB1-receptor-knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 2009. 204(1): p. 1-11.
21. Rivera-Quinones, C., et al., Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis. *Nat Med*, 1998. 4(2): p. 187-93.

EJEMPLO 20: Anticuerpos monoclonales humanos protectores de neuronas para el tratamiento de la enfermedad de la neurona motora

[0319] La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurológica devastadora que afecta principalmente a las células del asta anterior y a las neuronas del tracto corticoespinal. ELA es una enfermedad de la neurona motora caracterizada por la degeneración progresiva de las células motoras en el cerebro y la médula espinal. Las células motoras (neuronas) controlan los músculos que permiten a un individuo moverse, hablar, respirar y tragar. Sin nervios para activarlos, los músculos se debilitan y se desperdician gradualmente. A pesar de la extensa investigación, la etiología de este trastorno es en gran parte desconocida, y no hay tratamientos efectivos. Los genes implicados en una minoría de pacientes con una forma genética rara de ELA proporcionan una pista potencial para este trastorno. [1] Una mutación genética identificada ha sido la mutación Cu/Zn SOD (dismutasa de superóxido de cobre/zinc), que está presente en un pequeño porcentaje de pacientes con la forma genética de ELA. [2] Es evidente que los pacientes portadores de las mutaciones SOD tienen resultados neurológicos muy similares en comparación con los pacientes que desarrollan la enfermedad espontáneamente sin una mutación genética asociada. [3] Esta enzima cataliza superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno. SOD1 es la forma de la enzima asociada con ELA. Parece haber una ganancia de función de SOD1, que afecta el transporte axonal rápido. [4] La frecuencia de la mutación SOD en ELA familiar varía de 12 a 23% y el gen generalmente se hereda como dominante autosómico.

[0320] La identificación del gen permitió el desarrollo de modelos animales con características de enfermedad de ELA para diseñar y probar nuevos fármacos. Debido a que las formas de ELA heredadas y no heredadas son enfermedades similares, la causa subyacente puede estar relacionada. Por lo tanto, los medicamentos que son

efectivos en los modelos de ratón de ELA heredado también pueden funcionar en personas con las formas aleatorias de ELA más comunes. La disponibilidad de modelos de ratones transgénicos con genes humanos SOD1 y las características patológicas de ELA han avanzado en el desarrollo de fármacos para la enfermedad. [5] Estos ratones transgénicos desarrollan una pérdida progresiva de neuronas motoras y déficits neurológicos. Debido a que las formas de ELA heredadas y no heredadas son similares desde el punto de vista clínico, los defectos subyacentes en la función de la neurona motora pueden estar relacionados. Los reactivos eficaces en ELA ligado a SOD1 también pueden ayudar a las formas esporádicas más prevalentes de ELA. En la actualidad, solo hay un medicamento en el mercado para ELA, el medicamento bloqueador de glutamato Rilutek® (tabletas de Riluzole). Sin embargo, los estudios han demostrado que este medicamento no mejora la calidad de vida del paciente y solo puede prolongar la vida un promedio de 2 meses. Es evidente que se necesitan medicamentos más eficaces.

[0321] El laboratorio ha desarrollado nuevas terapias para el tratamiento de trastornos desmielinizantes y degenerativos del sistema nervioso central (SNC) [6] y ha identificado una serie de anticuerpos monoclonales humanos (mAb) que se unen a oligodendrocitos [7] o neuronas, [8] que se ha demostrado que inducen la reparación en el SNC. Estos anticuerpos han sido clonados, secuenciados [9] y producidos en grandes cantidades en una instalación GMP para futuros ensayos clínicos. [10] El anticuerpo humano recombinante IgM12 (rHIgM12) se deriva de un anticuerpo aislado de un paciente con macroglobulinemia de Waldenstrom. [11] Este anticuerpo marca específicamente las neuronas y los axones del SNC. [8] A pesar de ser un anticuerpo IgM, IgM12, como se muestra en los ejemplos anteriores, cruza la barrera hematoencefálica y se une específicamente a los axones y neuronas dentro del SNC. rHIgM12 *in vitro* se une a una amplia gama de neuronas, incluidas las neuronas granulares cerebelosas, las neuronas corticales, las neuronas hipocámpicas y las neuronas de células ganglionares de la retina. [12] Los experimentos *in vitro* demuestran que rHIgM12 protege a las neuronas de la muerte celular. El anticuerpo monoclonal rHIgM12, administrado a pacientes en etapas tempranas de ELA (tanto la forma genética como la forma espontánea de la enfermedad), puede actuar para proteger las células del asta anterior y prevenir la lesión del axón y así retrasar el inicio de la discapacidad y mejorar la supervivencia.

RESULTADOS

[0322] Hemos realizado experimentos que tratan ratones con la mutación G86R hSOD1 [13] (FVBTg SOD1 G86R M1Jwg, Jackson Labs) con el anticuerpo humano rHIgM12. Los ratones G86R parecen normales al nacer. Sin embargo, a partir de aproximadamente 90-100 días de vida, experimentan una pérdida pronunciada de peso, desarrollan atrofia muscular significativa y fallecen por insuficiencia respiratoria pocas semanas después de la pérdida de peso precipitada. ¿LUDOLPH? En un ensayo aleatorizado y "ciego", estos ratones recibieron rHIgM12 purificado con GMP a la edad de 55 días como una sola dosis intraperitoneal (200 µg). Por el contrario, el grupo placebo recibió solución salina tamponada con fosfato (PBS). Algunos ratones no se trataron para determinar el curso natural de la enfermedad sin manipulación humana. Debido a que los datos para ratones tratados con PBS y no tratados fueron similares, los grupos se combinaron para análisis estadísticos. Los ratones fueron aleatorizados para ser tratados por un investigador en nuestro laboratorio y fueron observados por déficits neurológicos por otro investigador "ciego" hasta que se volvieron moribundos. Los investigadores tratantes y otros investigadores que realizaban los análisis patológicos desconocían el protocolo de aleatorización hasta que se rompió el código.

[0323] Los animales se pesaron semanalmente para determinar si el tratamiento con los mAb humanos no solo aumentaría la supervivencia sino que también retrasaría el inicio de la pérdida de peso. Los resultados fueron sorprendentes y mostraron un aumento estadísticamente significativo en la supervivencia de los animales que recibieron rHIgM12 en comparación con los animales que recibieron PBS. En promedio, los investigadores registraron una supervivencia aumentada de 25 a 30 días, que, por las curvas de Kaplan-Meier (FIGURA 38), mostró significación estadística ($P=0,008$). Además, los ratones tratados con rHIgM12 tuvieron una pérdida de peso menos pronunciada (FIGURA 39), un parámetro comúnmente evaluado en la evaluación de la progresión de la enfermedad en animales. [18] Hasta donde sabemos, esta es la primera demostración de un anticuerpo monoclonal humano completamente recombinante dirigido contra neuronas que es eficaz para aumentar la supervivencia de animales con un fenotipo ELA.

[0324] Cuando los animales alcanzaron la fase moribunda, fueron sacrificados y perfundidos con el fijador de Trump. Las médulas espinales se retiraron y se cortaron en bloques de 1 mm y se embebieron en plástico Araldite para secciones de espesor de 1 µM. Estas secciones se examinaron histológicamente. Los animales que desarrollaron ELA a partir de la mutación SOD mostraron una degeneración axonal significativa en los tractos de sustancia blanca, de modo que cuando el axón se colapsa, se desarrollan espirales de mielina relativamente fáciles de identificar en la sustancia blanca de la médula espinal. Cuando se cuantificó el número de espirales de la médula espinal (axones degenerados) en secciones torácicas en animales que recibieron rHIgM12 frente a PBS, hubo una disminución estadísticamente significativa en el número de espirales de mielina en animales tratados con terapia de anticuerpos monoclonales (FIGURA 40).

[0325] Las secciones de la médula espinal también se tiñeron con un anticuerpo para NeuN, un marcador que marca específicamente las neuronas en el SNC y define muy bien las células del asta anterior, así como las neuronas en el asta posterior. Se cuantificaron varias células del asta anterior a nivel de la médula espinal torácica en animales que recibieron rHIgM12 en comparación con PBS (FIGURA 41, izquierda). Hubo una diferencia

altamente estadística con un aumento en el número de células preservadas del asta anterior en animales que recibieron rHlgM12 frente a PBS. Un análisis similar sobre las neuronas en los astas posteriores también reveló un aumento significativo en las neuronas de los ratones tratados con rHlgM12 (FIGURA 41, derecha).

5 **[0326]** El anticuerpo humano, rHlgM12, se une a la superficie de muchos tipos de neuronas del SNC obtenidas de muchas especies que incluyen ratones, seres humanos (FIGURA 42), conejos y primates. Esto proporciona evidencia de que la señalización de la neurona rHlgM12 se conserva en mamíferos, incluidos ratones y humanos. Nuestros estudios en los ratones SOD sugieren que la protección de las células del asta anterior y posterior de la muerte puede conducir a menos axones degenerativos de la médula espinal y a una mayor supervivencia de los animales. Los experimentos descritos anteriormente en los Ejemplos anteriores con neuronas corticales en cultivo demuestran que el tratamiento de neuronas con rHlgM12 puede protegerlos de la muerte celular (véase la FIGURA 3). Las neuronas corticales cultivadas a partir de ratones neonatales se expusieron a concentraciones muy altas de peróxido de hidrógeno para determinar una concentración en la que el 90% de las neuronas morirían. Las neuronas expuestas al peróxido de hidrógeno se trataron al mismo tiempo con rHlgM12 u otra IgM humana que no se une a las neuronas. El tratamiento con rHlgM12 resultó en la preservación del 80% de las neuronas. Por el contrario, el tratamiento con una IgM de control dio como resultado la muerte del 90% de las neuronas después de la exposición al peróxido de hidrógeno. Nuestra hipótesis es que rHlgM12 extiende la esperanza de vida en animales con ELA al proteger las neuronas de la muerte celular.

20 **[0327]** Los anticuerpos humanos también se ensayaron como sustratos en placas de cultivo tisular, y se compararon para la capacidad para promover la extensión de proceso de células normales de las neuronas del cerebelo o corticales. rHlgM12 y sHlgM42, anticuerpos que se unen a la superficie de las neuronas, y rHlgM22 y sHlgM39, anticuerpos que no se unen a las neuronas, se compararon con el potente proceso que soporta la molécula de la matriz extracelular, la laminina. El crecimiento de neuronas en un sustrato de anticuerpos humanos rHlgM12 o sHlgM42 dio como resultado una extensión dramática del crecimiento neuronal, similar a la observada con laminina [8]. Este estudio también mostró que las neuronas se comportan normalmente en presencia de rHlgM12.

30 **[0328]** Se ha aceptado generalmente el dogma de que las IgM con un peso molecular de cerca de 1 millón son demasiado grandes para cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) de la circulación para entrar en el SNC [15] [16]. Sin embargo, cada vez hay más evidencia de que algunos anticuerpos cruzan la BBB. Hemos descrito anteriormente la detección de rHlgM12 dentro de la médula espinal después de la inyección periférica. Se administraron 1,0 mg de rHlgM12 o una IgM humana de control por vía intraperitoneal a ratones con lesiones de la médula espinal desmielinizadas. Cuatro horas más tarde se sacrificaron los ratones y se inmunotifieron secciones de la médula espinal para detectar la presencia de una cadena mu de IgM humana y anti-neurofilamento. En los ratones que recibieron rHlgM12, la microscopía confocal demostró la cadena mu humana en las lesiones desmielinizadas co-localizadas con antineurofilamento, un marcador de axones, en tramos paralelos y como haces cortados en el extremo (véase la FIGURA 15). La IgM humana no se encontró dentro de las lesiones de la médula espinal de los ratones que recibieron una IgM de control.

40 **[0329]** Si bien los estudios proporcionados son en modelos animales, hay una serie de aspectos tentadores de estos resultados de investigación que indican además que este nuevo enfoque será eficaz en pacientes humanos. De manera importante, el anticuerpo IgM12 descrito y utilizado en la presente invención es un anticuerpo monoclonal completamente humano. Como resultado, solo una sola dosis de este anticuerpo puede usarse en ratones. Las dosis posteriores causan que los animales desarrollen una respuesta inmune al anticuerpo que da como resultado neutralización de rHlgM12 o la muerte del animal debido a anafilaxia. Sin embargo, dado que estos son anticuerpos humanos "verdaderos", es poco probable que los pacientes humanos tratados con rHlgM12 desarrollen una respuesta inmune contra ellos. Además, rHlgM12 se puede administrar de manera continuada intermitente a pacientes sin efecto perjudicial o desarrollo de una reacción de bloqueo de anticuerpos. Debido a que rHlgM12 es un autoanticuerpo humano natural, los efectos secundarios adversos son poco probables, y por lo tanto, esperamos que la toxicidad de este agente sea mínima. Hay mucha evidencia de que rHlgM12 será seguro para los humanos. Antes de estos resultados positivos en el modelo ELA, la forma sérica del anticuerpo, sHlgM12, se ensayó en varios modelos de enfermedad neurológica sin toxicidad, como se describió anteriormente en este documento. En estos estudios hemos encontrado, 1) ningún aumento en la patología del SNC en ratones con virus mediada por desmielinización después de una dosis de 1 mg, 2) ningún aumento en la gravedad de las puntuaciones clínicas en ratones con EAE activa después de una dosis de 200 µg y 3) la sangre limpia química y patología tisular en ratones CD-1 normales después de una dosis de 300 µg. Aun así, es notable que una sola dosis para un ratón en un modelo animal reconocido de ELA dio resultados notables.

60 **[0330]** rHlgM12 ya se ha cultivado en una instalación GMP según las directrices de la FDA, y, según las directrices de la FDA, se han generado y almacenado líneas celulares transfectadas estables sin ninguna infección adventicia. Estas líneas celulares han sido probadas contra un panel de >50 organismos infecciosos, todos con resultados negativos. Además, las líneas celulares producen grandes cantidades de anticuerpos en el cultivo de tejidos (150 µg/ml). Se ha establecido una metodología para purificar rHlgM12 hasta >97% de pureza sin virus adventicios, ADN, ARN u otro material extraño de acuerdo con las directrices de la FDA, proporcionando una fuerte base preclínica para rHlgM12 en futuros ensayos clínicos de fase inicial en pacientes con etapas tempranas de ELA.

ESTUDIOS EN CURSO

5 **[0331]** Habiendo mostrado anteriormente que el anticuerpo monoclonal humano recombinante (rHlgM12) puede prolongar la supervivencia en un modelo transgénico de ELA humana previniendo la pérdida de células del asta anterior y axones, se están realizando estudios para generar datos preclínicos a través de farmacocinética y toxicología para avanzar hacia un ensayo clínico de fase I en pacientes con ELA.

Estudios cegados versus Placebo Ab

10 **[0332]** Un estudio controlado con placebo definitivo "cegado", se realiza en dos cepas de ratones SOD con el fenotipo ELA (SOD1 G86R y G93A), probando anticuerpo humano rHlgM12 recombinante frente a un anticuerpo humano de control de isotipo, sHlgM39. La eficacia de una sola dosis de 200 µg de anticuerpo humano recombinante, rHlgM12, se prueba para reducir la enfermedad, tanto en los modelos de ratones transgénicos mutantes tanto G86R como G93A SOD1 [14] (B6 Cg-Tg SOD1 G93A 1Gur, Jackson Labs), en comparación con una
15 dosis de 200 µg de un anticuerpo humano de control de isotipo, sHlgM39. El tratamiento con anticuerpos se realiza a los 55 días de edad siguiendo la recomendación de ENMC de tratamiento previo al inicio [18], con resultados que reflejan los estudios piloto que compararon rHlgM12 con PBS (Figuras 38-41). Los puntos finales primarios son la supervivencia y la prevención de la pérdida de peso. Cada grupo experimental consta de 24 ratones, que es suficiente para detectar una diferencia basada en los datos anteriores. Además, el SNC se examina en todos los
20 ratones después del sacrificio para determinar el número de células del asta anterior en la médula espinal media torácica usando una etiqueta para NeuN. Se cuenta el número de axones degenerados indicados por espirales de mielina anormales. Se incluye el modelo mutante G93A SOD1 (B6.Cg-Tg) SOD1G93A) 1Gur/J # 004435, Jackson Laboratory porque este es el primer modelo genéticamente basado, más ampliamente utilizado y mejor caracterizado de ELA y permite comparar los resultados con rHlgM12 a una amplia base de datos de paradigmas de
25 tratamiento. Los ratones G86R tienen un inicio tardío de la enfermedad (7 meses) y una progresión rápida; mientras que los ratones G93A tienen un inicio más rápido (3-4 meses) con una progresión más lenta. Este estudio controla la introducción de una proteína extraña en ratones SOD1 y también aborda los conceptos de mecanismo de acción. El carácter de unión a neuronas de rHlgM12 es crítico y una IgM que no se une a las neuronas no debería mejorar la enfermedad. El punto final primario en este estudio es una mayor supervivencia (10% o más, P <0,05) y una menor pérdida de peso (10% o más, P <0,05). La mejora en al menos una cepa de ratones SOD1 se considera un éxito. Todos los ratones se sacrifican en el momento en que no pueden enderezarse a sí mismos dentro de 15-30 segundos si se los coloca en ambos lados. Los criterios de valoración secundarios miden el número de axones degenerados, como lo indican los verticilos de mielina anormales, y la densidad de las células del asta anterior
30 positivas a NeuN en el nivel torácico (T6) de la médula espinal. Se consideran eventos adversos si los ratones tratados con rHlgM12, 1) pierden un 20% más de peso corporal en comparación con los controles, 2) desarrollan convulsiones, 3) tienen una tasa de mortalidad del 20% mayor que los controles.

Estudio de titulación de dosis

40 **[0333]** Tras los resultados positivos en el estudio anterior, se lleva a cabo un estudio de titulación de dosis (una dosis única de 0, 5, 50, 100 y 250 µg por ratón administrado a los 55 días de edad) para determinar la dosis mínima requerida para proteger a los ratones SOD1 de la muerte. La espectroscopía MR del tronco cerebral de ratón se usa para medir el N-acetilato aspartato (NAA). Hemos demostrado en otros modelos de enfermedad neurológica que la NAA en el tallo cerebral es un excelente indicador sustituto de la salud del axón en toda la médula espinal. [17] Los
45 datos de espectroscopía de MR ayudan a validar NAA como un marcador sustituto de la eficacia de anticuerpos en potenciales ensayos en humanos usando rHlgM12. Se administra una dosis única de 0, 5, 50, 100 y 250 µg por vía intraperitoneal a los 55 días de edad a grupos de 20-24 ratones SOD1. Los puntos finales primarios y secundarios y los eventos adversos son los mismos que los descritos anteriormente con la adición de espectroscopía de RM en el tallo cerebral para medir el aspartato de Nacetilo (NAA). La espectroscopía MR es recogida para cada ratón el día del tratamiento con anticuerpos, a los 100 días de edad e inmediatamente antes del sacrificio. Un aumento del 10% (P<0,05) en la concentración de NAA del tallo cerebral en cualquier grupo tratado con rHlgM12 en el examen de 100 días o final comparó los ratones tratados con solución salina se considera una mejora.

Estudios farmacocinéticos y BBB

55 **[0334]** Los estudios se realizan en ratones SOD1 G86R y G93A a los 50-70 días de edad [18] después de una única dosis intravenosa de 200 µg, usando un sistema de detección ELISA establecido que detecta específicamente IgM humana en el fondo de inmunoglobulina sanguínea de ratón normal. La IgM humana se mide en la sangre en varios puntos de tiempo después de la dosificación (0, 15 min, 30 min, 1 h, 4 h, 8 h, 12 h, 18 h, 24 h, 2 días, 3 días, 5 días y
60 7 días) Debido a que el volumen de sangre de los ratones es pequeño (total <1,5 ml), se utilizan tres ratones individuales para cada punto de recolección.

[0335] Se propone rHlgM12 para actuar directamente sobre el sistema nervioso, cruzar la barrera hematoencefálica después de la inyección periférica de interactuar con las neuronas para protegerlas de la muerte. Es posible, pero poco probable, que el anticuerpo humano no cruce la barrera hematoencefálica, pero estimula aspectos de una respuesta inmune, que luego proporciona protección axonal. El rastreo *in vivo* de rHlgM12 marcado con 35S se usa

para abordar completamente esta cuestión. Se siguen dos niveles de dosis de rHlgM12 marcado con 35S, 250 µg y la dosis efectiva mínima establecida anteriormente, en ratones SOD1 a los 50-70 días de edad. Después de una dosis intravenosa de rHlgM12 marcada con 35S, se determina el porcentaje de 35S que cruza la barrera hematoencefálica y se encuentra en el parénquima de cerebro/médula espinal a las 4, 8, 24, 48 y 72 horas después de la inyección. Además, el sitio de localización 35S en el cerebro/médula espinal se determina usando técnicas de autorradiografía ya publicadas. [19]

Estudios de vida media en suero

[0336] La cinética sanguínea para rHlgM12 se realiza usando una dosis de 200 µg en la(s) cepa(s) SOD1 en la que rHlgM12 demostró eficacia. El estudio se realiza en grupos de 3 ratones SOD1 por punto de tiempo; 13 puntos de recolección durante 7 días después de la inyección intravenosa. Los ratones SOD1 se tratan a los 50-70 días de edad para comprender la cinética de los anticuerpos en el momento del tratamiento. Se determinará la semivida en suero rHlgM12, la saturación de la exposición y la presencia de IgM Abs neutralizante. Los estudios que siguen rHlgM12 marcados isotópicamente (35S) requieren la determinación de la dosis efectiva mínima descrita anteriormente. A ratones SOD1 se les da una sola dosis intravenosa de 250 µg y la dosis eficaz mínima de rHlgM12 (que contiene al menos 1x10⁷ cpm) [19] a 50-70 días de edad para abordar si rHlgM12 entra en el SNC en el momento del tratamiento terapéutico. A las 4, 8, 24, 48 y 72 horas después de la inyección, los principales tejidos se eliminan de forma aguda, incluidos el cerebro, la médula espinal, el hígado, el corazón, el pulmón, el estómago, el intestino, el músculo, el bazo, el hígado y el páncreas. Se extrae una porción de 150 mg de tejido, se pesa, se solubiliza en Soluble (Perkin Elmer) y se determinan cpm en fluido de centelleo (Ultima Gold, Perkin Elmer). rHlgM12 isotópicamente etiquetado se localiza en las secciones de la médula espinal mediante autorradiografía [19]. En este experimento, el punto final primario es una acumulación de isótopo 35S en el cerebro o la médula espinal de ratones a las 4, 8, 24, 48 y 72 horas después de la inyección de rHlgM12 en comparación con los controles de punto de tiempo cero. Un aumento del 50% (P<0,05) en los conteos de 35S/mg en todo el cerebro o la médula espinal en cualquier momento se considera significativo y la evidencia de que el rHlgM12 puede ingresar al SNC. Para estudios de autorradiografía, los ratones se dosifican con rHlgM12 marcado y se retiran las médulas espinales en un momento en el que se aumentó rHlgM12 en el SNC. Un aumento del 50% en los granos de plata/mm² sobre las neuronas en las secciones de la médula espinal se considera una evidencia significativa de la selección de anticuerpos *in vivo*.

Estudios iniciales de toxicidad

[0337] Los experimentos se llevaron a cabo con rHlgM12 para determinar si el anticuerpo es tóxico en ratones y conejos CD-1 normales. Grupos de 10 ratones normales CD-1 de ambos sexos se administran 1 vez (1X), 10 veces (10X) y 20 veces (20X) la dosis eficaz mínima de rHlgM12 determinada anteriormente o solución salina por vía intravenosa una vez o diariamente durante 7 días. Dos semanas más tarde, la sangre y los tejidos se recogen mediante una necropsia "total" y se analizan. Las secciones de tejidos de todos los órganos principales son examinadas "cegadas" por un patólogo veterinario con experiencia en evaluaciones de toxicología. La sangre se caracteriza en química y hematología para el panel habitual de exámenes de toxicología que incluye estudios de sangre para enzimas hepáticas, enzimas del corazón, electrolitos y efectos en el grupo de hematología. Se realizan estudios de exposición idénticos en una especie no roedora; dos conejos de cada sexo se examinan con cada dosis. Además, los estudios de reactividad cruzada de tejidos que usan rHlgM12 se usan para determinar si el anticuerpo se une a cualquier otro tejido u órgano. Un panel de secciones de tejido incluidas en parafina de ratón, conejo, primate y humano (Zymed) está inmunomarcado con rHlgM12 o una IgM humana de control. La intensidad y las estructuras unidas dentro de cada tejido se visualizan y se comparan con rHlgM12 y el marcado de IgM de control de cortes de tejido vivo cortados con un cortador de tejido [7] ya que esto imita más de cerca la situación *in vivo*. Además, la unión de rHlgM12 y un anticuerpo de control se examina en tejido humano y de primate congelado de manera compatible con la sección de toxicología preliminar de una solicitud de Nuevo Medicamento Investigativo a la FDA. Los estudios de reactividad cruzada de tejido proporcionan pistas sobre qué órganos se deben controlar particularmente durante los estudios de exposición en ratones y conejos.

Enlace de tejido

[0338] Después de la determinación de la eficacia, estos estudios abordan la unión a tejidos diana y no de diana. Las matrices de tejido disponibles comercialmente (Zymed) y secciones de humano y mono cynomolgus (Charles River) están inmunomarcadas con 10 µg/ml de rHlgM12 y control de IgM humana, sHlgM39. La intensidad de la etiqueta se compara con imágenes digitales. La unión de rHlgM12 a matrices de tejidos embebidos en parafina fijados y cerebro y médula espinal humanos y de primate congelados se compara con la unión de anticuerpos observada en cortes de cerebelo de ratón vivo. La unión de anticuerpos a cerebelo vivo corta un ensayo de potencia estándar que hemos utilizado y el primer cribado en el que se identificó la forma sérica de rHlgM12.

REFERENCIAS CITADAS

[0339]

- 1 Gurney, M.E. 1. Gurney, M.E., et al., Mutant CuZn superoxide dismutase in motor neuron disease. *J Inherit Metab Dis*, 1998. 21(5): p. 587-97.
2. Morrison, B.M. y J.H. Morrison, Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in superoxide dismutase: a putative mechanism of degeneration. *Brain Res Rev*, 1999. 29(1): p. 121-35.
- 5 3. Siddique, T., D. Nijhawan, y A. Hentati, Familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neural Transm Suppl*, 1997. 49: p. 219-33.
4. Cluskey, S. y D.B. Ramsden, Mechanisms of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Pathol*, 2001. 54(6): p. 386-92.
- 10 5. Turner, B.J. y K. Talbot, Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol*, 2008. 85(1): p. 94-134.
6. Bieber, A.J., et al., Humoral autoimmunity as a mediator of CNS repair. *Trends Neurosci*, 2001. 24(11 Suppl): p. S39-44.
7. Warrington, A.E., et al., Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(12): p. 6820-5.
- 15 8. Warrington, A.E., et al., Neuron-binding human monoclonal antibodies support central nervous system neurite extension. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004. 63(5): p. 461-73.
9. Ciric, B., et al., Clonal evolution in Waldenstrom macroglobulinemia highlights functional role of B-cell receptor. *Blood*, 2001. 97(1): p. 321-3.
- 20 10. Mitsunaga, Y., et al., Direct evidence that a human antibody derived from patient serum can promote myelin repair in a mouse model of chronic-progressive demyelinating disease. *Faseb J*, 2002. 16(10): p. 1325-7.
11. Rodriguez, M., A.E. Warrington, y L.R. Pease, Invited article: human natural autoantibodies in the treatment of neurologic disease. *Neurology*, 2009. 72(14): p. 1269-76.
12. Wright, B.R., et al., Cellular mechanisms of central nervous system repair by natural autoreactive monoclonal antibodies. *Arch Neurol*, 2009. 66(12): p. 1456-9.
- 25 13. Bruijn, L.I., et al., ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*, 1997. 18(2): p. 327-38.
14. Gurney, M.E., et al., Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 1994. 264(5166): p. 1772-5.
- 30 15. Banks, W.A., Developing drugs that can cross the blood-brain barrier: applications to Alzheimer's disease. *BMC Neurosci*, 2008. 9 Suppl 3: p. S2.
16. Kozlowski, G.P., I. Sterzl, y G. Nilaver, Localization patterns for immunoglobulins and albumins in the brain suggest diverse mechanisms for their transport across the blood-brain barrier (BBB). *Prog Brain Res*, 1992. 91: p. 149-54.
- 35 17. Denic, A., et al., Brainstem 1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: marker of demyelination and repair in spinal cord. *Ann Neurol*, 2009. 66(4): p. 559-64.
18. Ludolph, A.C., et al., Guidelines for the preclinical in vivo evaluation of pharmacological active drugs for ALS/MND: report on the 142nd ENMC international workshop. *Amyotroph Lateral Scler*, 2007. 8(4): p. 217-23.
19. Hunter, S.F., D.J. Miller, y M. Rodriguez, Monoclonal remyelination-promoting natural autoantibody SCH 94.03: pharmacokinetics and in vivo targets within demyelinated spinal cord in a mouse model of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 1997. 150(2): p. 103-13.
- 40

LISTADO DE SECUENCIAS

45 **[0340]**

- <110> Rodriguez, Moses
Warrington, Arthur E.
Pease, Larry R.
- 50 <120> Anticuerpos humanos y usos diagnósticos y terapéuticos de los mismos para el tratamiento de enfermedad neurológica
- <130> 1199-1-016PCT2
- 55 <140> No asignado
<141> 2011-10-19
- <150> 61/455,363
<151> 2010-10-19
- 60 <150> 61/537,392
<151> 2011-09-21
- <150> 61/546,634
65 <151> 2011-10-13

ES 2 662 100 T3

<160> 46

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

5 <210> 1
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 1

```

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

35 <210> 2
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 2

```

    caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctgctgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
45    acatgcactg tctctggtgg ttccgtcagt ctttactact ggagctggat ccggcagtc 120
    ccaggaagg aaccggagtg gattggatat atctattcca gtggaagcac cgattacaac 180
    ccttccctca ggagtcgagt caccatatca ctggacacgt caaacaaccg gttttcccta 240
    aacctgaggt ctgtgaccgc cgcagataca gcggtctatt ggtgtgogag aagtgcgtca 300
    attaggggct ggttcgacc ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354
  
```

50 <210> 3
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 3

60

65

ES 2 662 100 T3

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

20 <210> 4
 <211> 310
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <400> 4

30 gagtgcattcc gccccaaccc ttttcccct cgtctcctgt gagaattccc cgtcggatac 60
 gagcagcgtg gccggttgct gcctcgcaca ggacttcctt cccgactcca tcaactttctc 120
 ctggaaatac aagaacaact ctgacatcag cagcaccgg ggcttcccat cagtcctgag 180
 agggggcaag tacgcagcca cctcacaggt gctgotgct tccaaggacg tcatgcaggg 240
 cacagacgaa cacgtggtgt gcaaagtcca gcaccccaac ggcaacaaag aaaagaacgt 300
 gcctcttcca 310

35 <210> 5
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 5

Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg

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

65

ES 2 662 100 T3

<210> 6
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5
 <400> 6

```

    gtgattgctg agctgcctcc caaagtgagc gtcttcgtcc caccocgoga cggcttcttc 60
    ggcaaccccc gcaagtccaa gtcacatctg caggccacgg gtttcagtcc cgggcagatt 120
    caggtgtcct ggctgcgcga ggggaagcag gtgggtotg gcgtcaccac ggaccaggtg 180
    caggctgagg ccaaagagtc tgggccacg acctacaagg tgaccagcac actgaccatc 240
    aaagagagcg actggctcag ccagagcatg ttcacctgcc gcgtggatca caggggcctg 300
    accttcacgc agaatgcgtc ctccatgtgt gtcccc 336
    
```

15
 <210> 7
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20
 <400> 7

```

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

45
 <210> 8
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 8

```

    gatcaagaca cagccatcog ggtcttcgcc atcccccoat cctttgccag catcttcttc 60
    accaagtcca ccaagttgac ctgcctggtc acagacctga ccacctatga cagcgtgacc 120
    atctcctgga cccgccagaa tggcgaagct gtgaaaaccc acaccaacat ctccgagagc 180
    caccocaaatg ccacttctag cgccgtgggt gaggccagca tctgcgagga tgactggaat 240
    tccggggaga ggttcacgtg caccgtgacc cacacagacc tgccctcgcc actgaagcag 300
    acctctcccc ggcccaag 318
    
```

55
 <210> 9
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

60
 <400> 9

ES 2 662 100 T3

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

25 <210> 10
 <211> 392
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 10

35 gggtaggcct gcacaggccc gatgtctact tgctgccacc agcccgggag cagctgaacc 60
 tgcgggagtc ggccaccatc acgtgcctgg tgacgggctt ctctcccgcg gacgtctctcg 120
 tgcagtggat gcagaggggg cagcccttgt ccccggagaa gtatgtgacc agcgcccaaa 180
 tgcctgagcc ccaggcccca ggccgtact tgcgccacag catcctgacc gtgtccgaag 240
 aggaatggaa cacgggggag acctacacct gcgtggtggc ccatgaggcc ctgcccaca 300
 gggtcaccga gaggaccgtg gacaagtcca ccggtaaacc caccctgtac aacgtgtccc 360
 tggatcatgtc cgacacagct ggcacctgct ac 392

40 <210> 11
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 11

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

ES 2 662 100 T3

<210> 12
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 12

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ttgtctgcgt ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagtattagt agttatctaa attggtatca gcagaaacca 120
 10 gggaaagccc ctaaggtcct gatctatgct gcaccactt tgogaagtgg ggtcccgtca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca gcgtcagcag tctgcaacct 240
 gaagatTTTg caacttacta ctgtcaacag agttaccata ccccgtggac gttcgggtcag 300
 gggaccaagg tggaa 315

15

<210> 13
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 13

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

40

<210> 14
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

45

<400> 14

atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg 60
 50 aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa 120
 gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag 180
 caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcacc tgacgctgag caaagcagac 240
 55 tacgagaaac acaaagtcta cgctctcgaa gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc 300
 acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 330

60

<210> 15
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

ES 2 662 100 T3

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

25
 <210> 16
 <211> 480
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 16

35 atgaagaacc atttgctttt ctggggagtc ctggcggttt ttattaaggc tgttcatgtg 60
 aaagcccaag aagatgaaag gattgttctt gttgacaaca aatgtaagtg tgccccgatt 120
 acttccagga tcatccgttc ttccgaagat cctaatagagg acattgtgga gagaaacatc 180
 ogaattattg ttcctctgaa caacaggag aatatctctg atcccacctc accattgaga 240
 40 accagatttg tgtaccattt gtctgacctc tgtaaaaaat gtgatcctac agaagtggag 300
 ctggataatc agatagttac tgctaccag agcaatatct gtgatgaaga cagtgtaca 360
 gagacctgct acacttatga cagaaacaag tgctacacag ctgtgggtccc actcgtatat 420
 ggtggtgaga ccaaaatggt ggaaacagcc ttaaccccag atgcctgcta tctgactaa 480

45 <210> 17
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 17

55

60

ES 2 662 100 T3

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

30 <210> 18
 <211> 402
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

35 <400> 18

40 gtgcagctgt tggagctctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggtcctc gagactctcc 60
 tgtgcagcct ctggattcac ctttagcacc tatgccatga gctgggtccg ccaggctcca 120
 ggggaggggc tggagtggtg ctcagatatt aatggttggtg gtgttaccac atactacgca 180
 gactccgtga agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatcta 240
 caaatgaaca gcctgagagt agaggacacg gccatgtatt actgtgtgag gcggtcgggg 300
 cccgatcgca actcgtcgcc cgctgacttc tggggccagg gatccctggt catcgtctcc 360
 45 tcagggagtg catccgcccc aaccttttc ccctctgtct ga 402

50 <210> 19
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

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

70

ES 2 662 100 T3

<210> 20
 <211> 310
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 20

```

gagtgcaccc gccccaaccc ttttccccct egtctcctgt gagaattccc cgtcgggatac 60
gagcagcgtg gccgttggct gcctcgcaca ggacttcctt cccgactcca tcactttctc 120
10 ctggaaatac aagaacaact ctgacatcag cagcaccgag ggcttcccat cagtcctgag 180
agggggcaag tacgcagcca cctcacaggt gctgctgcct tccaaggacg tcatgcaggg 240
cacagacgaa cacgtggtgt gcaaagtcca gcaccccaac ggcaacaaag aaaagaacgt 300
gcctcttcca                                     310
  
```

15

<210> 21
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 21

```

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

40

<210> 22
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

45

<400> 22

```

gtgattgctg agctgcctcc caaagtgagc gtcttcgtcc caccgccgca cggcttcttc 60
ggcaaccccc gcaagtccaa gctcatctgc caggccaagg gtttcagtcc ccggcagatt 120
50 caggtgtcct ggctgcgcga ggggaagcag gtggggctctg gcgtcaccac ggaccaggtg 180
caggctgagg ccaagagatc tgggcccacg acctacaagg tgaccagcac actgaccatc 240

aaagagagcg actggctcag ccagagcatg ttcacctgcc gcgtggatca caggggcctg 300
55 acctccagc agaatgcgtc ctccatgtgt gtcccc                                     336
  
```

<210> 23
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

60

<400> 23

ES 2 662 100 T3

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

20 <210> 24
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <400> 24

gatcaagaca cagccatccg ggtcttgcgc atccccccat cctttgccag catcttctctc 60
 accaagtcca ccaagttgac ctgcctggtc acagacctga ccacctatga cagcgtgacc 120
 30 atctcctgga cccgccagaa tggcgaagct gtgaaaaccc acaccaacat ctccgagagc 180
 caccccaatg ccactttcag cgccgtgggt gaggccagca tctgcgagga tgactggaat 240
 tccggggaga ggttcacgtg caccgtgacc cacacagacc tgcctcgcgc actgaagcag 300
 accatctccc ggoccaag 318

35 <210> 25
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 25

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

ES 2 662 100 T3

<210> 26
 <211> 392
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 26

```

10      gggTggccct gcacaggccc gatgtctact tgctgccacc agcccgggag cagctgaacc 60
      tgcgggagtc ggccaccatc acgtgcctgg tgacgggctt ctctcccgcg gacgtcttcg 120
      tgcagtggat gcagaggggg cagcccttgt ccccgagaaa gtatgtgacc agcgcgccaa 180
      tgctgagcc ccaggcccca ggccgtact tcgccacag catcctgacc gtgtccgaag 240
      agaatggaa cacgggggag acctacacct gcgtggtggc ccatgaggcc ctgccaaca 300
      ggtcaccga gaggaccgtg gacaagtcca ccggtaaacc cacctgtac aacgtgtccc 360
15      tggTcatgtc cgacacagct ggcacctgct ac 392
  
```

<210> 27
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 27

```

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

<210> 28
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

45 <400> 28

```

50      gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
      atcacttgcc gggcgagtea gggcattggc aattatttag cctggtatca gcagaaacca 120

      gggaaagttc ctaaactcct gatctatact acatccattt tgcaatcagg ggtcccatct 180
55      cgattcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
      gaagattttg caacttatta ctgtcaaaaa tataacagtg ccccgcgagc gttcggccaa 300
      gggaccaggg tggac 315
  
```

<210> 29
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

65 <400> 29

ES 2 662 100 T3

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

20 <210> 30
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <400> 30

30 atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc ttcattcttc cgccatctga tgagcagttg 60
 aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa 120
 gtacagtgga aggtggataa cgccctcaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag 180
 caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcacc tgacgctgag caaagcagac 240
 tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc 300
 acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 330

35 <210> 31
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cadena pesada CDR1

<400> 31

45 Gly Gly Ser Val Ser Leu Tyr Tyr
 1 5

50 <210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cadena pesada CDR2

<400> 32

60 Gly Tyr Ile Tyr Ser Ser Gly Ser Thr
 1 5

65 <210> 33
 <211> 11

ES 2 662 100 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Cadena pesada CDR3

<400> 33

10 Ala Arg Ser Ala Ser Ile Arg Gly Trp Phe Asp
1 5 10

<210> 34
15 <211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Cadena ligera CDR1

<400> 34

25 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 35
30 <211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Cadena ligera CDR2

<400> 35

40 Ala Ala Ser
1

<210> 36
45 <211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> Cadena ligera CDR3

<400> 36

55 Gln Gln Ser Tyr His Thr Pro Trp
1 5

<210> 37
60 <211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
65 <223> Cadena pesada CDR1

ES 2 662 100 T3

<400> 37

5 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala
1 5

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada CDR2

15 <400> 38

20 Ile Asn Val Gly Gly Val Thr Thr
1 5

<210> 39
<211> 15
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada CDR3

30 <400> 39

Val Arg Arg Ser Gly Pro Asp Arg Asn Ser Ser Pro Ala Asp Phe
1 5 10 15

35 <210> 40
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cadena ligera CDR1

<400> 40

45 Gln Gly Ile Gly
1

50 <210> 41
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> Cadena ligera CDR2

<400> 41

60 Thr Thr Ser
1

<210> 42
<211> 9
65 <212> PRT

ES 2 662 100 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera CDR3

5
<400> 42

10
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Arg Thr
1 5

<210> 43
<211> 119
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANTE
20 <222> 50
<223> Xaa puede ser Val o Ile

<221> VARIANT
<222> 89
25 <223> Xaa can be Asp or Glu

<400> 43

30 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
35 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

40 35 40 45
Ala Xaa Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Arg Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
45 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
50 Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Xaa Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Val Thr Gly Ser Pro Thr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
55 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

60 <210> 44
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens

65 <220>
<221> VARIANTE
<222> 46
<223> Xaa can be Arg o Lys

70 <221> VARIANTE
<222> 90
<223> Xaa puede ser Gly o Glu

ES 2 662 100 T3

<400> 44

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

20 <210> 45
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 45

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

50 <210> 46
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 46

60

ES 2 662 100 T3

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

Reivindicaciones

- 5 1. Un anticuerpo de IgM humana aislado o fragmento del mismo que se une específicamente a las neuronas y protege a las neuronas de la muerte celular y que no promueve la remielinización, en el que el anticuerpo o fragmento comprende las secuencias del dominio de CDR de aminoácidos de cadena pesada variables CDR1 GGSVSLYY expuestas en SEQ ID NO: 31, CDR2 GYIYSSGST expuestas en SEQ ID NO: 32 y CDR3 ARSASIRGWFD expuestas en SEQ ID NO: 33, y secuencias CDR de cadena ligera CDS1Y expuestas en SEQ ID NO: 34, AAS CDR2 expuestas en SEQ ID NO: 35 y CDR3 QQSYHTPW expuestas en la SEQ ID NO: 36, para uso en el tratamiento o mejora de una enfermedad o afección en un mamífero donde los nervios están comprometidos, lesionados o están en riesgo, donde dicha enfermedad o afección se selecciona de: lesión de la médula espinal (LME), lesión cerebral traumática (LCT), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM) y enfermedad de Alzheimer.
- 15 2. El anticuerpo aislado para uso de la reivindicación 1 que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable establecida en SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable establecida en SEQ ID NO: 11 o variantes altamente homólogas de los mismos, en donde dichas variantes retienen unión de neuronas y actividad neuroprotectora.
- 20 3. El anticuerpo aislado para el uso de la reivindicación 1 que comprende además una secuencia de la cadena J humana, opcionalmente en el que la cadena J comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15.
- 25 4. El anticuerpo aislado para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 formulado para uso en combinación con un anticuerpo remielinizante.
- 30 5. El anticuerpo aislado para uso según la reivindicación 4 donde el anticuerpo remielinizante en combinación se selecciona de IgM22 que comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada y ligera indicada en SEQ ID NO: 43 y 44 e IgM46 que comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada y ligera en SEQ ID NO: 45 y 46.
- 35 6. El anticuerpo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 etiquetado con una etiqueta detectable o funcional.
7. El anticuerpo para uso según la reivindicación 6, en el que la etiqueta es una enzima, una pareja de unión específica, un ligando, un colorante, una etiqueta fluorescente y/o un elemento radiactivo.
- 40 8. Un kit para uso en el tratamiento o mejora de lesión de médula espinal (LME), lesión cerebral traumática (LCT), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM) y enfermedad de Alzheimer en un sujeto animal, que comprende una forma farmacéutica de un anticuerpo de IgM humana aislado o fragmento del mismo que se une específicamente a las neuronas y protege a las neuronas de la muerte celular y que no promueve la remielinización, en el que el anticuerpo o fragmento comprende las secuencias de dominio de CDR de aminoácidos de cadena pesada variable descritas en SEQ ID NO: 31, CDR2 GYIYSSGST expuestas en SEQ ID NO: 32 y CDR3 ARSASIRGWFD expuestas en SEQ ID NO: 33, y secuencias CDR de cadena ligera CDS1Y expuestas en SEQ ID NO: 34, AAS CDR2 expuestas en SEQ ID NO: 35 y CDR3 QQSYHTPW expuestas en SEQ ID NO: 36, y una forma de dosificación farmacéutica separada que comprende uno o más agentes neuroactivos adicionales o agente terapéutico, antiinflamatorio, agente modulador de la liberación de neurotransmisores, ligando de neuroreceptor o agonista o antagonista, agente de canal de calcio, modulador inmune u otro anticuerpo reactivo del SNC.
- 45 9. El kit para uso de la reivindicación 8 donde el otro anticuerpo reactivo del SNC es un anticuerpo remielinizante seleccionado de IgM22 que comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada y ligera expuesta en SEQ ID NO: 43 y 44 y/o IgM46 que comprende la secuencia de región de cadena pesada y ligera variable establecida en SEQ ID NO: 45 y 46.
- 50 10. Anticuerpo para uso de la reivindicación 6 o reivindicación 7 para uso en la selección y protección de neuronas susceptibles, comprometidas, dañadas o lesionadas en lesión de médula espinal (LME), lesión cerebral traumática (LCT), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM) y la enfermedad de Alzheimer.
- 55
- 60
- 65

FIGURA 1

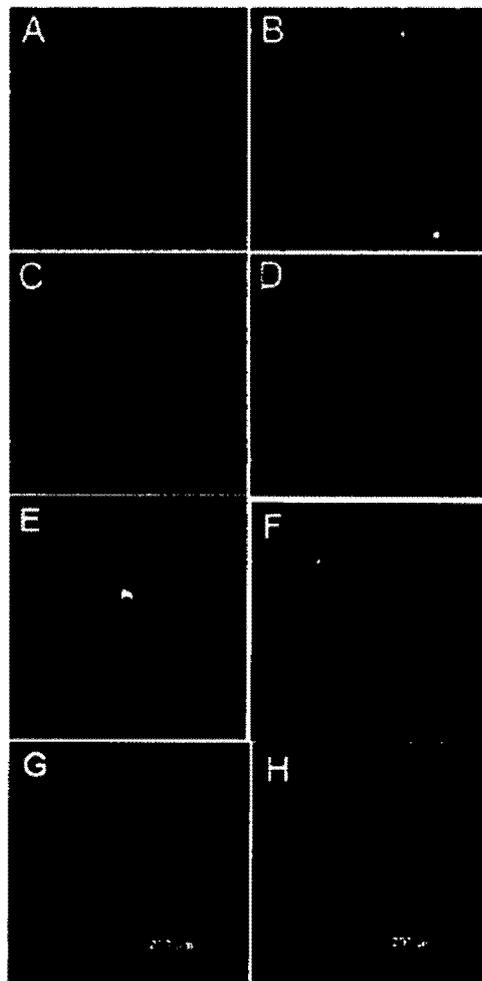


FIGURA 2

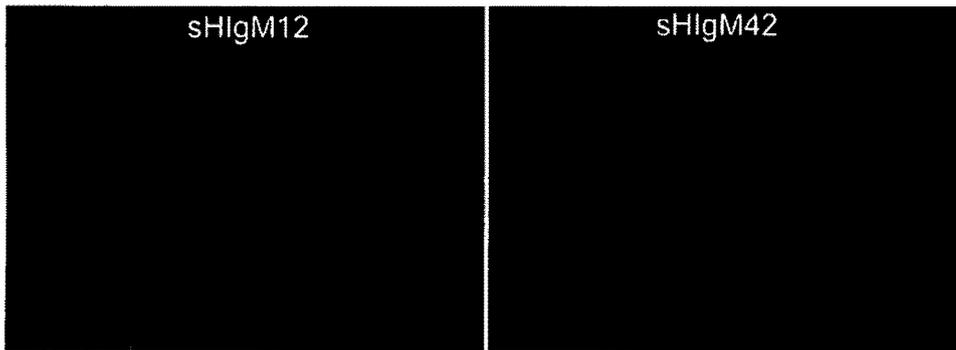


FIGURA 3

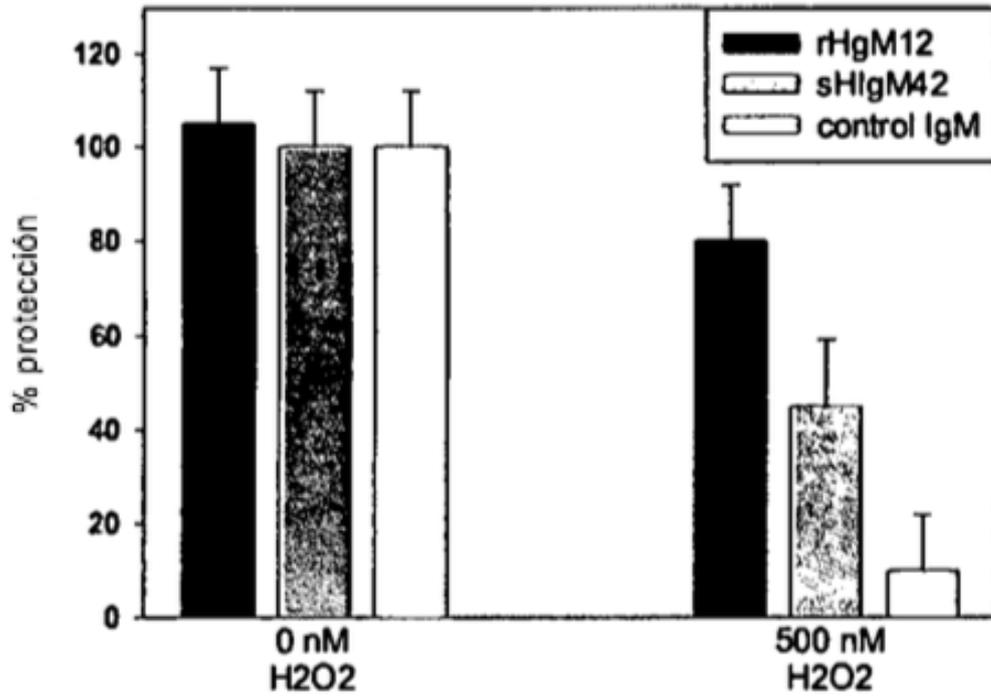


FIGURA 4 (VECTOR FIG)

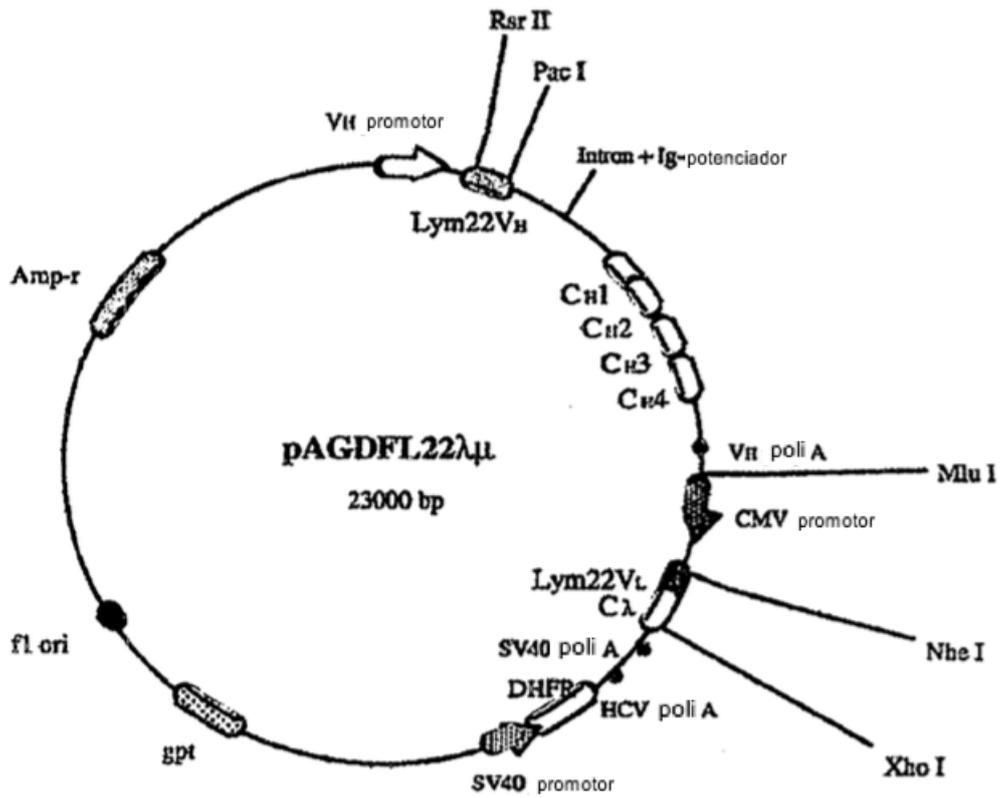


FIGURA 5

Secuencia IGM 12

Clave
Amarillo = Promotor de E1A
Azul = Cadena pesada
Gris = Cadena pesada variable
Ciruela = Regiones CDR dentro de cadena pesada variable
Púrpura = Cadena ligera
Púrpura = Regiones CDR dentro de cadena ligera variable
Verde = Enzimas de restricción
GCGCGC = BSSHI
TCCGGA = Bspel
GCTAGC = NheI
CTCGAG = XhoI
ATCGAT = ClaI

TTTCCACACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGG
ACTTTCCACACCCTAACTGACACACATTCACAGCTGCCTCGCGGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCT
CTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGT
CAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAG
TGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTA CTGAGAGTGCACCATATGCCGTGTGAAATA
CCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGC
GCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATC
AGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCCGC
TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT
GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCCTGT
TCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGC
TCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCG
TTCAGCCCAGCCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATC
GCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTG
AAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTA
CCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGT
TTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCT
GACGCTCAGTGAACGAAAACCTCAGTAAAGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCT
AGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAG
TTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTCCATCCATAGTTGCCTGA
CTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATAACCGC
GAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAG
TGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAAGTAGTTCCG
CCAGTTAATAGTTTGGCACAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTA
TGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGC
GGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATG

GCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAA
 CCAAGTCATTCFAGAAATAGTGTATGCGGGCAGCCGAGTTGCTCTTGCCCCGGCGTCAACACGGGATAATAC
 CGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGG
 ATCTTACCAGCTGTTGAGATCCAGTTGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTA
 CTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGAC
 ACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTC
 ATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGGAA
 AAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGGTATCACGAG
 GCCCTTTCGCTCTCAAGAATTCCTTTGCCTAATTTAAATGAGGACTTAACCTGTGAAAATATTTTGATGT
 GGGAAAGCTGTTACTGTTAAAACGAGGTTATTGGGGTAACCTGCTATGTTAAACTTGCATTACAGGGACACA
 AAAAATCATGAAAATGGTGTGCGAAAACCCATTCAAGGGTCAAATTTTCATTTTTTGTCTGTTGGTGGG
 GAACCTTTGGAGCTGCAGGGTGTGTTAGCAAACTACAGGACCAAATATCCTGCTCAAACGTAAACCCCAA
 AAAATGCTACAGTTGACAGTCAGCAGATGAACACTGACCACAAGGCTGTTTTGGATAAGGATAATGCTTA
 TCCAGTGGAGTGTGGGTTCCCTGATCCAAGTAAAAATGAAAACACTAGATATTTTGGAACTACACAGGT
 GGGGAAAATGTGCTCCTCTGTTTGCACATTAACACAGCAACCACAGTCTTCTTGATGAGCAGGGTGTG
 TTGGGCCCTTGTGCAAGCTGACAGCTTGTATGTTTCTGCTGTTGACATTTGTGGGCTGTTTACCAACAC
 TTCTGGAACACAGCAGTGAAGGACTTCCCAGATATTTTAAAATTACCCTTAGAAAGCGGCTGTGTGAAA
 AACCCCTACCCAAATTCCTTTTTTGAAGTACCTAATTAACAGGAGGACACAGAGGGTGGATGGGCAGC
 CTATGATTGGAATGTCCTCTCAAGTAGAGGAGGTTAGGGTTTATGAGGACACAGAGGAGCTTCTGGGGA
 TCCCTAGGTGGGACTGTCTCCCTTTGGACTTTCCCTCAATATCTCTTTTAAATATCTTTTGTGTCAAGAT
 ACAGAAGTGATAGAAAGAATTTGACAGTAATCCATCATTTTCCTTAGACATGGGAAAAGTTATGAAGAATT
 GATAAGCAATTTTTTTTCTAAGCTCAGACATTCAACAGTGACATTTCTCTGTTCCCTAGGCTTTTCTTAA
 GGTGCTGCTTTTTAAGAACAACATGAATTTTCAATTTAAAATTCATGTTTTTCCATTATTTACACCTTAAGGA
 CTTAATTTCTAGTAGATAATATAATATTAGAGATTTTCTTTTGTCCAGTTTATCTAGCATGTTAGAGTGT
 AAGTTTTTATATTAATTACAATTTTAAATTTAGAGTGTGTGTATACTGTTTCAGATGAAGAATGAGTCAAGC
 AAATGTGACTATTATTATCATTTTGTAGAACTATTATCCAGGATTACTGTGTATATGACCAGATACCATT
 AAGTGTGAGGACCAAAATTGATTACCCATTTTATACCTTGATGTCTTGTGAGTCTCTTCAAGTTTTGTAGC
 CTTACATTGAACAAGGCTTTCAGTGGATGAACCTTGGAAATGATCAGAGTCAGGAGGCACAAAGCCTGTGAGA
 TAAGAGGTGGGAAAAGGCAACTTATAGCATTAAAGGTGCAAGCACATTCAGTGGTATGGGGGGGGCGGGAA
 TACTGGCAAAGCCAGGAAGTCTGTGACACTTTGGATACAAGAGTCTAGAGGAGTGTGTTGCTTATGAGGT
 GAGAGCAATGTGACTTAATAGCTCAGAAAAGCAAGCCAATGGAGAATAGTGCTAATGATGAGGGGAGGA
 GAAAAGCAACATGAGAGAGAAGAGAAGGAGATTACAGGAAGAAATTAAGCTGTGGGAGAGGAAGGGGCTG
 GACTACCAGACATGCAGGATAGGCAAGTTTCAATGTGACCAGATGGGTCTTTTTTGTGAGAAAAAGCAGA
 CCTAGATGTTGATGAGAGAAAAGGCAAGTCTTGGTGTATATCAGAACACAAAATATAGCATGCAAAAAT
 ATCTTTACGTGGTACTTAGGGAGGTACAAAATGAGCTGGACATGCATTTGGAATAGAGAGGAGGTAGTCT
 ATATGGTGGATGAGAAGTTCAGCACTGGAGGAACAAAGTGATACACACAGACCCCGTGTATATTCAT
 TTTTAAATCAAGAAATAATGTCAACTATAATCCATATCTATTTTTATGAACTTCTATGATTAATTTTAA
 CTGGGCGCGCTATACCTTATTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGGGTGGAGTTTGTGACGTGGC
 CCGGGCGTCAACCGGGCCCGCTGACCTAGTACTCTCGCGGAAGTCTGATGTTGCAACTCTCGCGGAACA
 CATGTAAGCGACGGATGTGGCAAAAGTGACGTTTTTGGTGTGCGCCGGTGTACACAGGAAGTGACAATTT
 TCGCGCGGTTTTAGCGGATGTTGTAGTAAATTTGGCGTAACCGAGTAAGATTTGCCATTTTCCGCGG
 AAAACTGAATAAGAGGAAGTGAATCTGAATAATTTTGTGTTACTCATAGCGGTAATATTTGTCTAGGG
 CCGCGGGGACTTTGACCGTTTACGTGGAGACTCGCCAGGTGTTTTTCTCAGGTGTTTTCCGCGTCCGG
 GTCAAAGTTGGCGTTTTATTATTATAGTCAGCATGCATGCTCGAGCGGCCGCGACGCGCAGTATTTAT
 ATCCGGACGGTCCGGGACCTCCTGTGCAAGAAC

atgaaacatctgtggttcttccttctcctggtggcagctcccaga
M K H L W F F L L L V A A P R

Líder

T/escisión

GTGAGTATCTCAGGGATCCAGACATGGGGATATGGGAGGTGCCTCTGATCCCAGGGCTCACTGTGGGTCT
CTCTGTTACAG/G

TGG GTC CTG TCC
W V L S

caggtgcagctgcaggagtccggcccaggactgctgaagccttcggagaccctgtccctc
Q V Q L Q E S G P G L L K P S E T L S L
acatgcactgtctctggtggttccgctcagctcttactactggagctggatccggcagctc
T C T V S G G S V S L Y Y W S W I R Q S
ccaggaaggaaccggagtgattggatataatctattccagtggaagcaccgattacaac
P G K E P E W I G Y I Y S S G S T D Y N
Ccttcctcaggagtgcagtcacccatatacactggacacgtcaaacaaccggttttcccta
P S L R S R V T I S L D T S N N R F S L
aacctgaggtctgtgaccgcccagatacagcggctctattggtgtgcgagaagtgcgtca
N L R S V T A A D T A V Y W C A R S A S
attaggggtggttccgaccctggggccaggaaccctggtcaccgtctcctca
I R G W F D P W G Q G T L V T V S S

Vh

GGTAAGAATGGCCTCTCCAGGTCTTAATTAAGCTTGAAGTCTGAGGCAGAATCTGTCCAGGGTCTAT
CGGACTCTGTGAGAATTAGGGGCTGACAGTTGATGGTGACGATTTCCAGGGTCACTGACTGTCTGGTTTC
TCTGAGGTGAGGCTGGAATATAGTTCACCTTGAAGACTTAAGAGGGGTCCAGGGGGCTTCTGCACAGGCA
GGGAACAGAATGTGGAACAATGACTTGAATGGTTGATTCTTGTGTGACACCAGGAATTGGCATAATGTCT
GAGTTGCCAGGGGTGATTCTAGTCAGACTCTGGGGTTTTTGTCCGGTATAGAGGAAAAATCCACTATTG
TGATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTC
TCCAGGTCTTTATTTTAACTTTTGTATGGAGTTTTCTGAGCATTGCAGACTAATCTTGGATATTTGTC
CCTGAGGGAGCCGGCTGAGAGAAGTTGGGAAATAAAGTGTCTAGGGATCTCAGAGCCTTTAGGACAGATT
ATCTCCACATCTTTGAAAACTAAGAATCTGTGTGATGGTGTGGTGGAGTCCCTGGATGATGGGATAGG
GACTTTGGAGGCTCATTGAGGGAGATGCTAAAACAATCCTATGGCTGGAGGGATAGTTGGGGCTGTAGT
TGGAGATTTTCAGTTTTTGAATAAAAGTATTAGTGCAGGAATATACTTCAGGACCCTCTGTGACAGC
ATTTATACAGTATCCGATGCATAGGGACAAAGAGTGGAGTGGGGCACTTTCTTTAGATTTGTGAGGAATG
TTCCACACTAGATTGTTAAAACTCATTGTTGGAAGGAGAGCTGTCTTAGTGATTGAGTCAAGGGAGA
AAGGCATCTAGCCTCGGTCTCAAAAGGGTAGTTGCTGTCTAGAGAGGTCTGGTGGAGCCTGCAAAAGTCC
AGCTTTCAAAGGAACACAGAAGTATGTGTATGGAATATTAGAAGATGTTGCTTTTACTCTTAAGTTGGTT
CCTAGGAAAAATAGTTAAATACTGTGACTTTAAAAATGTGAGAGGGTTTTCAAGTACTCATTTTTTTAAAT
GTCCAAAATTTTTGCAATCAATTTGAGGTCTTGTGTTGTGTAAGTACTGACATTACTTAAAGTTTAAACCGA
GGAATGGGAGTGGGCTCTCTCATACCTATTCCAGAACTGACTTTTAAACAATAATAAATTAAGTTTAAAA
TATTTTAAATGAATTGAGCAATGTTGAGTTGGAGTCAAGATGGCCGATCAGAACCAGAACACCTGCAGC
AGCTGGCAGGAAGCAGGTATGTGGCAAGGCTATTTGGGGAAGGAAAAATAAACCCTAGGTAACCTTG
TAGCTGTGGTTTTGAAGAAGTGGTTTTGAAACACTCTGTCCAGCCCCACAAACCGAAAGTCCAGGCTGAG

CAAAACACCACCTGGGTAATTTGCATTTCTAAAATAAGTTGAGGATTCAGCCGAAACTGGAGAGGTCCCTC
 TTTTAACTTATTGAGTTCAACCTTTTAAATTTTAGCTTGAGTAGTTCTAGTTTCCCCAAACTTAAAGTTTAT
 CGACTTCTAAAATGTATTTAGAAATTCATTTTCAAAAATAGGTATATGTAAGAAATGAAGGACTTTAGTGT
 CTTTAAATTTCTAATATATTTAGAAAACCTCTTAAAATTAAGTCTATTATTCTTCCCTCTGATTATTGGTCT
 CCATTCAATTCCTTTTCCAATACCCGAAGCATTTACAGTGACTTTGTTTCATGATCTTTTTTAGTTGTTTGT
 TTTGCCCTTACTATTAAGACTTTGACATTTCTGGTCAAAAACGGCTTCACAAAATCTTTTTCAAGACCACCTTC
 TGAGTATTCATTTTAGGAGAAATACTTTTTTTTTAAATGAATGCAATTATCTAGACTTATTTCCGGTTGAA
 CATGCTGGTTGGTGGTTGAGAGGACACTCACTCAGTCAGTGGCCTCAAGGCTTCTAAGCCAGTCCACAT
 GCTCTGTGTGAACTCCCTCTGGCCCTGCTTATTGTTGAATGGGCCAAAGGTCTGAGACCAGGCTGCTGCT
 GGGTAGGCCTGGACTTTGGGTCTCCCAACCAGACCTGGGAATGTATGGTTGTGGCTTCTGCCACCCATCC
 ACCTGGCTGCTCATGGACCAGCCAGCCTCGGTGGCTTTGAAGGAACAATCCACACAAAGACTCTGGACC
 TCTCCGAAACCAGGCACCGCAAATGGTAAGCCAGAGGCAGCCACAGCTGTGGCTGCTGCTCTTAAAGCTT
 GAGCTTTGCAAGGCTCGCAGTGACCAGGCGCCGACATGGTAAGAGACAGGCAGCCGCCGCTGCTGCATT
 TGCTTCTCTTAAAACCTTTGTATTTGACGCTTATTCCACTAGAAGGGGAAGTGGTCTTAAATGCTTGAT
 GAAGAGCAGGAGACTCATTTATGTGAGTCTTTTGGTGGTCACTCCCATTTAACTTTTC
 CCTAAAAGCCCATTTGAAGGAGAGGTCGCACGAGCTGCCTCCACAACCTCTGAATGGGGATGGCATGGGTAA
 TGATGCTTGAGAACATACCAAGCCCCACTGGCATCGCCCTTGTCTAAGTCATTGACTGTAGGTCATCATC
 GCACCTTTGAAAGTAGCCCATGCCTTCCAAAGCGATTTATGGTAAATGGCAGAAATTTAAGTGGCAAAT
 CAGATAAAATGCATTTCTTGGTCTTTTCCAATGATCACTCTTATCTAGAGCAATTTAAAGCCAGGGGTT
 TACTGCAGACTCAGAAGGGAGGGGATGCTCCGGGAAGGTGGAGGCTCTGAGCATCTCAATACCCTCCTCT
 TGGTGCAGAAGATATGCTGCCACTTCTAGAGCAAGGGACCTGCTCATTTTATCACAGCACAGGCTCCT
 AAATCTTGGTCTCATTTCTCAAGATGTTTAAATGACTTTAAAGCAGCAAAGAAATATCCACCCAGGTAG
 TGGAGGCTGGTAATGATTGGTAATGCTTTGGAACCAAAACCAGGTGGCGCTGGGGCAGGACTGCAGGGA
 ACTGGGGTATCAAGTAGAGGGAGACAAAAGATGGAAGCCAGCCTGGCTGTGCAGGAACCCGGCAATGAGA
 TGAGCTTTAGCTGAGACAAGCAGGCTGCTGGTGGGCTGACCATTTCTGGCCATGACAACCTCCATCCAGCTTTC
 AGAAATGGACTCAGATGGGCAAAACCTGACCTAAGCTGACCTAGACTAAACAAGGCTGAACCTGGGCTGAGC
 TGAGCTGAACTGGGCTGAGTTGAACCTGGGTTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGGGCTAAGTTGCACCAGGT
 GAGCTGAGCTGAGCTGGGCTTGGCTGCACTAAGCTGGGCTGAGCTGGGCAGGCTGGGCTGGGCTGAGCT
 GAGATGGTCTTAGGTGGTCTGAGCTCAGCTAGGCTGGGCTGAGCTGGTCTGAGCTCATCTGAGTTGGGCT
 GAGCTGAGCTTGGCTTGTCTGAGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGATTGAGCTGGCCTGGGCTGGGAT
 GAACTGGATTGAGCTGGCCTGGGCTGGGATGAACTGGAGGACATGGCACTGGGCCAATCTTCATGATCTT
 GTTGGACATAGATGGATAGCCTCAGCTGAGTCTACACTGCGTTCACCATCACACTCACCTCCCTATACT
 CACTCCCAGGCCTGGGTTGTCTGCCTGGGAGACTTCAGGGTAGCTGGAGTGTGACTGAGCTGGGGGCAG
 CAGAAGCTGGGCTGGAGGGACTCTATTGGCTGCCTGCGGGTGTGTGGCTCCAGGCTTCACATTCAGGTA
 TGCAACCTGGGCCCTCCAGCTGCATGTGCTGGGAGCTGAGTGTGTGCAGCACCTACGTGCTGATGCCTCG
 GGGAAAGCAGGCCTGGTCCACCCAAACCTGAGCCCTCAGCCATTTCTGAGCAGGGAGCCAGGGGCAGTCA
 GGCTCAGAGTGCAGCAGGGCAGCCAGCTGAATGGTGGCAGGGATGGCTCAGCCTGCTCCAGGAGACCC
 AGGTCTGTCCAGGTGTTCAAGTGTGGCCCTGCAGCAGGATGGGCTGAGGCTGCAGCCCCAGCAGCCTT
 GGACAAAGACCTGAGGCTCACACAGGCCCGCCACCCCTGATAGCCATGACAGTCTGGGCTTTGGAGGC
 CTGCAGGTGGGCTCGGCTTGGTGGGGCAGCCACAGCGGACGCAAGTAGTGGGGCACTCAGAACGCCA
 CTCAGCCCTGACAGGCAGGGCAGGAGGAGGAGGCTCCTCACCTCCCTTTCTTTTTGTCTCGGGGTCC
 TCAGG

gagtgcatccgcccccaaccottttccccctcgtctcctgtgagaatteccccgtcggatacg
G S A S A P T L F P L V S C E N S P S D T
agcagcgtggccggttgctgcctcgcacaggaacttccctccccgactccatcactttctcc
S S V A V G C L A Q D F L P D S I T F S
Tggaaatacaagaacaactctgacatcagcagcaccocggggcttcccatcagtcctgaga
W K Y K N N S D I S S T R G F P S V L R
gggggcaagtacgcagccacctcacaggtgctgctgccttccaaggacgtcatgcagggc
G G K Y A A T S Q V L L P S K D V M Q G
acagacgaacacgtggtgtgcaaagtccagcaccoccaacggcaacaaagaaaagaacgtg
T D E H V V C K V Q H P N G N K E K N V
cctcttcca
P L P

CH1

GGTGAGGGCCGGGCCAGCCACCCGGGACAGAGAGGGAGCCGAAGGGGGCGGGAGTGGCGGGCACCCGGGCT
GACACGTGTCCTCACTGCA

gtgattgctgagctgcctcccaaagtgagcgtcttctcgtcccacccccggcagcggcttctctcggc
V I A E L P P K V S V F V P P R D G F F G
aacccccgcaagtccaagctcatctgcccaggccacgggtttcagtcccccggcagatcag
N P R K S K L I C Q A T G F S P R Q I Q
gtgtcctggctgcccaggggaagcaggtggggctctggcgtcaccacgggaccaggtgcag
V S W L R E G K Q V G S G V T T D Q V Q
gctgaggccaaagagtctgggcccacgacctacaagggtgaccagcacactgacctcaaaa
A E A K E S G P T T Y K V T S T L T I K
gagagcgcactggctcagccagagcatgttcacctgcccggctggatcacaggggacctgacc
E S D W L S Q S M F T C R V D H R G L T
ttccagcagaatgcgtccctccatgtgtgtcccc
F Q Q N A S S M C V P

CH2

GGTGAGTGACCTGTCCCCAGGGGCAGCACCCACCCAGCACACAGGGGTCCACTCGGGTCTGGCATTCCGCCA
CCCCGGATGCAGCCATCTACTCCCTGAGCCTTGGCTTCCCAGAGCGGCCAAGGGCAGGGGCTCGGGCGGC
AGGACCCCTGGGCTCGGCAGAGGCAGTTGCTACTCTTTGGGTGGGAACCATGCCTCCGCCACATCCACA
CCTGCCACCTCTGACTCCCTTCTCTTGACTCCA

gatcaagacacagccatccgggtcttccgcatccccccatcctttgcccagcatcttctcacc
D Q D T A I R V F A I P P S F A S I F L T
aagtccaccaagttgacctgcctggtcacagacctgaccacctatgacagcgtgaccatc
K S T K L T C L V T D L T T Y D S V T I
tcttgaccocccagaatggcgaagctgtgaaaacccacaccaacatctccgagagccac
S W T R Q N G E A V K T H T N I S E S H
cccaatgcccactttcagocccgtgggtgagccagcatctgcccaggtgactggaattcc
P N A T F S A V G E A S I C E D D W N S
ggggagaggttccagctgcaccgtgacccacacagacctgcccctcgcactgaagcagacc
G E R F T C T V T H T D L P S P L K Q T
Atctccggcccaag
I S R P K

CH3

GGTAGGCCCACTCTTGCCCTCTTCTGCACTCCCTGGGACCTCCCTTGGCCTCTGGGGCATGGTGGAA
AGCACCCCTCACTCCCCGTTGTCTGGGCAACTGGGAAAAGGGGACTCAACCCAGCCACAGGCTGGT
CCCCCACTGCCCGCCCTCACCACCATCTCTGTTCACAG

gggtggccctgcacaggcccgatgtctacttgcctgcccaccagcccgggagcagctgaacctg
G V A L H R P D V Y L L P P A R E Q L N L
cgggagtcggccaccatcacgtgcctggtgacgggettctctcccgggacgtcttcgtg
R E S A T I T C L V T G F S P A D V F V
cagtggatgcagagggggcagcccttgcctcccgagaagtatgtgaccagcgcocccatg
Q W M Q R G Q P L S P E K Y V T S A P M
Cctgagccccagccccaggccggtacttcgcccacagcctcctgaccgtgtccgaagag**CH4**
P E P Q A P G R Y F A H S I L T V S E E
gaatggaacacgggggagacctacacctgcgtggtggcccatgaggccctgcccacagg
E W N T G E T Y T C V V A H E A L P N R
gtcaccgagaggacctggaagtcaccggtaaacccacctgtacaacgtgtccctg
V T E R T V D K S T G K P T L Y N V S L
gtcatgtccgacacagctggcacctgtac
V M S D T A G T C Y

TGACCTGCTGGCCTGCCACAGGCTCGGGGGCGGCTGGCCGCTCTGTGTGTGCATGCAAACCTAACCGTGT
CAACGGGGTGAGATGTTGCATCTTATAAAATTAGAAATAAAAAGATCCATTCAAAGATACTGGTCTCGA
GTGCACGATGCTCTGGCCTACTGGGGCGGCGGCTGTGCTGCACCCACCCCTGCGCCTCCCTGCAGAACAC
CTTCTCCACAGCCCCACCCCTGCCTCACCCACCTGCGTGCCTCAGTGGCTTCTAGAAACCCCTGAATT
CCCTGCAGCTGCTCACAGCAGGCTGACCTCAGACTTGCCATTCTCTACTGCTTCCAGAAAGAAAGCTG
AAAGCAAGACCACACGTATACAGGCAGCACACAGGCATGTGTGGATACACATGGACAGACACGGACACAC
ACAAACACATGGACACACAGAGACGTGCTAACCCATGGGCACACACATAACAGACATGGACCCACACAC
AAACATATGTGGACACACATGTACAAACATGCACAGGCACACAAAGAGAACACTGACTACAGGCACACAC
ACACACGGGCACACACATGGATATGTGCACACATGGACACATAACATGTGCAGGACATGCACACACACAGA
CACACTAGCACAGAGGCATACACACACAGACACACACATTACAAACACACATGTGCATGCAAACACACA
CACATGTACAGACACAAGTACATGGACACATGCACACCCAGAGACACACTGACACAGACACACAGGAGCA
TGTGATACACTAACACGTGGACACACACGTCTACCCACAGGCACACAACAGATGGACACGCGTACACAGA
CATGCACACACCCACAGGCACAACACGTGCGCATGCCGCGGAGATCCCTGGCCAGGGATCCCTGGCCAG
GGATCCCTGGCCAGGGATCTTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTTCATTGGTTATATAGCATAAATCA
ATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCC
AATATGACCGCCATGTTGGCATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTT
CATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACG
ACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACG
TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCG
CCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACT
TTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACAC
CAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGT
TTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTGCGATCGCCCGCCCCGTTGAC
GCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCATATAAAGCAGAGCTCGTTTGTGTAACCGTACAGATC
ACTAGAAGCTTTATTGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATGCTAACGCAGTCAGTGCTTCTGACACAACAG
TCTCGAACTTAAGCTGCAGTGACTCTCTTAAGGTAGCCTTGCAGAAGTTGGTTCGTGAGGCACTGGGCAGG
TAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAAGGAGACCAATAGAAACTGGCCTTGTTCGAGACAGAGAAGACT

CTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCAC
TCCCACTTCAATTACAGCTCTTAAGGCTAGAGTACTTAATACGACTCACTATAGGCTAGCTC AAGACTCA
GCCGGAC

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctggctccgaggtgcc
M D M R V P A Q L L G L L L L W L R G A
agatgt
R C

gacatccagatgaccaggtctccatcctccttgtctgcgtctgtaggagacaga
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
Gtcaccatcacttgccgggcaagtcagagttatagtagttatctaaattgggtatcagcag VL
V T I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q
aaaccagggaaagcccctaaggtcctgatctatgctgcatccactttgcaagtggggtc
K P G K A P K V L I Y A A S T L R S G V
ccgtcaaggttcagtgccagtgatctgggacagatttcactctcagcgtcagcagctctg
P S R F S G S G S G T D F T L S V S S L
caacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagagttaccataccctcgaggcttc
Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y H T P W T F
ggtcaggggaccaaggtgaa
G Q G T K V E

atcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttc
I K R T V A A P S V F I F
ccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N
ttctatcccagagagggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggtaac
F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N
Tcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacc CL
S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T
ctgacgctgagcaaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcaagtcacccat
L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H
cagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgtag
Q G L S S P V T K S F N R G E C -

ATACTCGAGTTGGCCGCTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATG
AGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGC
TTTATTTGTAACCATATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAG
GTTTCAGGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAAATCCGATAAG
GATCGATGCGGCTCTCCCTTATCGGACTCCTCCATTAGGAAGCAGCCCACTAGTAGGTTGAGGCGGTTGA
GCACCGCCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGC
CACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATG
TCGGGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGA

GGATCTCTGACGGAAGGAAAGAAGTCAGAAGGCCAAAAACGAGAGTAACTCCACAGTAGCTCCAAATTCCTT
TATAAGGGTCAATGTCCATGCCCCAAAGCCACCCAAGGCACAGCTTGGAGGGCTTGAACAGTGGGACATGT
ACAAGAGATGATTAGGCAGAGGTGAAAAAGTTGCATGGTGCCTGGTGCAGACCAATTTATGCCTACAGC
CTCCTAATACAAAGACCTTTAACCTAATCTCCTCCCCAGCTCCTCCCAGTCTTAAACACACAGTCTTT
GAAGTAGGCCCTCAAGGTCGGTTCGTTGACATTGCTGGGAGTCCAAGAGTCCCTTATGTAAGACCTTGGGC
AGGATCTGATGGGCGTTCACGGTGGTCTCCATGCAACGTGCAGAGGTGAAGCGAAGTGCACACGGACCGG
CAGATGAGAAGGCACAGACGGGGAGACCGCGTAAAGAGAGGTGCGCCCCGTTGGTTCGGCTGGAACGGCAGA
CGGAGAAGGGGACGAGAGAGTCCCAAGCGGCCCGCGAGGGGTCGTCCGCGGGATTTCAGCGCCGACGGGA
CGTAAACAAAGCACGTCGCCCGAAGGATCTAAAGCCAGCAAAAGTCCCATGCTCTTATAAAAAATGCATAG
CTTTAGGAGGGGAGCAGAGAACTGAAAGCATCTTCTGTTAGTCTTTCTTCTCGTAGACTTCAAACCTTA
TACTTGATGCCTTTTTCTCCTGGACCTCAGAGAGGACCGCTGGGTATTCTGGGAGAAGTTTATATTTCC
CCAAATCAATTTCTGGGAAAAACGTGTCACCTTCAAATTCCTGCATGATCCTTGTACAAAAGAGTCTGAG
GTGGCCTGGTTGATTTCATGGCTTCCTGGTAAACAGAACTGCCTCCGACTATCCAAACCATGTCTACTTTA
CTTGCCAATTCGGTTGTTCAATAAGTCTTAAGGCATCATCCAAACTTTTGGCAAGAAAATGAGCTCCTC
GTGGTGGTTCTTTGAGTTCTCTACTGAGAACTATATTAATTCGTCTCTTAAAGGTCGATTCCTCTCAGG
AATGGAGAACCAGGTTTTTCTTACCATAATCACCAGATTCTGTTTACCTTCCACTGAAGAGGTTGTGGTC
ATTCTTTGGAAGTACTTGAACTCGTTCTGAGCGGAGGCCAGGGTCGGTCTCCGTTCTTGCCAAATCCCCA
TATTTTGGGACACGGCGACGATGCAGTTCATGGTTCGAACCATGATGGCAATTCTAGAAAGCTTTTTGCA
AAAGCCTAGGCCTCCAAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCC
TCTGCATAAATAAAAAAAATTAGTTCAGCCATGGGGCGGAGAATGGGCGGAACGGGCGGAGTTAGGGGCG
GGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGGACTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCC
TGCTGGGGAGCCTGGGGAC

Secuencia de proteína de cadena J humana (AAH38982)

1 MKNHLLFWGV LAVFIKAVHV KAQEDERIVL VDNKCKCARI TSRIIRSED
51 PNEDIVERNI RIIVPLNNRE NISDPTSPLR TRFVYHLSDL CKKCDPTEVE
101 LDNQIVTATQ SNICDEDSAT ETCYTYDRNK CYTAVVPLVY GGETKMVETA
151 LTPDACYPD

Secuencia de codificación de cadena J humana (amarillo)

CATATAAGAATTCGCCACC ATGAAGAACCATTGCTTT
TCTGGGGAGTCCTGGCGGTTTTTATTAAGGCTGTTTCATGTGAAAGCCCAA
GAAGATGAAAGGATTGTTCTTGTGACAACAAATGTAAGTGTGCCCGGAT
TACTTCAGGATCATCCGTTCTTCCGAAGATCCTAATGAGGACATTGTGG
AGAGAAACATCCGAATTATTGTTCTCTGAACAACAGGGAGAATATCTCT
GATCCACCTCACCATTGAGAACCAGATTTGTGTACCATTTGTCTGACCT
CTGTAAAAAATGTGATCCTACAGAAGTGGAGCTGGATAATCAGATAGTTA
CTGCTACCCAGAGCAATATCTGTGATGAAGACAGTGCTACAGAGACCTGC
TACACTTATGACAGAAACAAGTGCTACACAGCTGTGGTCCCACTCGTATA
TGGTGGTGAGACCAAAATGGTGGAAACAGCCTTAACCCAGATGCCTGCT
ATCCTGACTAAGTCGAC

FIGURA 6

Secuencia IGM 42

Clave	
Amarillo =	Promotor de E1A
Azul =	Cadena pesada
Gris =	Cadena pesada variable
Ciruela =	Regiones CDR dentro de cadena pesada variable
Púrpura =	Cadena ligera
Púrpura =	Regiones CDR dentro de cadena ligera variable
Verde =	Enzimas de restricción
<u>GCGCGC</u> =	BSSHI
<u>TCCGGA</u> =	Bspel
<u>GCTAGC</u> =	NheI
<u>CTCGAG</u> =	XhoI
<u>ATCGAT</u> =	ClaI

TTTCCACACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGG
 ACTTTCCACACCCTAACTGACACACATTCCACAGCTGCCTCGCGCGTTTTCCGGTGATGACGGTGAAAACCT
 CTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGCTGTAAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGT
 CAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAG
 TGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATA
 CCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGC
 GCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATC
 AGGGGATAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCCGG
 TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT
 GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGTCCCTCGTGCGCTCTCCTGT
 TCCGACCCGACCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGC
 TCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCG
 TTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATC
 GCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTG
 AAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTA
 CCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGT
 TTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCT
 GACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCT
 AGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAG
 TTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTTCATCCATAGTTGCCTGA
 CTCCCCGTCGTGATAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGC
 GAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAG
 TGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCG
 CCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTA

GCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAA
CCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGGGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATAC
CGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGG
ATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTA
CTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGAATAAGGGCGAC
ACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCCTTTTCAATATTTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTC
ATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGGAA
AAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCAATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAG
GCCCTTTCGTCCTCAAGAATTCCTTTGCCTAATTTAAATGAGGACTTAACCTGTGGAATATTTTTGATGT
GGGAAGCTGTACTGTTAAAACCTGAGGTTATTGGGGTAACTGCTATGTTAAACTTCGATTCAGGGACACA
AAAAACTCATGAAAATGGTGTGGAAAACCCATTCAAGGGTCAAATTTTTCATTTTTTTGCTGTTGGTGGG
GAACCTTTGGAGCTGCAGGGTGTGTTAGCAAACTACAGGACCAAAATATCCTGCTCAAACCTGTAACCCAA
AAAATGCTACAGTTGACAGTCAGCAGATGAACACTGACCACAAGGCTGTTTTGGATAAGGATAATGCTTA
TCCAGTGGAGTGTGGGTTCCCTGATCCAAGTAAAAATGAAAAACTAGATATTTTGAACCTACACAGGT
GGGAAAAATGTCCTCCTGTTTTGCACATTAACACAGCAACCACAGTGCCTTCTTGATGAGCAGGGTG
TTGGGCCCTGTGTCAAAGCTGACAGCTGTATGTTTCTGCTGTTGACATTTGTGGGCTGTTTACCAACAC
TTCTGGAACACAGCAGTGAAGGGACTTCCCAGATATTTTAAAATTAACCTTAGAAAGCGGCTCTGTGAAA
AACCCCTACCCAATTTCCCTTTTGTAAAGTGACCTAATTAACAGGAGGACACAGAGGGTGGATGGGCAGC
CTATGATTGGAATGTCTCTCAAGTAGAGGAGGTTAGGGTTTATGAGGACACAGAGGAGCTTCTGGGGA
TCCCTAGTGGGACTGTCTCCCTTTGGACTTTCCCTCAATATCTTCTTTTAATATCTTTTGTGTCAAGAT
ACAGAAGTGATAGAAAAGAAATTTGACAGTAATCCATCATTTCCTTAGACATGGGAAAAGTTATGAAGAATT
GATAAGGAATTTTTTTTGTAAAGTCTGACACATTAACAGTGCATTTCTCTGTTCCTAGGCTTTTGGTTAA
GGTGTCTCTTTTAAAGAACAACATGAATTTCAATTTAAAATTCATGTTTTTCCATTATTTACACCTTAAGGA
CTTAATCTAGTAGATAATATAATATTAGAGATTTTCTTTTGTCCAGTTTATCTAGCATTGTTAGAGTGT
AAGTTTTTATATTAATTACAATTTTAATTTAGAGTGTGTGATACTGTTTCAGATGAAGAATGAGTCAAGC
AAATGTGACTATTATTATCATTGTTAGAACTATTATCCAGGATTACTGTGTATATGACCAGATAACCATC
AAGTGTGAGGACACCAATTGATTACCCATTTATACCTTGATGTCTTGTGAGTCTCTCAAGTTTTGTAGC
CTTACATTGAACAAGGCTTCAGTGGATGAACTTTGGAATGATCAGAGTCAGGAGGCACAAAGCCTGTGAGA
TAAGAGGTGGGAAAGGCAACTTATAGCATTAAAGGTGCAAGCACATTCAGTGGTATGGGGGGGGCGGGAA
TACTGGCAAAGCCAGGAAGTCTGTCAGCACTTGGATACAAGAGTCTAGAGGAGTGCCTGTCTATGAGGT
GAGAGCAATGTGTAATAGCTCAGAAAAGCAAGCCAAATGGAGAATAGTGCATATGATGAGGGGAGGA
GAAAGGCAACATGAGAGAGAAGAGAAGGAGATTACAGGAAGAAATTAAGCTGTGGGAGAGGAAGGGGCTG
GACTACCAGACATGCAGGATAGGCAAGTTTCAATGTGACCAGATGGGTCCCTTTTTGTGAGAAAAAGCAGA
CCTAGATGTTGATGAGAGAAAAGGCAAGTCCCTGGGTGATTATCAGAACACAAACATATAGCATGCAAAAT
ATCTTTACGTGGTACTTAGGGAGCTCAAAAATGAGCTGGACATGCATTTGGAATAGAGAGGAGGTAGTCT
ATATGGTGGATGAGAAGTTCAGCACTGGAGGAACCTAAGTGATACACACAGACCCCGAGTGTATATTCAC
TTTTAAATCAAGAAATAATGTCAAGTATAATCCATATCTATTTTATGAAGTCTATGATTAAATTTTAA
CTGGGCGCGCTATACCTTATTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGGGGTGGAGTTTGTGACGTGGC
GCGGGGCTGGAAACGGGGCGGGTGACGTAGTAGTGTGGCGGAAGTGTGATGTTGCAAGTGTGGCGGAACA
CATGTAAGCGACGGATGTGGCAAAGTGACGTTTTTGGTGTGCGCCGGTGTACACAGGAAGTGACAATTT
TCGCGCGGTTTTAGGCGGATGTTGTAGTAAATTTGGGCGTAACCGAGTAAGATTTGGCCATTTTCGCGGG
AAAACCTGAATAAGAGGAAGTGAATCTGAATAATTTTGTGTTACTCATAGCGCGTAAATTTGTCTAGGG
CCGCGGGGACTTTGACCGTTTACGTTGGAGACTCGCCAGGTGTTTTTCTCAGGTGTTTTCCGCGTTCCGG
GTCAAAGTTGGCGTTTTTATTATATAGTCAAGCATGCATGCTCGAGCGGGCCGCGACGCGCAGTGTATTTAT
ATCCGGACGGTCCGGGACCTCCTGTGCAAGAAC

atggagtttgggctgagctggctttttcttggctattttaaaa Líder
M E F G L S W L F L V A I L K

G/Escisión

GTAATTCATGGAGAAATAGAAAAATTGAGTGTGAATGGATAAGAGTGAGAGAAACAGTGGATACGTGTGG
CAGTTTCTGACCAGGGTTTCTTTTTGTTGTCAG

ggtgtccagtgtgag
G V Q C E

gtgcagctgttggagtctgggggaggttggtagacagcctggggggtccctgagactctcc
V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S
tgtgcagcctctggttaccctttgacacctatgcatgagctgggtccgccaggctcca
C A A S G F T F S T Y A M S W V R Q A P
ggggaggggctggagtgggtctcagatattaatggtgggtgttaccacatactacgca
G E G L E W V S D I N V G G V T T Y Y A
gactccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatcta Vh
D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L
caaatgaacagcctgagagtagaggacacggccatgtattactgtgtgagggcgtccggg
Q M N S L R V E D T A M Y Y C V R R S G
cccgatcgcaactcgctcgcccgtgacttctggggccagggatccctggtcatcgtctcc
P D R N S S P A D F W G Q G S L V I V S
tcagggagtgcacccgccccacccttttccccctcgtctga
S G S A S A P T L F P L V -

GGTAAGAATGGCCTCTCCAGGTCTTAATTAAGCTTGAAGTCTGAGGCAGAACTTTGTCCAGGGTCTAT
CGGACTCTGTGAGAATTAGGGGCTGACAGTTGATGGTGACGATTTTCAGGGTCAGTACTGTCTGGTTTC
TCTGAGGTGAGGCTGGAATATAGTTCACTTGAAGACTTAAGAGGGGTCCAGGGGGCTTCTGCACAGGCA
GGGAACAGAAATGTGGAACAATGACTTGAATGGTTGATTCTTGTGTGACACCAGGAATTGGCATAATGTCT
GAGTTGCCAGGGGTGATTCTAGTCAGACTCTGGGGTTTTTGTGCGGTATAGAGGAAAAATCCACTATTG
TGATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTC
TCCAGGTCTTTATTTTTAACCTTTGTTATGGAGTTTTCTGAGCATTGCAGACTAATCTTGGATATTTGTC
CCTGAGGGAGCCGCTGAGAGAAGTTGGGAAATAAACTGTCTAGGGATCTCAGAGCCTTTAGGACAGATT
ATCTCCACATCTTTGAAAACTAAGAATCTGTGTGATGGTGTGGTGGAGTCCCTGGATGATGGGATAGG
GACTTTGGAGGCTCATTTGAGGGAGATGCTAAAACAATCCTATGGCTGGAGGGATAGTTGGGGCTGTAGT
TGGAGATTTTCAGTTTTTAGAATAAAAAGTATTAGCTGCGGAATATACTTCAGGACCACCTCTGTGACAGC
ATTTATACAGTATCCGATGCATAGGGACAAAGAGTGGAGTGGGGCACTTTCTTTAGATTTGTGAGGAATG
TTCCACACTAGATTGTTTAAACTTCATTTGTTGGAAGGAGAGCTGTCTTAGTGATTGAGTCAAGGGAGA
AAGGCATCTAGCCTCGGTCTCAAAAGGGTAGTTGCTGTCTAGAGAGGTCTGGTGGAGCCTGCAAAAAGTCC
AGCTTTCAAAGGAACACAGAAGTATGTGTATGGAATATTAGAAGATGTTGCTTTTACTCTTAAGTTGGTT
CCTAGGAAAAATAGTTAAACTGTGACTTTAAAATGTGAGAGGGTTTTCAAGTACTCATTTTTTTAAAT
GTCCAAAATTTTTGCAATCAATTTGAGGTCTGTTTGTGTGAGAACTGACATTACTTAAAGTTTAAACCGA
GGAATGGGAGTGGGCTCTCTCATACCCTATTGAGAACTGACTTTTTAAACAATAATAAATTAAGTTTAAAA
TATTTTTAAATGAATTGAGCAATGTTGAGTTGGAGTCAAGATGGCCGATCAGAACCAGAACACCTGCAGC

AGCTGGCAGGAAGCAGGTCATGTGGCAAGGCTATTTGGGGAAGGGAAAAATAAAACCACTAGGTAAACTTG
 TAGCTGTGGTTTGAAGAAGTGGTTTTGAAACACTCTGTCCAGCCCCACCAAACCGAAAGTCCAGGCTGAG
 CAAAACACCACCTGGGTAATTTGCATTTCTAAAATAAGTTGAGGATTCAGCCGAAACTGGAGAGGTCCCTC
 TTTAACTTATTGAGTTCAACCTTTTAAATTTAGCTTGAGTAGTTCTAGTTTCCCCAAACTTAAGTTTAT
 CGACTTCTAAAATGATTTAGAATTCATTTCAAATTAGGTTATGTAAGAAATGAAGGACTTTAGTGT
 CTTTAAATTTCTAATATATTTAGAAAACCTCTTAAAATTAATCTATTTATTTCTCCCTCTGATTATTGGTCT
 CCATTCAATTTCTTTCCAATACCCGAAGCATTACAGTGACTTTGTTTCATGATCTTTTTTAGTTGTTTGT
 TTTGCCCTACTATTAAGACTTTGACATTTCTGGTCAAACCGCTTCACAAATCTTTTCAAGACCCTTTC
 TGAGTATTCATTTTAGGAGAAATACTTTTTTTTTAAATGAATGCAATTATCTAGACTTATTTGCGTTGAA
 CATGCTGCTTGGTGGTTGAGAGGACACTCAGTCAGTCAGTCGGCCTGAAGGGCTTCTAAGCCAGTCCACAT
 GCTCTGTGTGAACTCCCTCTGGCCCTGCTTATTGTTGAATGGGCCAAAGGCTGAGACCAGGCTGCTGCT
 GGGTAGGCCTGGACTTTGGGTCTCCCACCAGACCTGGGAATGTATGGTTGTGGCTTCTGCCACCCATCC
 ACCTGGCTGCTCATGGACCAGCCAGCCTCGGTGGCTTTGAAGGAACAATCCACACAAAGACTCTGGACC
 TCTCCGAAACAGGCACCGCAAATGGTAAGCCAGAGCCAGCCACAGCTGTGGCTGCTGCTCTTAAAGCTT
 GAGCTTTGCAAGGCTCGCAGTGACCAGGCGCCGACATGGTAAGAGACAGGCAGCCGCGCTGCTGCATT
 TGCTTCTCTTAAAACCTTTGTATTTGACGCTTATTTCCACTAGAAGGGGAACTGGTCTTAAATTGCTTGAT
 GAAGAGCAGGAGACTCATTATGTGAGTCTTTTGTAGTACCATTGTCTGGGTCACTCCCATTTAACTTTC
 CCTAAAGCCCATTGAAGGAGAGGTCGCACGAGCTGCTCCACAACCTCTGAATGGGGATGGCATGGGTAA
 TGATGCTTGAGAACATAACCAAGCCCCACTGGCATCGCCCTTGTCTAAGTCATTGACTGTAGGTCATCATC
 GCACCCCTGAAAAGTAGCCCATGCCTTCCAAAGCGATTTATGGTAAATGGCAGAATTTTAAAGTGGCAAAT
 CAGATAAAATGCATTTCTTGTTGTTTTCCAATGATGACTGTTATCTAGAGGGAATTTAAAGGCAGGGGTT
 TACTGCAGACTCAGAAGGGAGGGGATGCTCCGGGAAGGTGGAGGCTCTGAGCATCTCAATACCCTCCTCT
 TGGTGCAGAAGATATGCTGCCACTTCTAGAGCAAGGGGACCTGCTCATTTTTATCACAGCACAGGCTCCT
 AAATCTTGGTCTCATTCTCAAGATGTTTTAATGACTTTAAAGCAGCAAAGAAATATTCCACCCAGGTAG
 TGGAGGGTGGTAATGATTGGTAATGCTTTGGAACCAAAACCCAGGTGGCGCTGGGGCAGGACTGCAGGGA
 ACTGGGGTATCAAGTAGAGGGAGACAAAAGATGGAAGCCAGCCTGGCTGTGCAGGAACCCGGCAATGAGA
 TCGCTTTAGCTGAGACAAGCAGCTCTGCTGGCCTGACCATTTCTGCCCATGCAACTCCATCCAGCTTTC
 AGAAATGGACTCAGATGGGCAAAACTGACCTAAGCTGACCTAGACTAAACAAGGCTGAACTGGGCTGAGC
 TGAGCTGAACTGGGCTGAGTTGAACTGGGTTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCT
 GAGCTGAGCTGAGCTGGGCTGGCTGCACTAAGCTGGGCTGAGCTGGGCAAGGCTGGGCTGGGCTGAGCT
 GAGATGGTCTTAGGTGGTCTGAGCTCAGCTAGGCTGGGCTGAGCTGGTCTGAGCTCATCTGAGTTGGGCT
 GAGCTGAGCTTTGGCTTTGCTGAGCTGGGGTGGGGTGGGCTGGGCTGGATTGAGCTGGCCTGGGCTGGGAT
 GAACTGGATTGAGCTGGCCTGGGCTGGGATGAACTGGAGGACATGGCACTGGGCCAATCTTCATGATCTT
 GTTGGACATAGATGGATAGCCTCAGCTGAGTCTACACTGCGTTCACACTCACACTCACCCCTCCCTATACT
 CACTCCCAGGCTGGGTTGTCTGCC'TGGGGAGACTTCAGGGTAGCTGGAGTGTGACTGAGCTGGGGGAG
 CAGAAGCTGGGCTGGAGGGACTCTATTGGCTGCCTGCGGGGTGTGTGGCTCCAGGCTTCACATTCAGGTA
 TGCAACCTGGGCCCTCCAGCTGCATGTGCTGGGAGCTGAGTGTGTGCAGCACCTACGTGCTGATGCCTCG
 GGGGAAAGCAGGCTGGTCCACCCAAACCTGAGCCCTCAGCCATTCTGAGCAGGGAGCCAGGGGAGTCA
 GGCCTCAGAGTGCAGCAGGGCAGCCAGCTGAATGGTGGCAGGGATGGCTCAGCCTGCTCCAGGAGACCCC
 AGGTCTGTCCAGGTGTTCAAGTGTGGGCCCTGCAGCAGGATGGGCTGAGGCTGCAGCCCCAGCAGCCTT
 GGACAAAGACCTGAGGCCTCACCACGGCCCCGCCACCCCTGATAGCCATGACAGTCTGGGCTTTGGAGGC
 CTGCAGGTGGGCTCGGCCTTGGTGGGGCAGCCACAGCGGGACGCAAGTAGTGAGGGGCACTCAGAACGCCA
 CTCAGCCCTGACAGGCAGGGCAGGAGGAGCAGCTCCTCACCCCTCCCTTTCTTTTTGTCTGCGGGTCC
 TCAGC

gagtgcacccgcccccaacccttttccccctcgtctcctgtgagaattccccgtcggatacg
 G S A S A P T L F P L V S C E N S P S D T
 agcagcgtggccggttggtgcctcgcacaggacttccttcccgaactccatcactttctcc
 S S V A V G C L A Q D F L P D S I T F S
 tggaaatacaagaacaactctgacatcagcagcaccggggttcccatcagtctctgaga CH1
 W K Y K N N S D I S S T R G F P S V L R
 gggggcaagtacgcagccacctcacaggtgctgctgcctccaaggacgtcatgcagggc
 G G K Y A A T S Q V L L P S K D V M Q G
 acagacgaacacgtggtgtgcaaagtccagcaccccaacggcaacaaagaaaagaacgtg
 T D E H V V C K V Q H P N G N K E K N V
 cctcttcca
 P L P

GGTGAGGGCGGGCCAGCCACCGGGACAGAGGGAGCCGAAGGGGGCGGGAGTGGCGGGCACCGGGCT
 GACACGTGTCCCTCACTGCA

gtgattgctgagctgcctcccaaagtgagcgtcttctgtcccacccccgcgacggcttcttggc
 V I A E L P P K V S V F V P P R D G F F G
 aacccccgcaagtccaagctcatctgcccaggccacgggtttcagtccccggcagattcag
 N P R K S K L I C Q A T G F S P R Q I Q
 gtgtcctggctgcgcgaggggaagcaggtggggtctggcgtcaccacggaccaggtgcag
 V S W L R E G K Q V G S G V T T D Q V Q CH2
 gctgaggccaaagagtctgggcccacgacctacaaggtgaccagcacactgaccatcaaa
 A E A K E S G P T T Y K V T S T L T I K
 gagagcactggctcagccagagcatgttcacctgccgctggatcacaggggctgacc
 E S D W L S Q S M F T C R V D H R G L T
 ttccagcagaatgcgtcctccatgtgtgtcccc
 F Q Q N A S S M C V P

GGTGAGTGACCTGTCCCCAGGGGCAGCACCCACCGACACACAGGGGTCCACTCGGGTCTGGCATTGCGCA
 CCCCCGATGCAGCCATCTACTCCCTGAGCCTTGGCTTCCCAGAGCGGCCAAGGGCAGGGGCTCGGGCGGC
 AGGACCCCTGGGCTCGGCAGAGGCAGTTGCTACTCTTTGGGTGGGAACCATGCCTCCGCCACATCCACA
 CCTGCCCCACCTCTGACTCCCTTCTCTTGACTCCA

gatcaagacacagccatccgggtcttctgcacatccccccatcctttgcccagcatcttctcacc
 D Q D T A I R V F A I P P S F A S I F L T
 aagtccaccaagttgacctgcctggtcacagacctgaccacctatgacagcgtgaccatc
 K S T K L T C L V T D L T T Y D S V T I
 tctgagaccgccagaatggcgaagctgtgaaaacccacaccaacatctccgagagccac
 S W T R Q N G E A V K T H T N I S E S H CH3
 cccaatgccactttcagcgcctgggtgaggccagcatctgcgaggatgactggaattcc
 P N A T F S A V G E A S I C E D D W N S
 ggggagaggttcacgtgcacctgacccacacagacctgccctcgccactgaagcagacc
 G E R F T C T V T H T D L P S P L K Q T
 Atctccggcccaag
 I S R P K

GGTAGGCCCCACTCTTGCCCCTCTTCCTGCACTCCCTGGGACCTCCCTTGGCCTCTGGGGCATGGTGGAA
AGCACCCCTCACTCCCCCGTTGTCTGGGCAACTGGGGAAAAGGGGACTCAACCCAGCCCACAGGCTGGT
CCCCCACTGCCCGCCCTCACACCATCTCTGTTCACAG

gggtggccctgcacaggcccgatgtctacttgcctgccaccagcccgggagcagctgaacctg
G V A L H R P D V Y L L P P A R E Q L N L
cgggagtcggccaccatcacgtgcctggtagcgggttctctcccgggacgtcttctgtg
R E S A T I T C L V T G F S P A D V F V
cagtggatgcagagggggcagcccttgtccccggagaagtatgtgaccagcggcccaatg
Q W M Q R G Q P L S P E K Y V T S A P M
cctgagccccagggcccaggcggtaacttgcgccacagcatcctgaccgtgtccgaagag CH4
P E P Q A P G R Y F A H S I L T V S E E
gaatggaacacgggggagacctacacctgcgtggtagcccatgaggccctgcccacagg
E W N T G E T Y T C V V A H E A L P N R
gtcaccgagaggaccgtggacaagtccaccggtaaaccaccctgtacaacgtgtccctg
V T E R T V D K S T G K P T L Y N V S L
gtcatgtccgacacagctggcacctgtac
V M S D T A G T C Y

TGACCCTGCTGGCCTGCCACAGGCTCGGGGCGGCTGGCCGCTCTGTGTGTGCATGCAAACCTAACCGTGT
CAACGGGGTGAGATGTTGCATCTTATAAAAATTAGAAAATAAAAAGATCCATTCAAAAAGATACTGGTCCCTGA
GTGCACGATGCTCTGGCCTACTGGGGCGGCGGCTGTGCTGCACCCACCCTGCGCCTCCCCTGCAGAACAC
CTTCTCCACAGCCCCACCCCTGCCTCACCCACCTGCGTGCCTCAGTGGCTTCTAGAAAACCCCTGAATT
CCCTGCAGCTGCTCACAGCAGGCTGACCTCAGACTTGCCATTCCCTCCTACTGCTTCCAGAAAAGAAAGCTG
AAAGCAAGACCACACGTATACAGGCAGCACACAGGCATGTGTGGATACACATGGACAGACACGGACACAC
ACAAACACATGGACACACAGAGACGTGCTAACCCATGGGCACACACATACACAGACATGGACCCACACAC
AAACATATGTGGACACACATGTACAAACATGCACAGGCACACAAAAGAGAACAACACTGACTACAGGCACACAC
ACACACGGGCACACACATGGATATGTGCACACATGGACACATACATGTGCAGGACATGCACACACACAGA
CACACTAGCACAGAGGCATACACACAGACACACACATTACAAAACACACATGTGCATGCAAACACACA
CACATGTACAGACACAAGTACATGGACACATGCACACCCAGAGACACACTGACACAGACACACAGGAGCA
TGTGATACTAACACGTGGACACACACCTTACCCACAGGCACACAACAGATGGACACCGGTACACAGA
CATGCACACACCCACAGGCACAACACGTGCGCATGCCGGCCGAGATCCCTGGCCAGGGATCCCTGGCCAG
GGATCCCTGGCCAGGGATCTTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCA
ATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCC
AATATGACCGCCATGTTGGCATTGATTAATGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTF
CATAGCCCATATATGGAGTTCGGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACG
ACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACG
TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCG
CCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACT
TTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACAC
CAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGT
TTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAGTCTCGTAACAACCTGCGATCGCCCGCCCGTTGAC
GCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAGATC
ACTAGAAGCTTTATTGCGCTAGTTTATCACAGTTAAATTTGCTAACGCAGTCAGTGTCTTCTGACACAACAG
TCTCGAACTTAAGCTGCAGTGACTCTCTTAAGGTAGCCTTGCGAAGTTGGTCTGTGAGGCACTGGGCAGG
TAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAAGGAGACCAATAGAAAACCTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACT

CTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCAC
TCCCAGTTCAATTACAGCTCTTAAGGCTAGAGTACTTAATACGACTCACTATAGGCTAGCGCTAGCTCAA
GACTCAGCCGGAC

gctagctcaagactcagccggacatggacatgagggtcctgctcagctcctgggactcct
- L K T Q P D M D M R V P A Q L L G L L
ctgctctggctcccagataccagatgt
L L W L P D T R C

gacatccagatgacccagctctccatcctccctg
D I Q M T Q S P S S L
tctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggagctcagggcattggcaat
S A S V G D R V T I T C R A S Q G I G N
tatttagcctggatcagcagaaaccagggaaagtctctaaactcctgatctatactaca
Y L A W Y Q Q K P G K V P K L L I Y T T
Tccattttgcaatcaggggtcccctctcgattcagtgaggcagtgatctgggacagatttc VL
S I L Q S G V P S R F S G S G S G T D F
actctcaccatcagcagcctgcagcctgaagattttgcaacttattactgtcaaaaatat
T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q K Y
Aacagtccccgaggacgttcggccaagggaccaggggtggac
N S A P R T F G Q G T R V D

atcaaacgaactgtggct
I K R T V A
gcaccatctgtcttcatcttcccggcatctgatgagcagttgaaatctggaactgcc
A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A
tctgttgtgtgctgctgaataac
S V V C L L N N
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggtaac
F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N
tcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacc CL
S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T
ctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcaagtcacccat
L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H
cagggcctgagctcgcctgtcacaagagcttcaacaggggagagtggttag
Q G L S S P V T K S F N R G E C -

ATACTCGAGTTGGCCGCTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATGCTTCGAGCAGACATGATAAGATAACATTGATG
AGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGTC
TTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTTCATTTATGTTTCAG
GTTTCAGGGGAGATCTCGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTCTAAAATCCGATAAG
GATCGATGGCGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGTAGTTGAGGCCGTTGA
GCACCGCCGCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCGGCCACGGGGCCTGC
CACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCGGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATG
TCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGCGCGCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGA
GGATCTCTGACGGAAGGAAAGAAGTCAAGAAGGCAAAAACGAGAGTAACTCCACAGTAGCTCCAAAATTCTT
TATAAGGGTCAATGTCCATGCCCCAAAGCCACCCAAGGCACAGCTTGGAGGCTTGAACAGTGGGACATGT
ACAAGAGATGATTAGGCAGAGGTGAAAAAGTTGCATGGTGTGCTGGTGGCAGACCAATTTATGCCTACAGC

CTCCTAATACAAAAGACCTTTAACCTAATCTCCTCCCCAGCTCCTCCCAGTCCTTAAACACACAGTCTTT
GAAGTAGGCCTCAAGGTCGGTCGTTGACATTGCTGGGAGTCCAAGAGTCCCTCTTATGTAAGACCTTGGGC
AGGATCTGATGGGCGTTCACGGTGGTCTCCATGCAACGTGCAGAGGTGAAGCGAAGTGCACACGGACCGG
CAGATGACAAGGCACAGACGGGGAGACCGCCTAAAGAGAGGTGCGCCCCGTGCTCGGCTGGAACGGCAGA
CGGAGAAGGGGACGAGAGAGTCCCAAGCGGCCCCGCGAGGGTTCGTCGCGGGATTTCAGCGCCGACGGGA
CGTAAACAAAAGGACGTCCCGGAAGGATCTAAAGCCAGCAAAAGTCCCATGGTCTTATAAAAAATGCATAG
CTTTAGGAGGGGAGCAGAGAACTTGAAAGCATCTCCTGTTAGTCTTTCTTCTCGTAGACTTCAAACCTTA
TACTTGATGCCTTTTTCCCTCCTGGACCTCAGAGAGGACGCCTGGGTATTCTGGGAGAAGTTATATTTCC
CCAAATCAATTTCTGGGAAAAACGTGTCACTTTCAAATTCCTGCATGATCCTTGTCACAAAAGAGTCTGAG
GTGGCCTGGTTGATTCATGGCTTCCCTGGTAAACAGAACTGCCTCCGACTATCCAAACCATGTCTACTTTA
CTTGCCAATTCGGTGTTCATAAAGTCTTAAGGCATCATCCAAACTTTTGGCAAGAAAATGAGCTCCTC
GTGGTGGTCTTTGAGTCTCTACTGAGAACTATATTAATTCTGTCTTTAAAGGTCGATTCTTCTCAGG
AATGGAGAACCAGGTTTTCTACCCATAATCACCAGATTCTGTTTACCTTCCACTGAAGAGGTTGTGGTC
ATTCCTTGGAGTACTTGAACCTCGTTCCTGAGCGGAGGCCAGGGTTCGGTCTCCGTTCTTGCCAATCCCCA
TATTTTGGGACACGGCCACGATGCAGTTCATGCTCGAACCATGATGGCAATTCTAGAAAACCTTTTTGCA
AAAGCCTAGGCCTCCAAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCC
TCTGCATAAAATAAAAAAATTAGTCAGCCATGGGGCGGAGAATGGGCGGAACGGGCGGAGTTAGGGGCG
GGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGGACTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTGCATACTTCTGCC
TGCTGGGGAGCCTGGGGAC

FIGURA
7

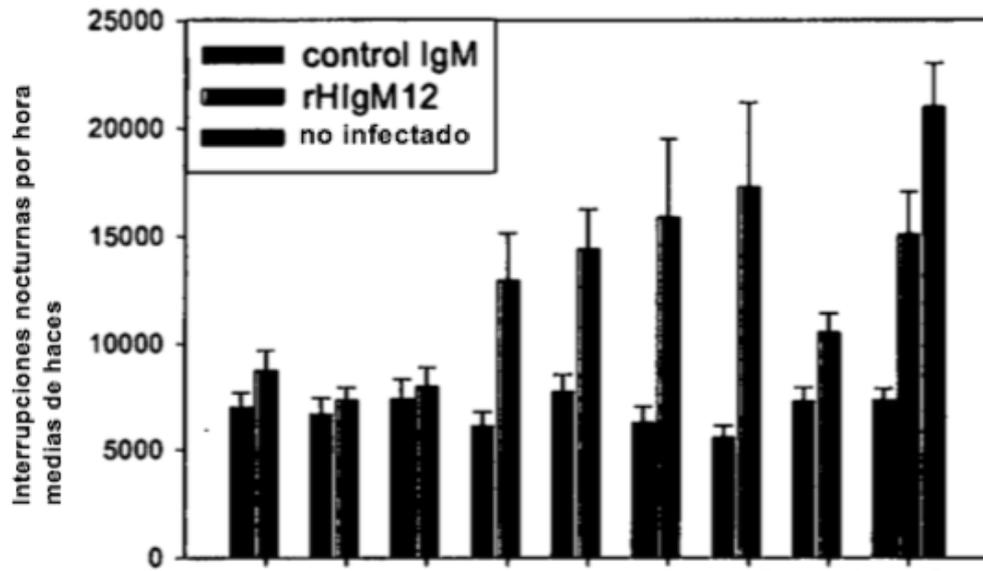


FIGURA
8

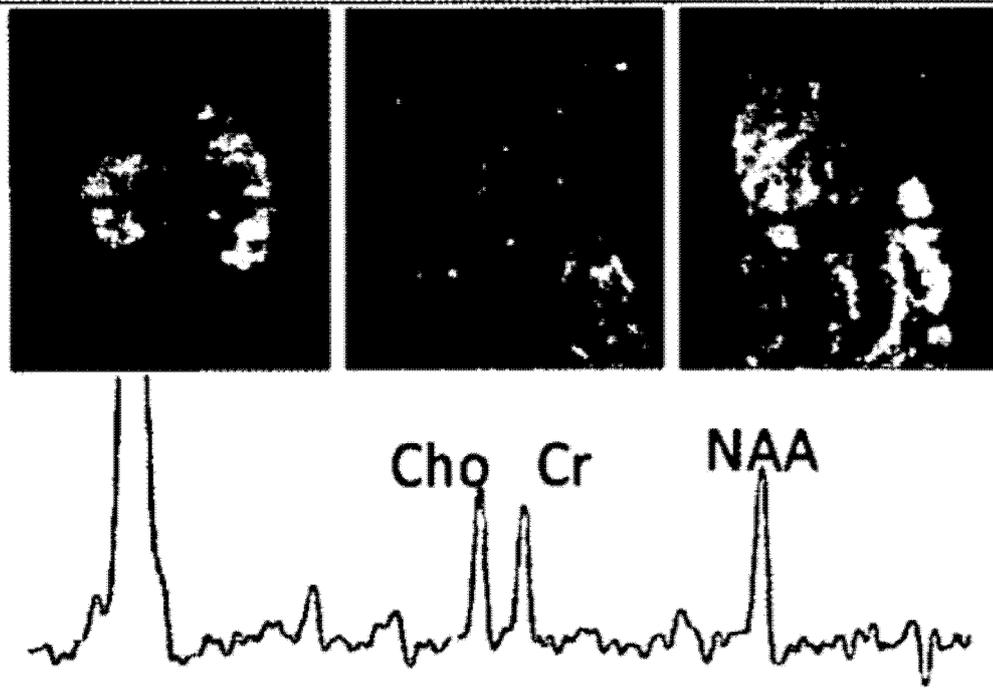


FIGURA 9

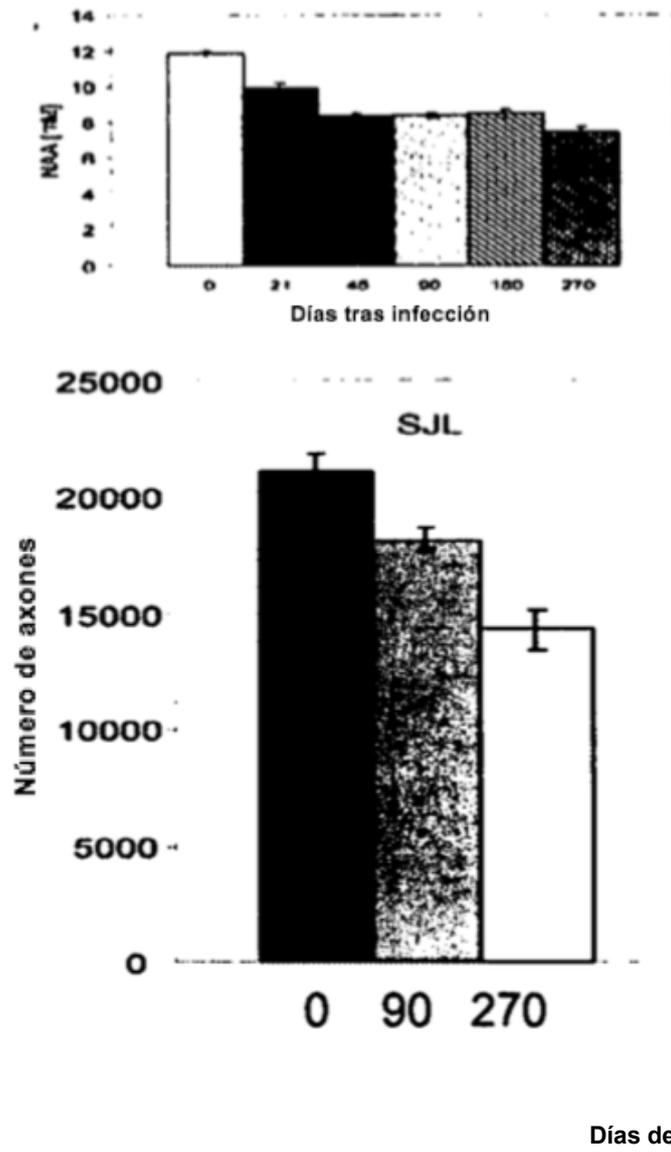


FIGURA 10

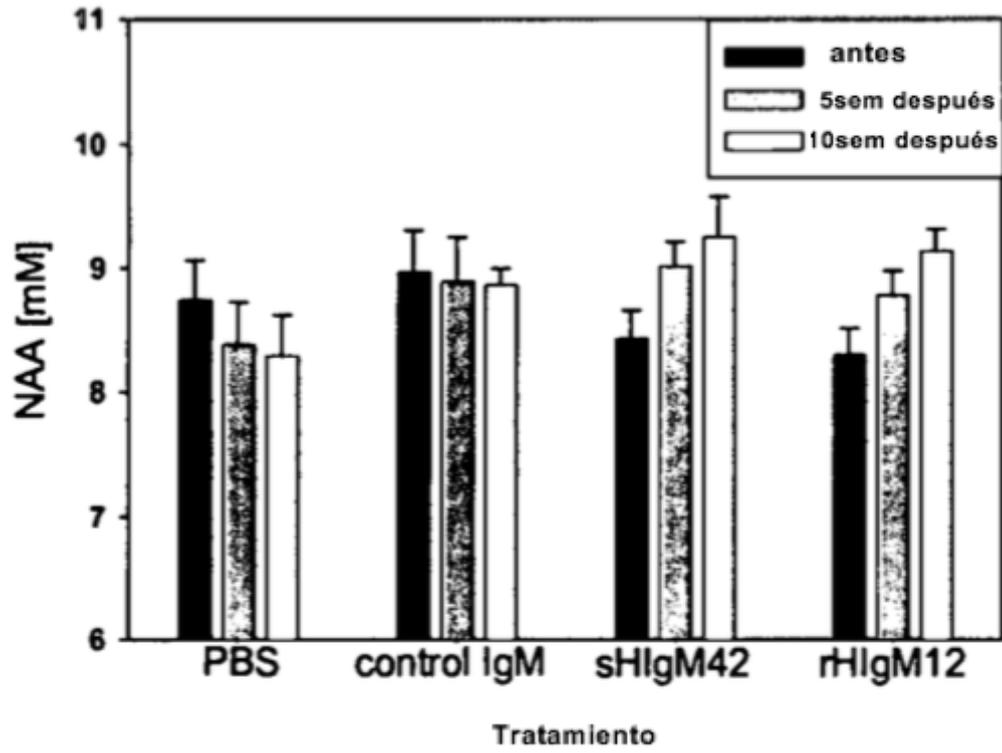


FIGURA 11

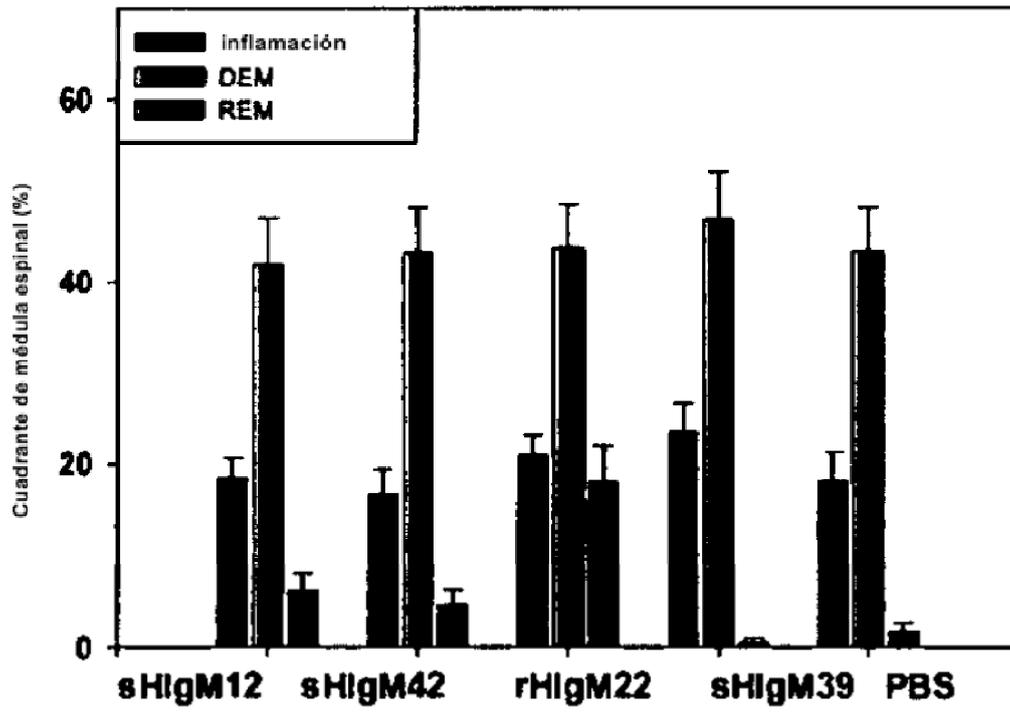


FIGURA 12

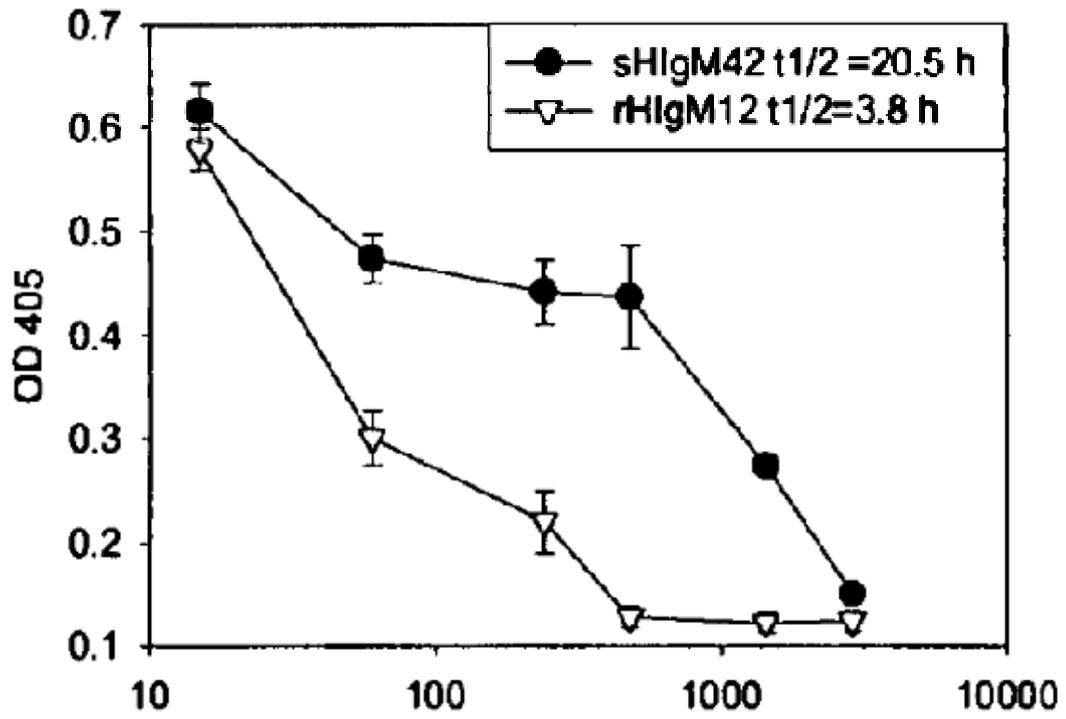


FIGURA 13

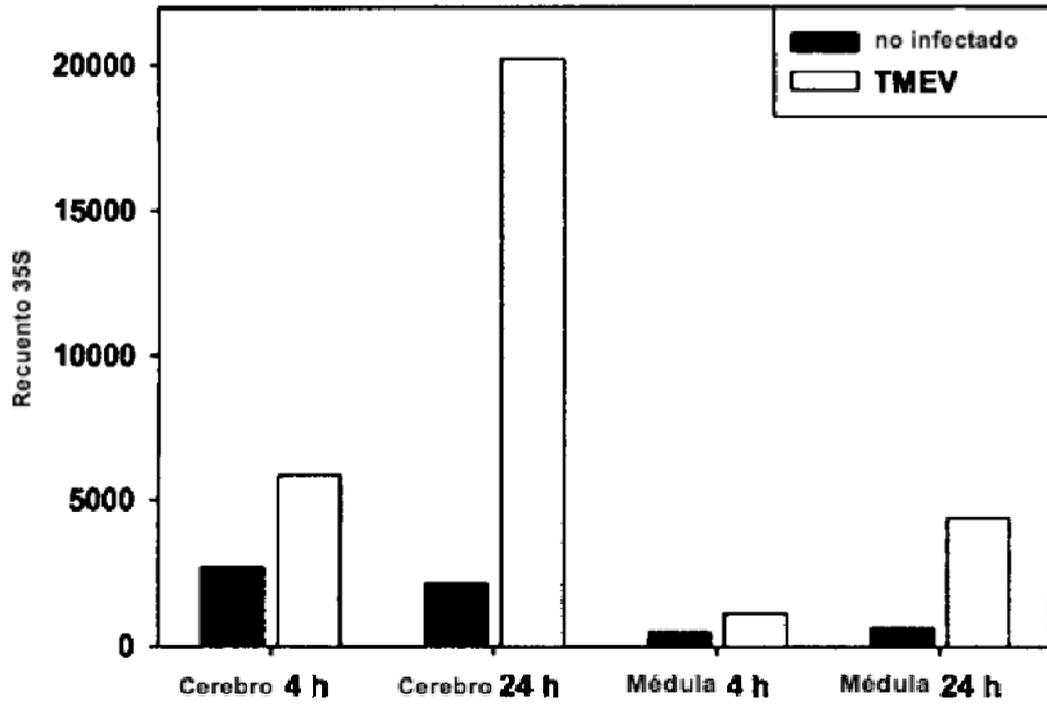


FIGURA 14

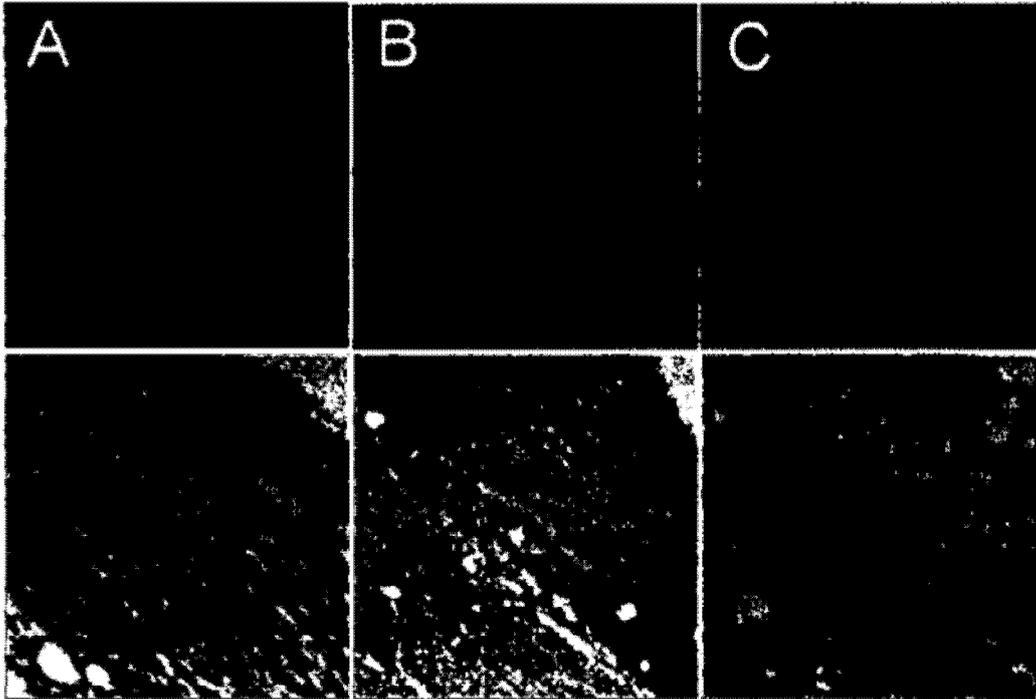


FIGURA 15

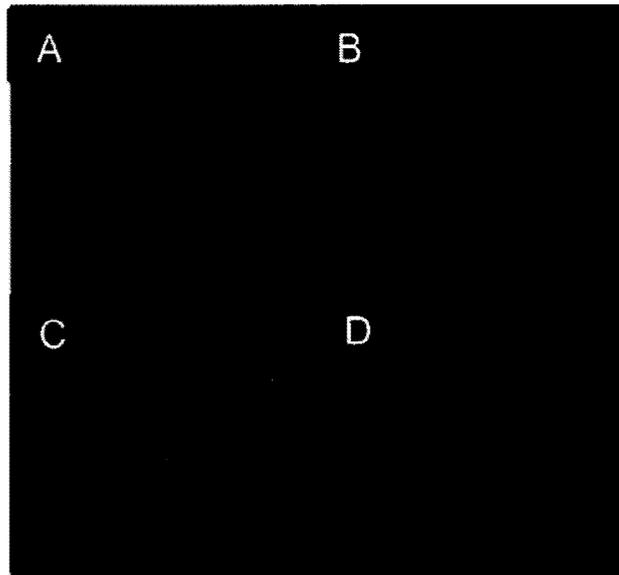


FIGURA 16

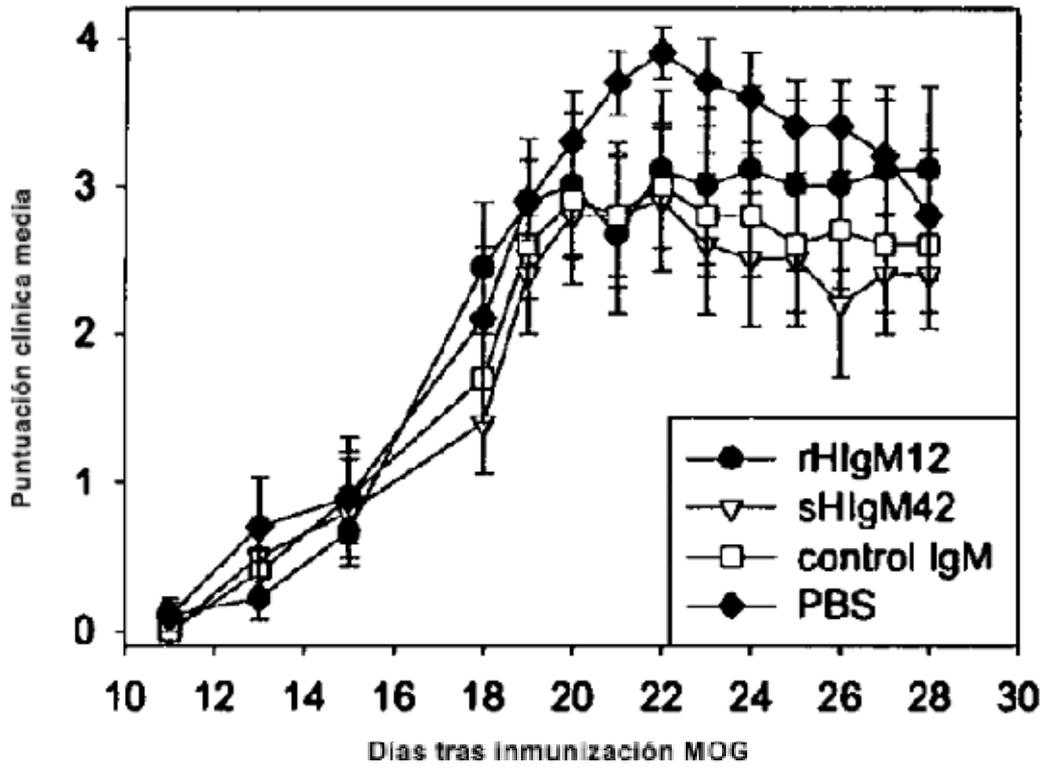


FIGURA 17

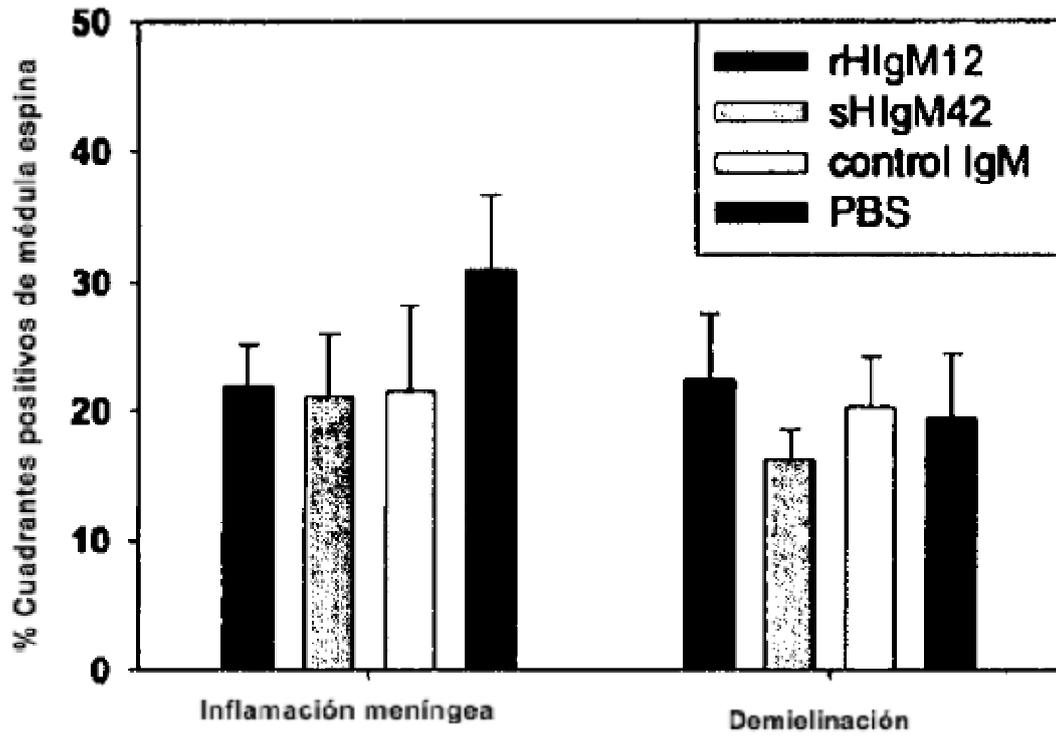


FIGURA 18

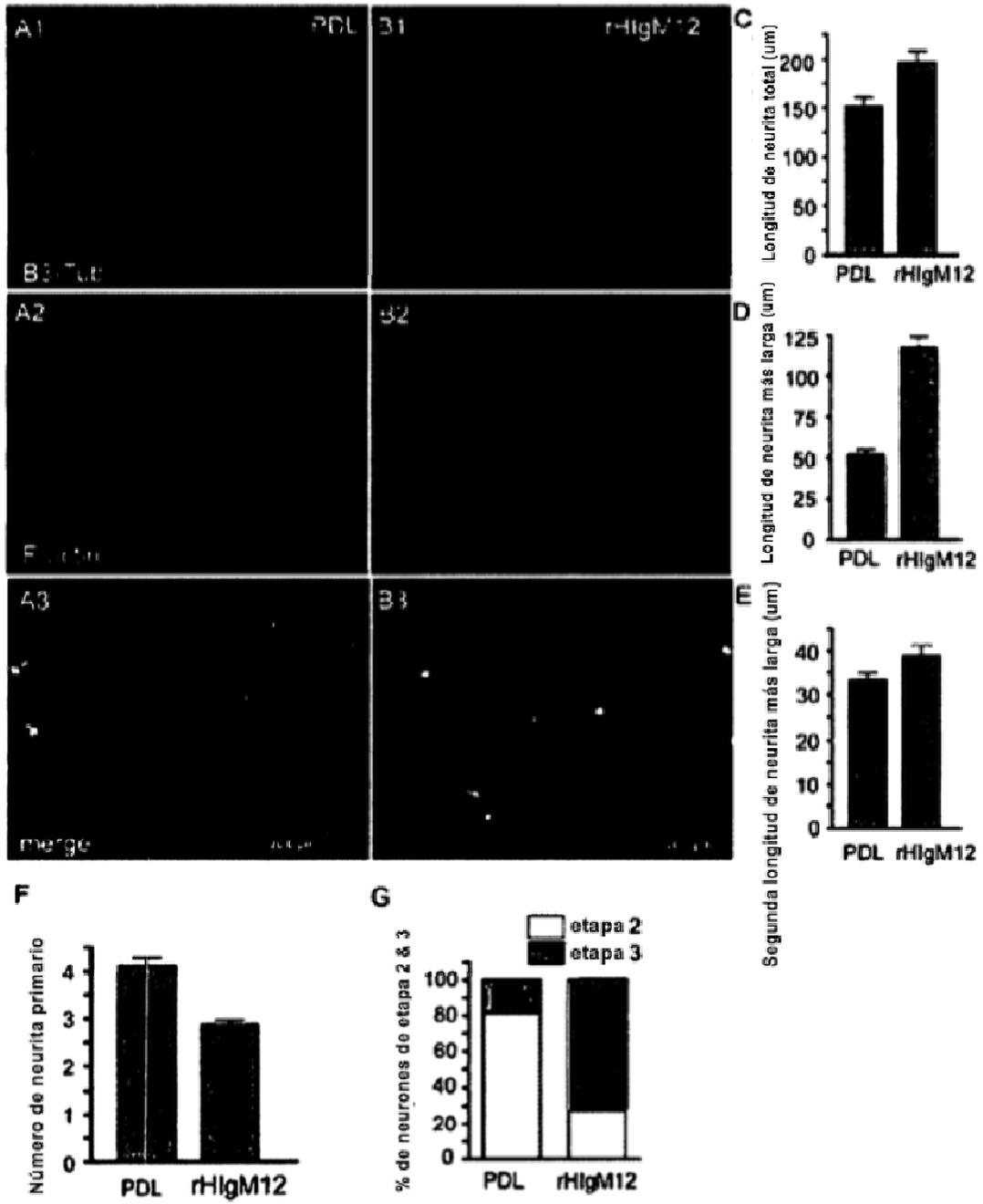


FIGURA 19

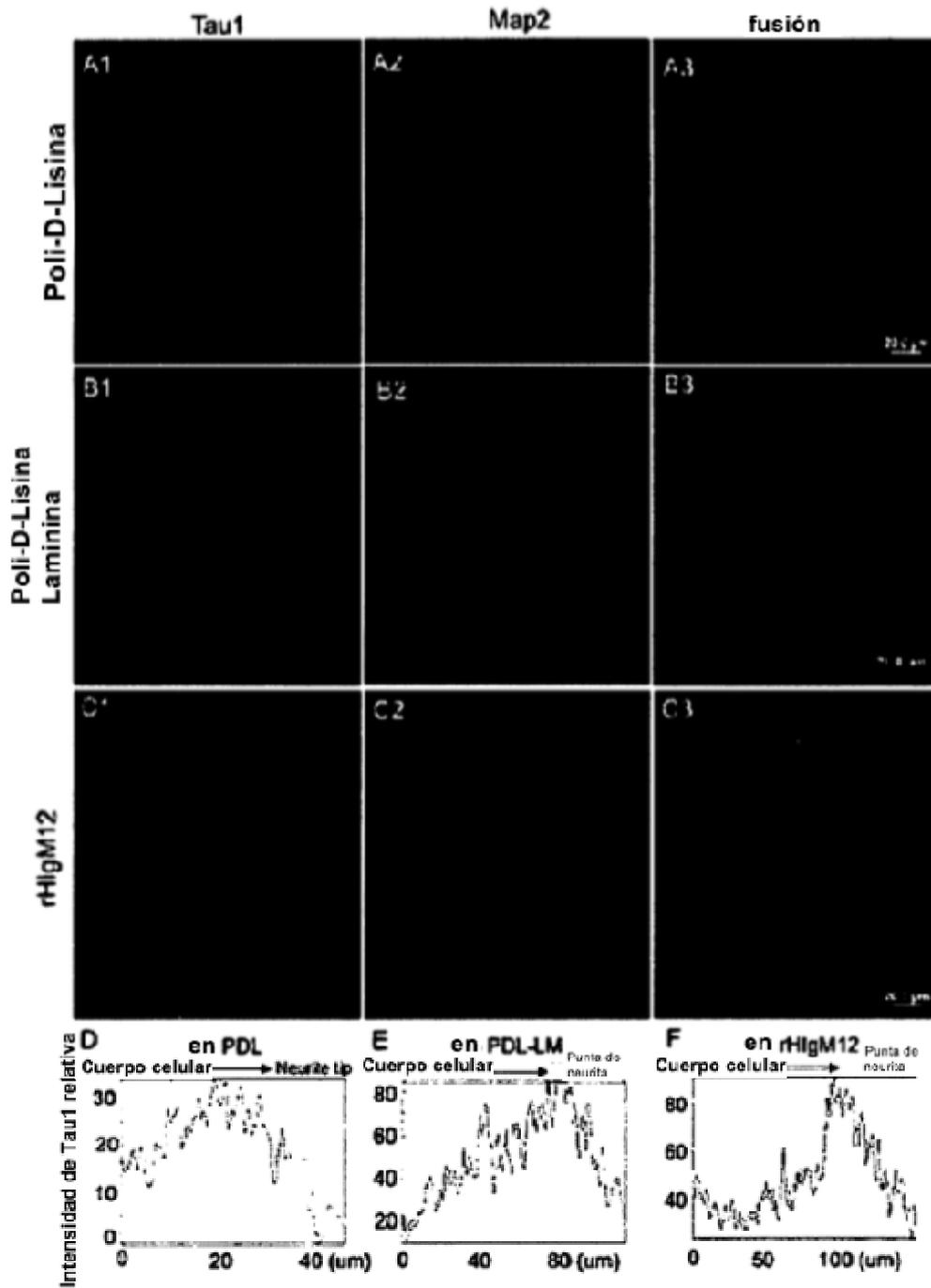


FIGURA 20

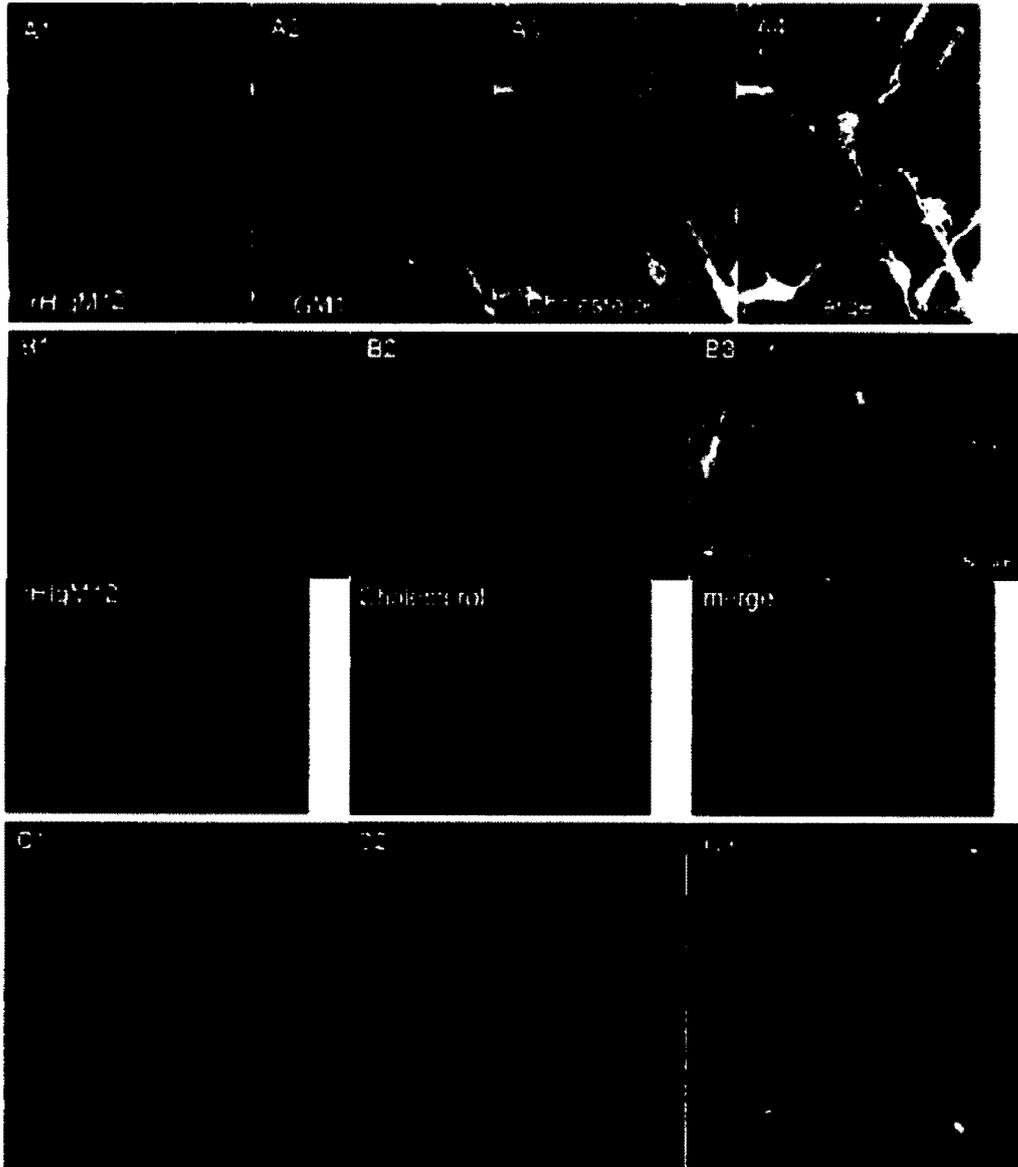


FIGURA 21

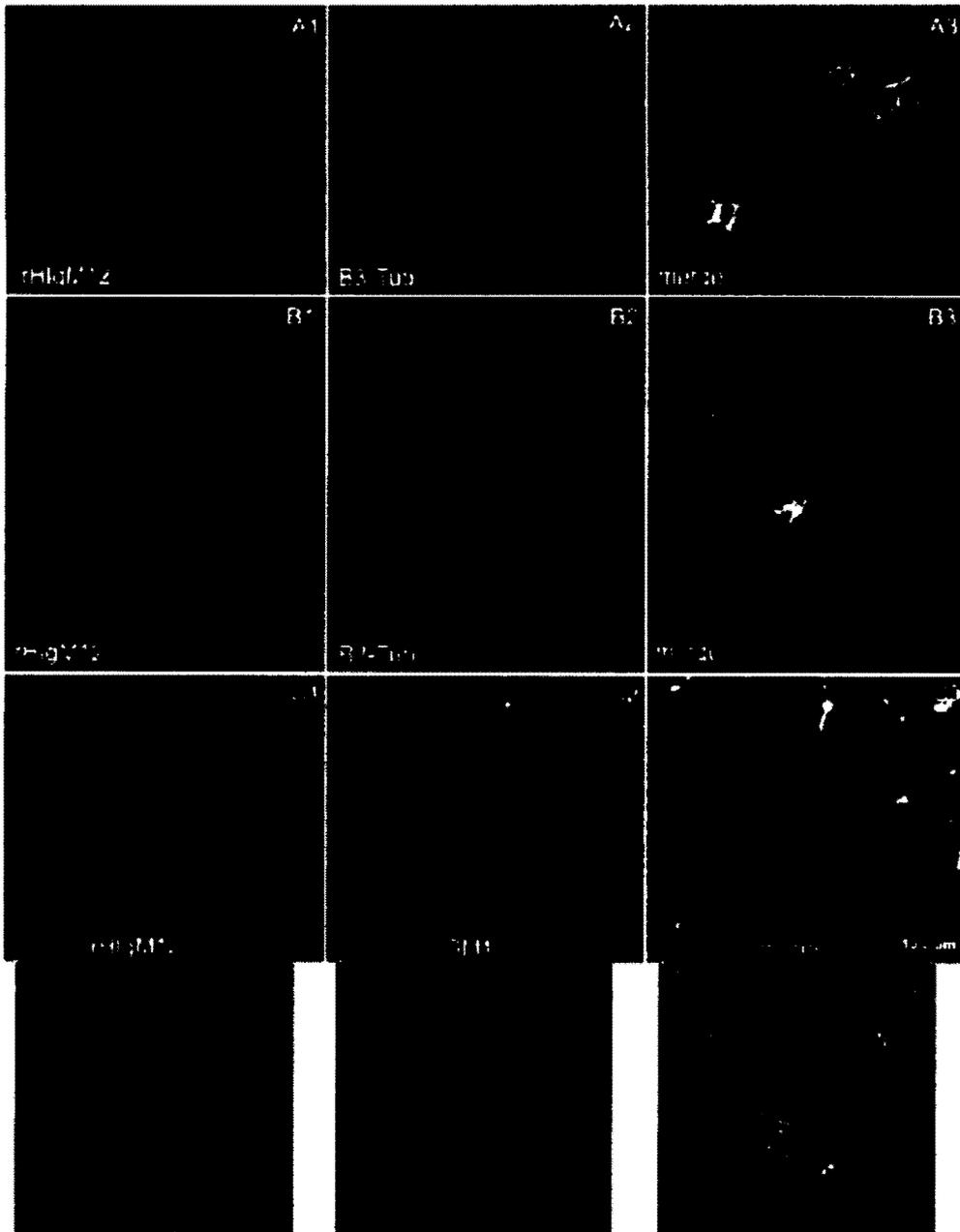


FIGURA 22

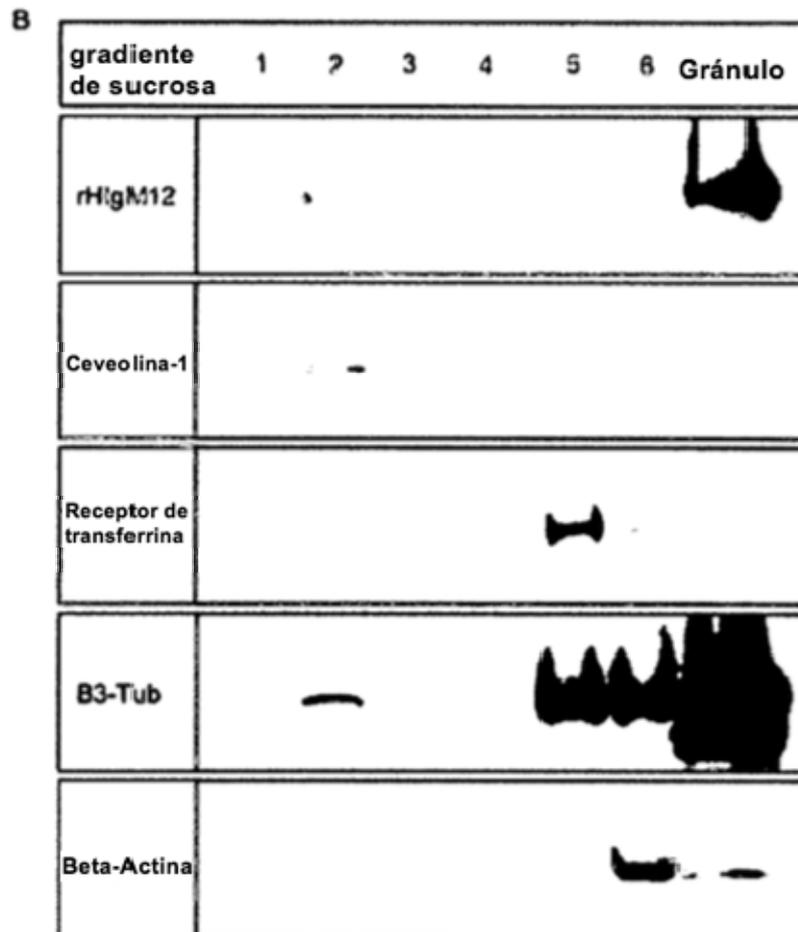
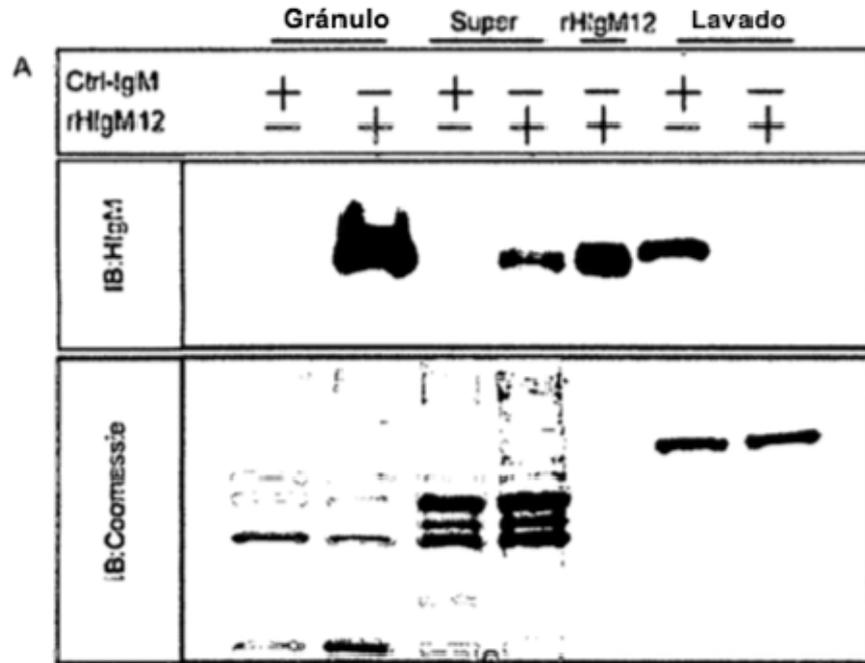


FIGURA 23

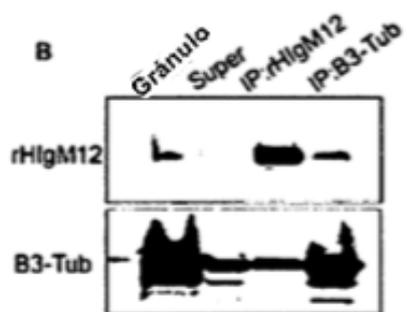
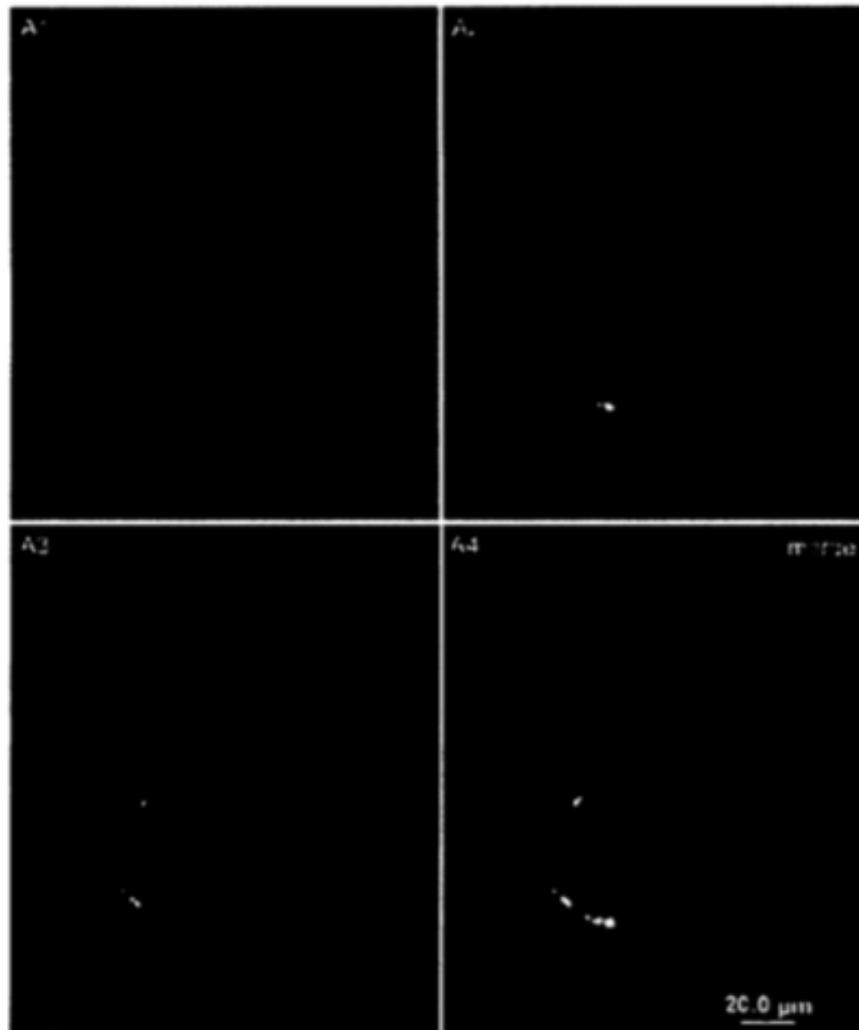


FIGURA 24

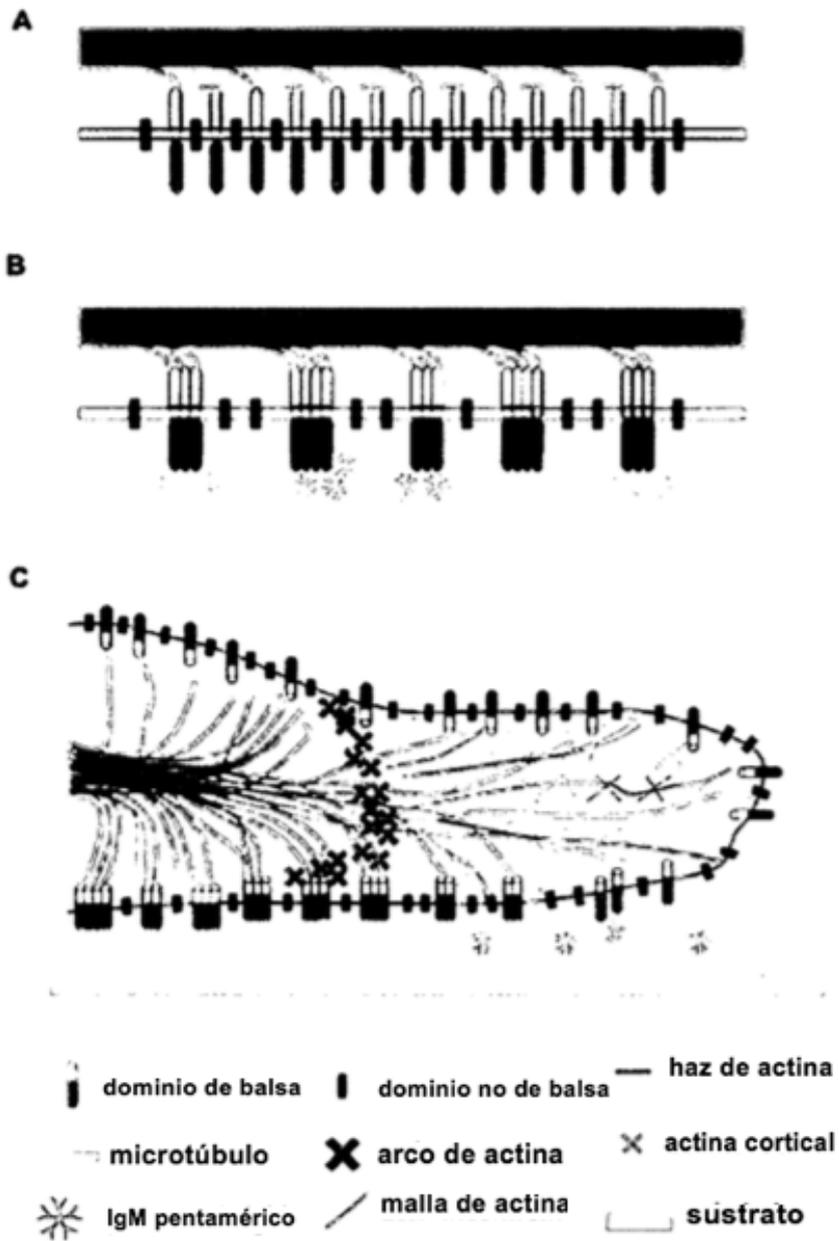


FIGURA 25

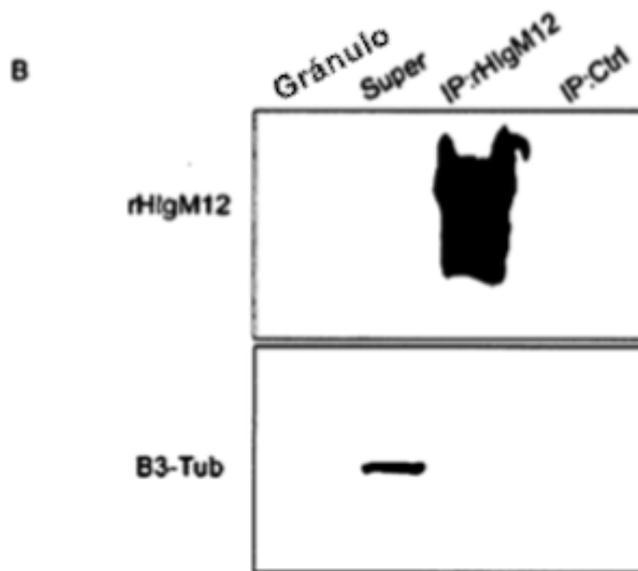
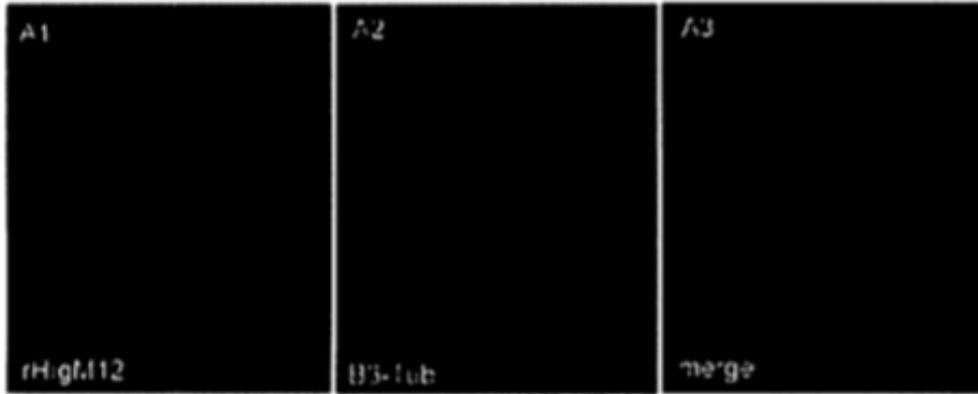


FIGURA 26

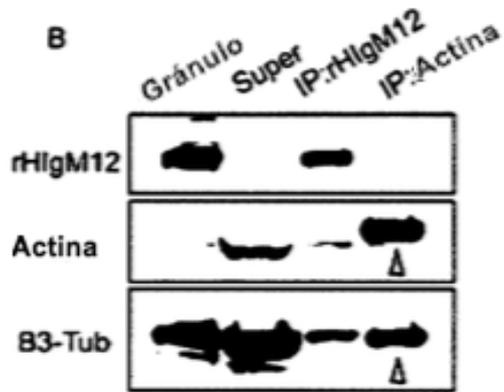
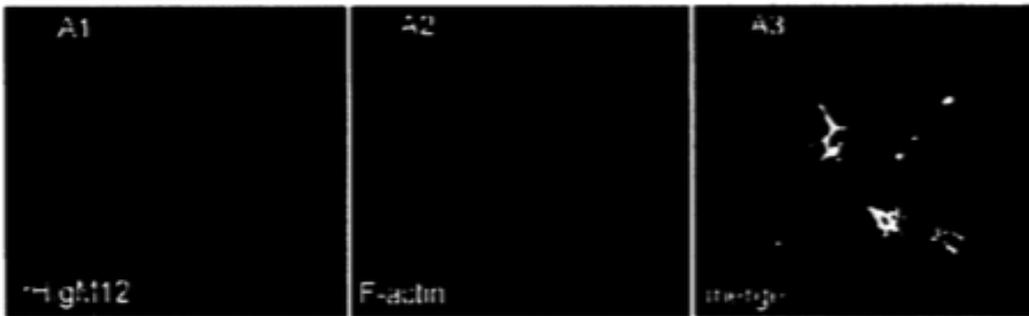


FIGURA 27

A



B

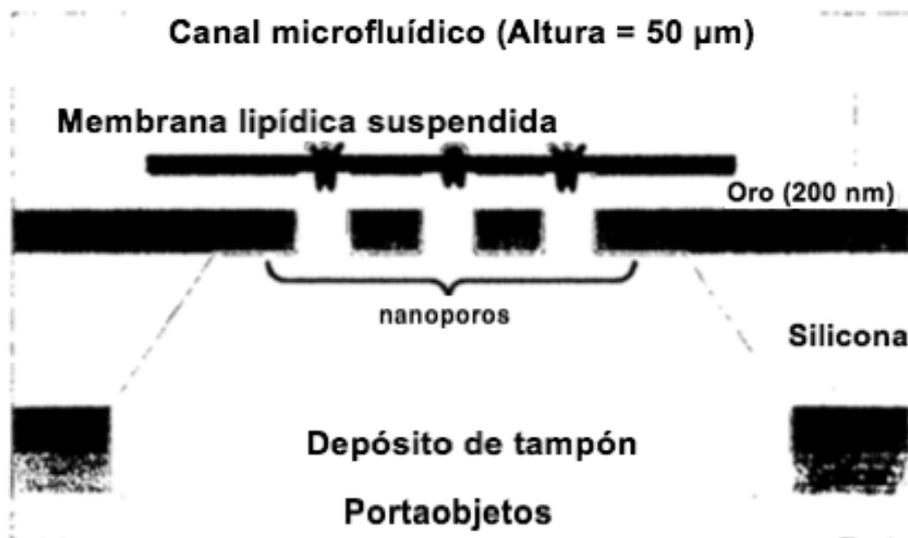


FIGURA 28



FIGURA 29

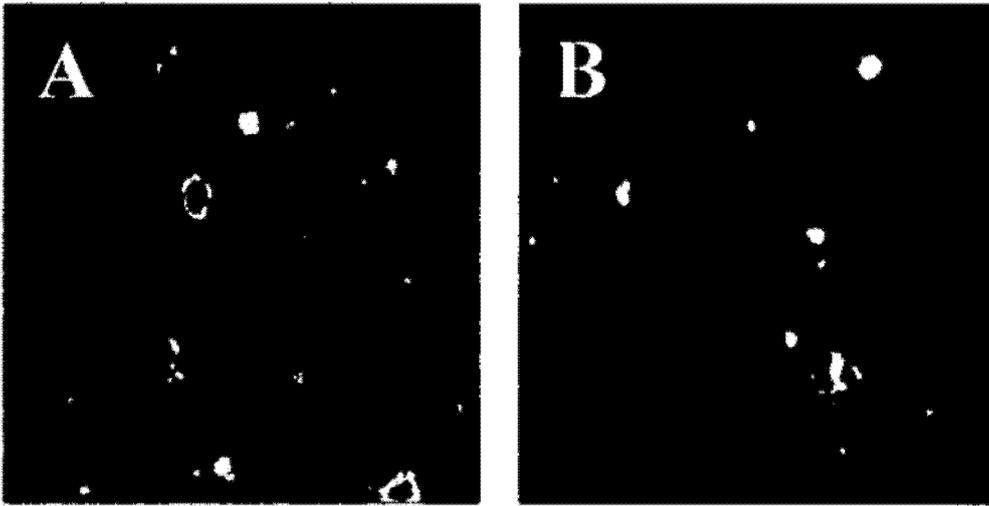


FIGURA 30

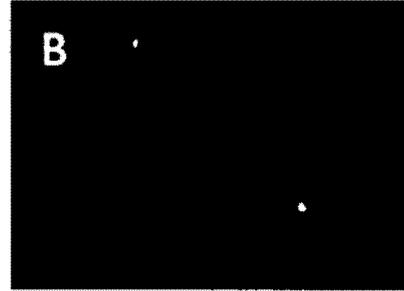


FIGURA 31

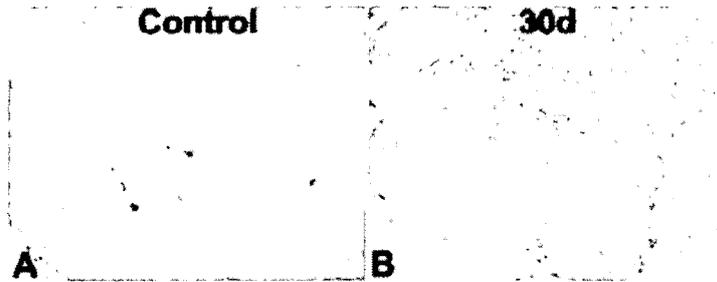


FIGURA 32

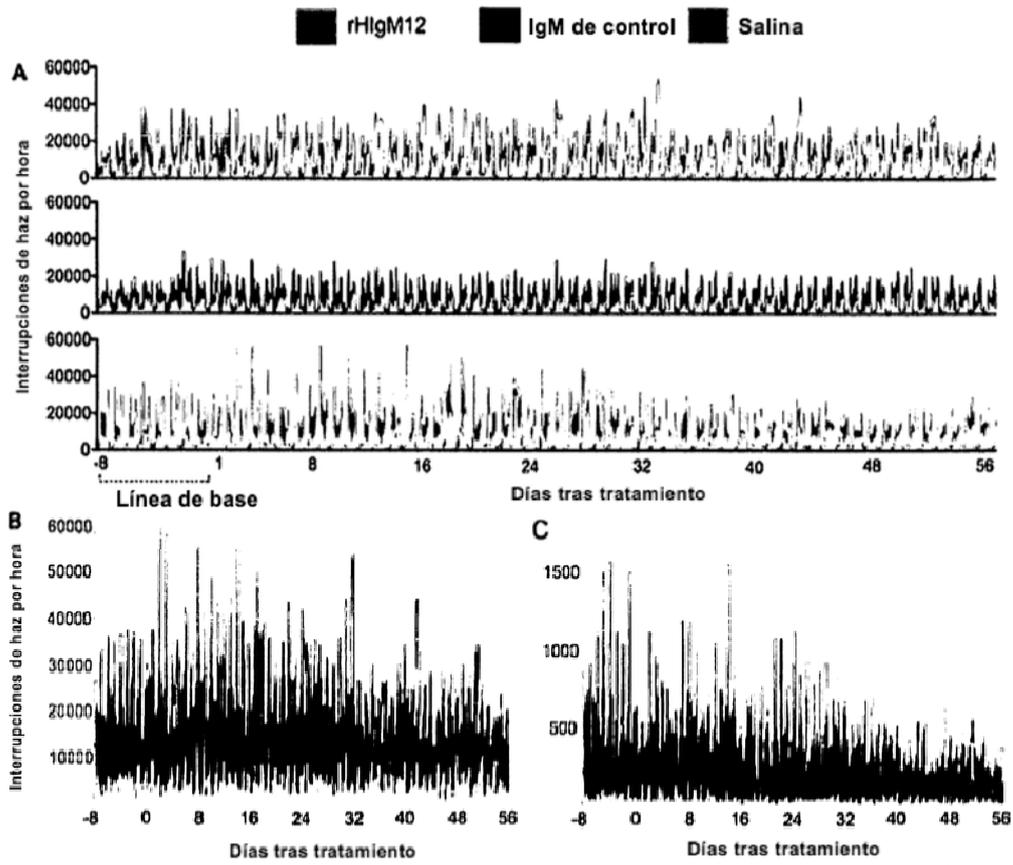


FIGURA 33

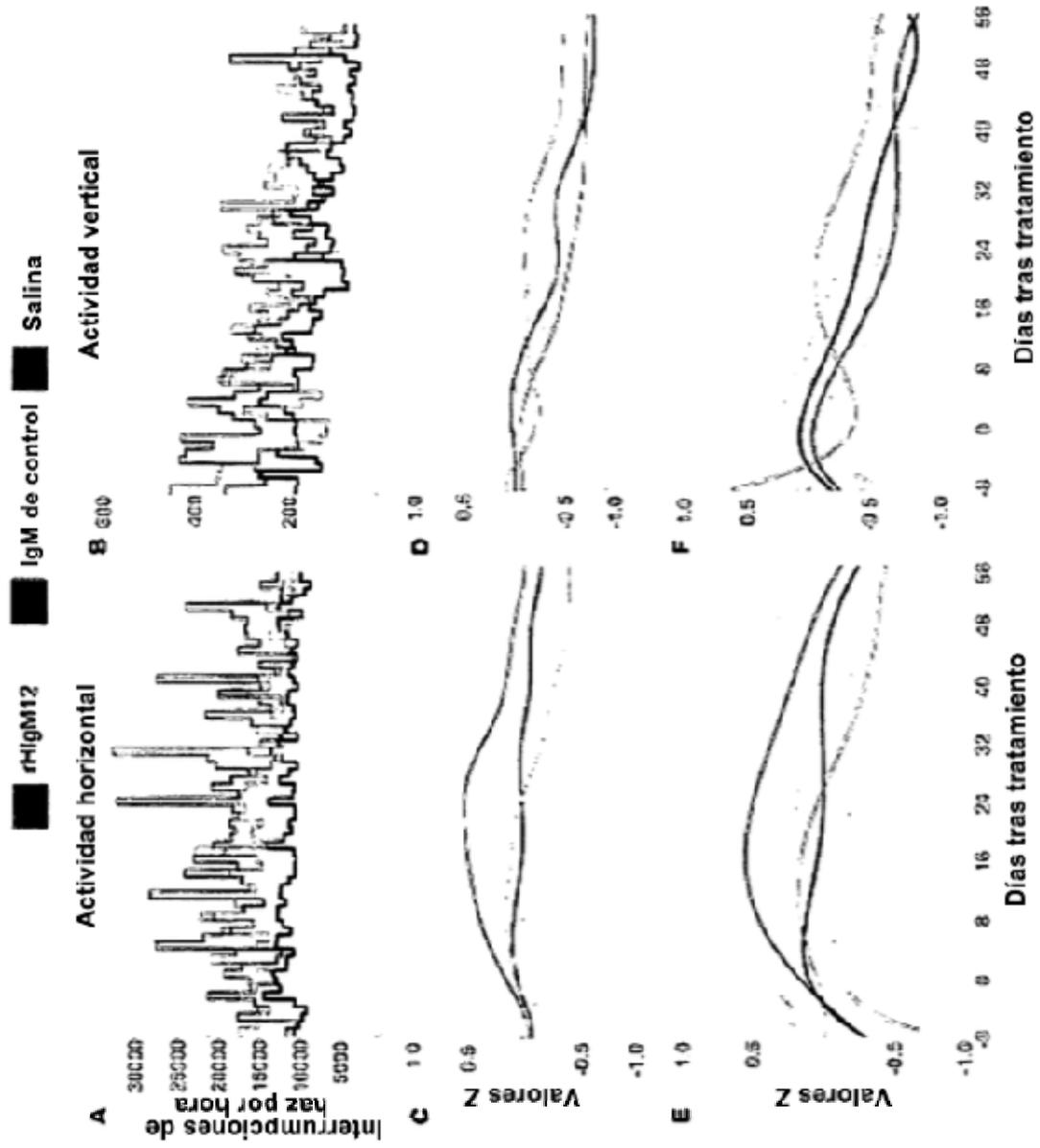


FIGURA 34

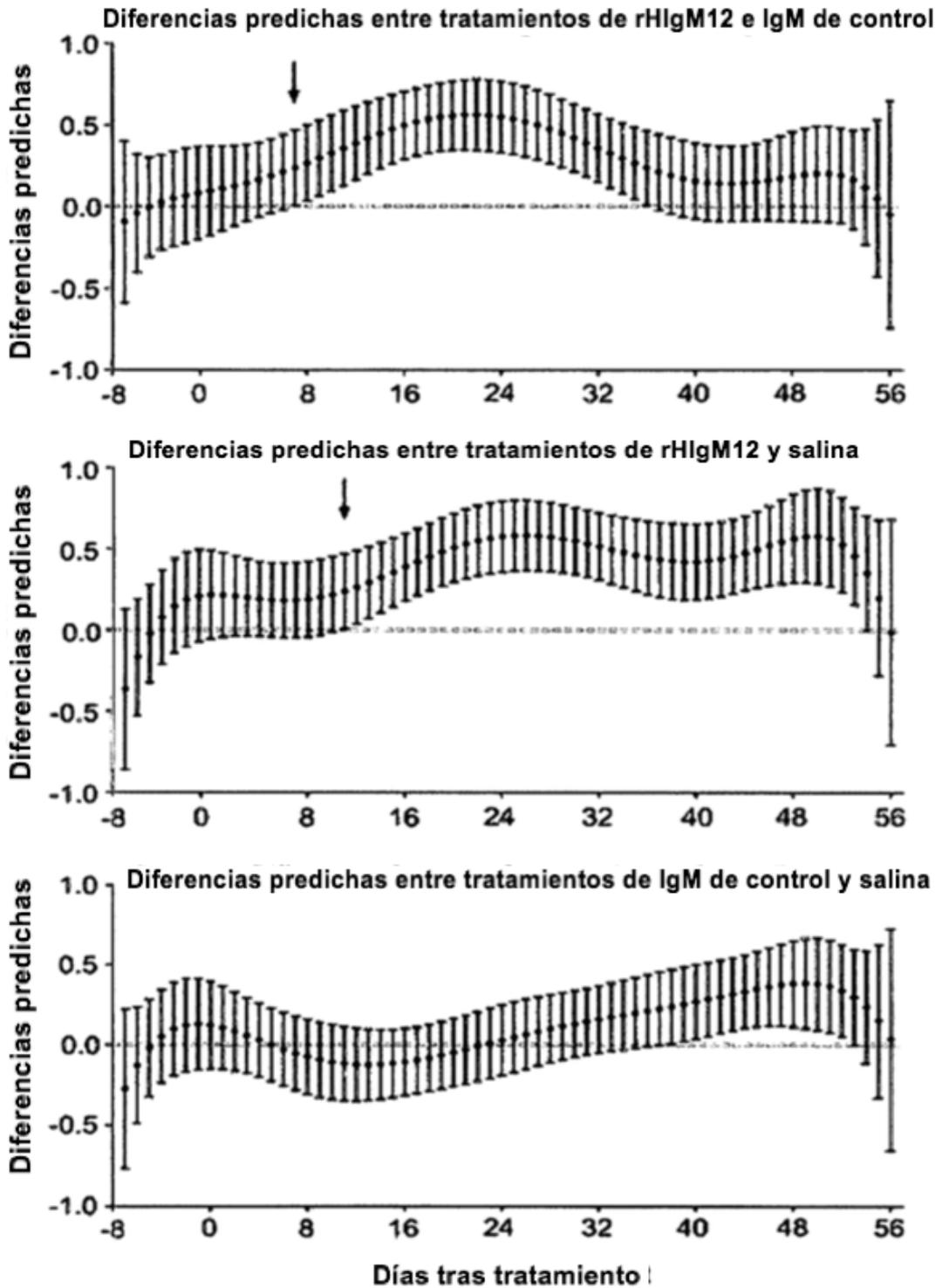


FIGURA 35

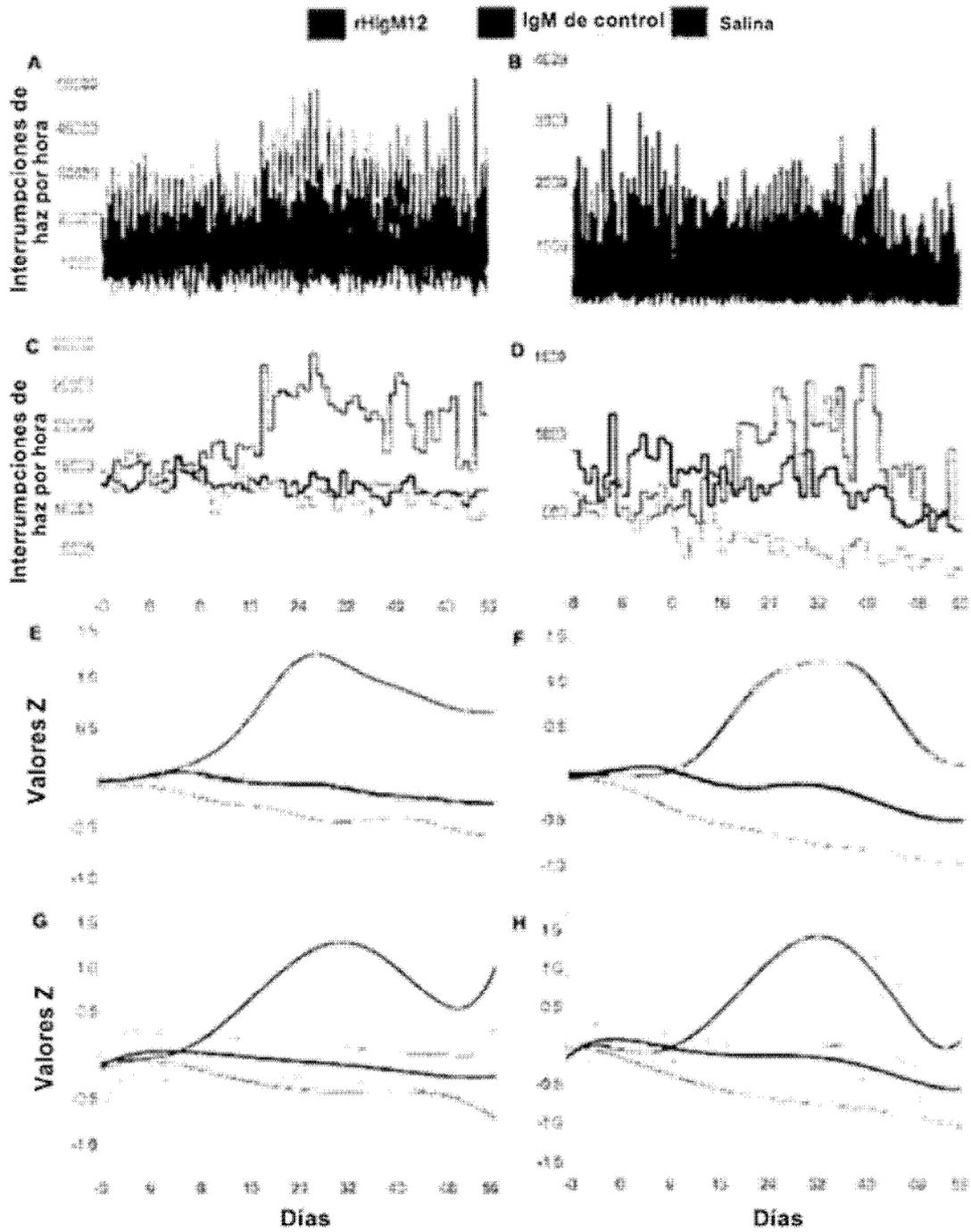


FIGURA 36

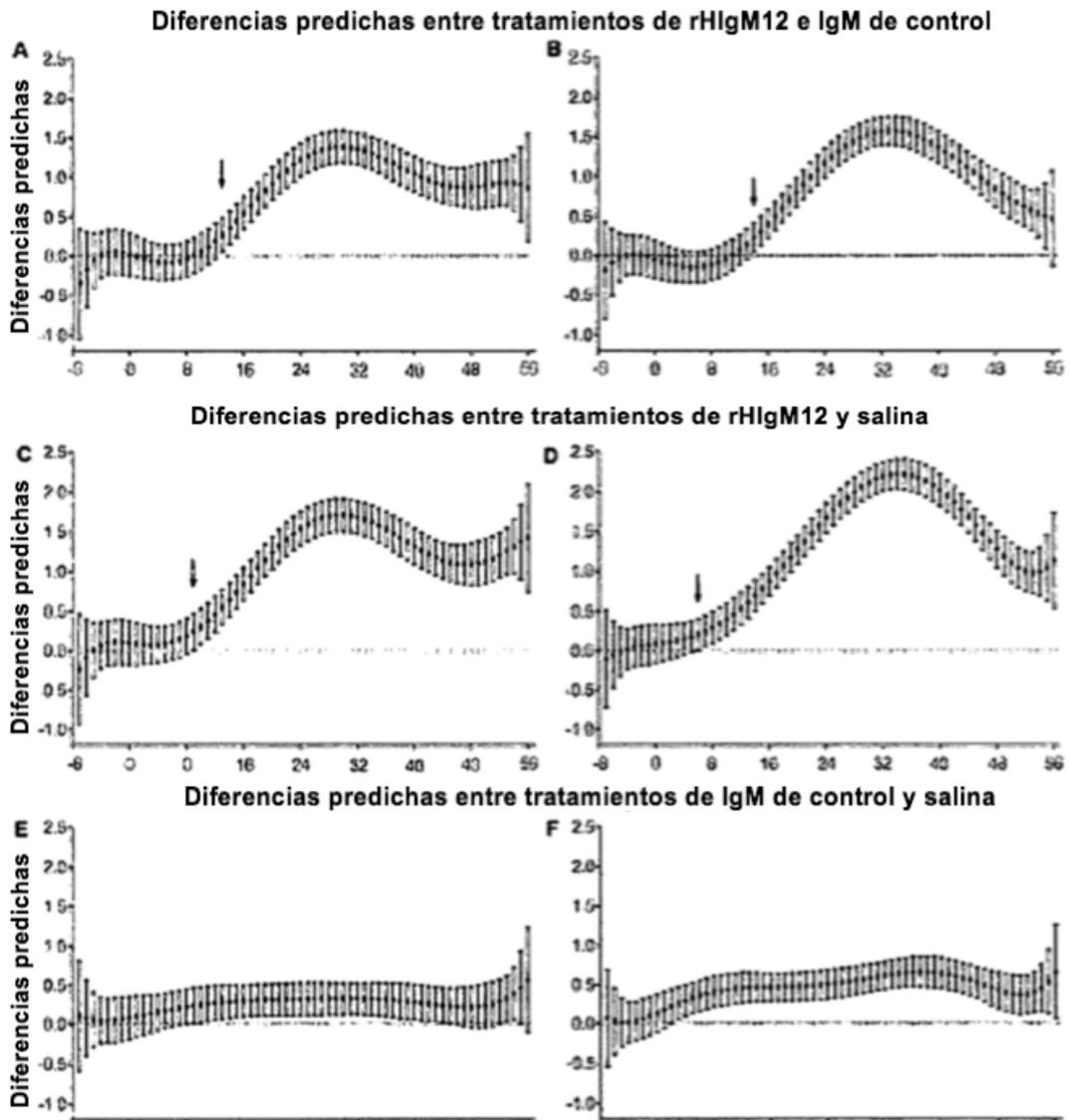


FIGURA 37

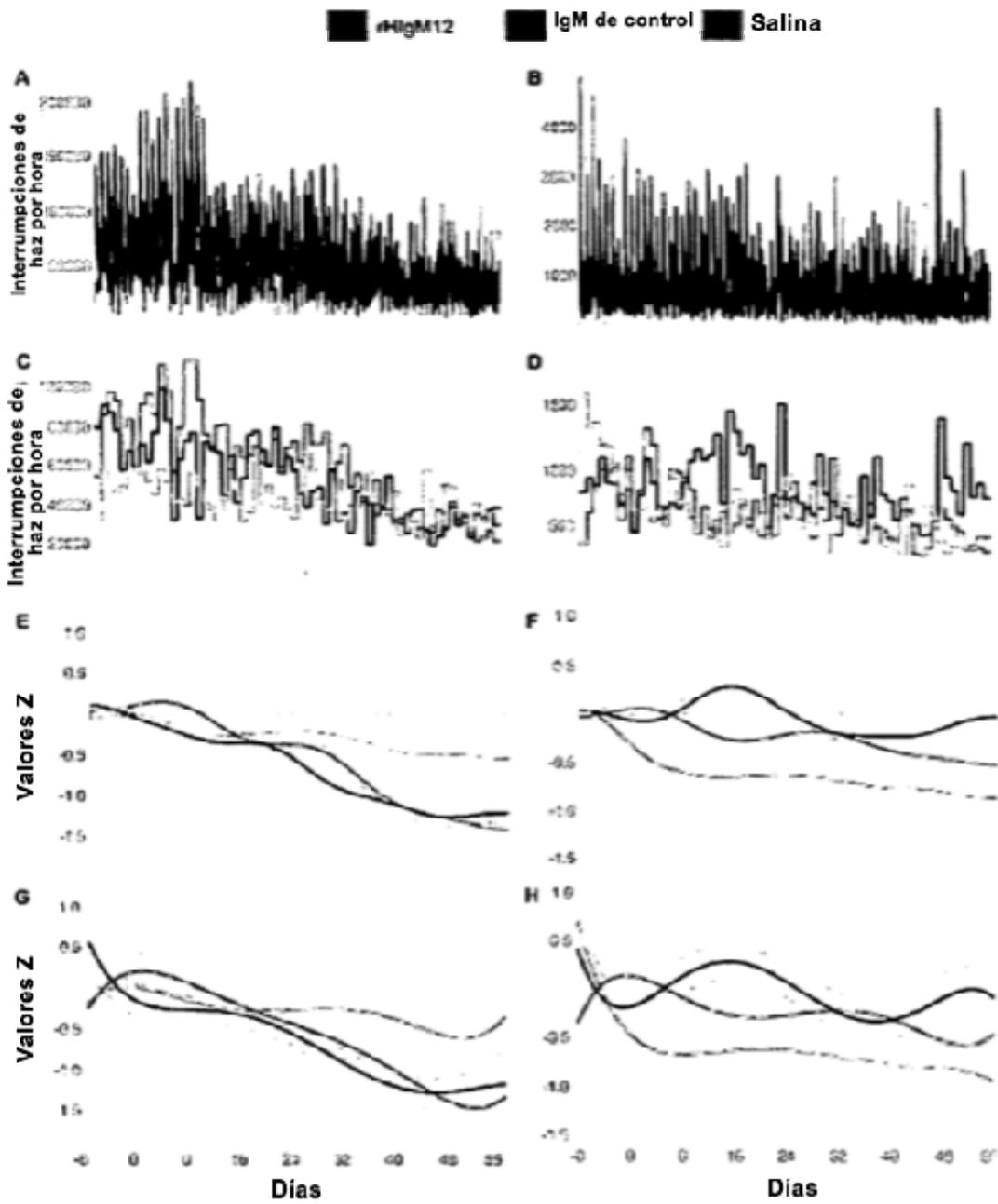


FIGURA 38

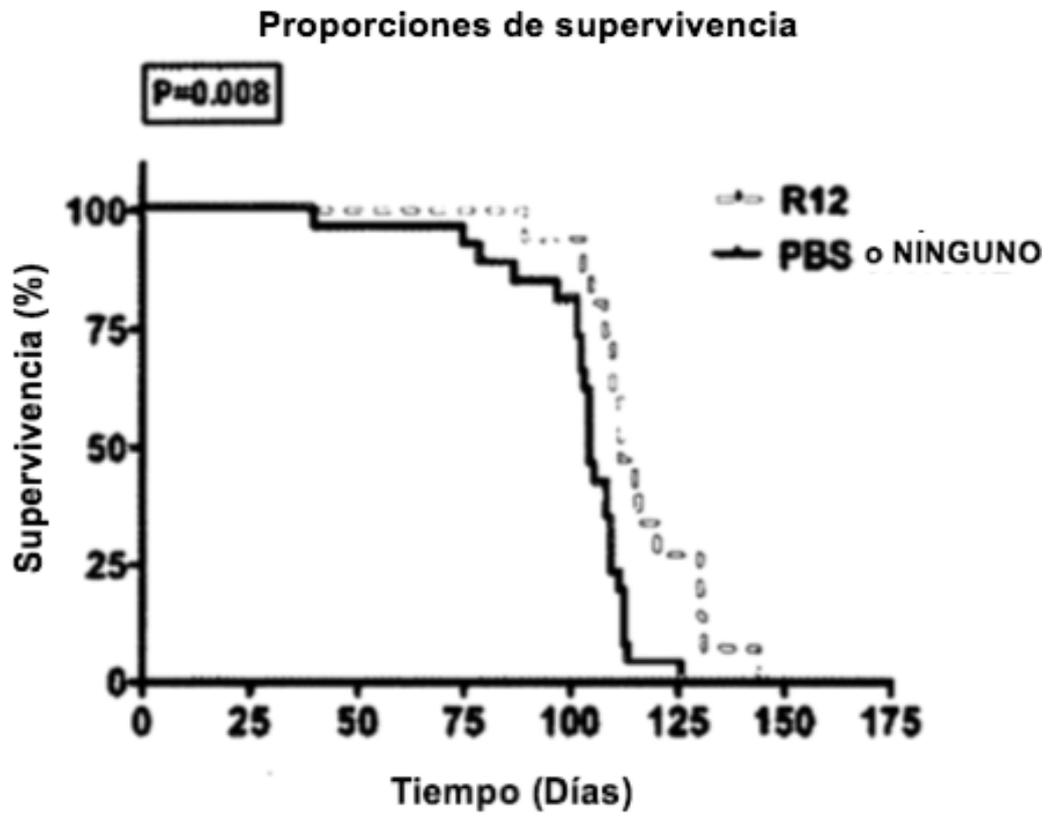


FIGURA 39

**Perdida de peso como función de tiempo
en ratones de G86R SOD1**

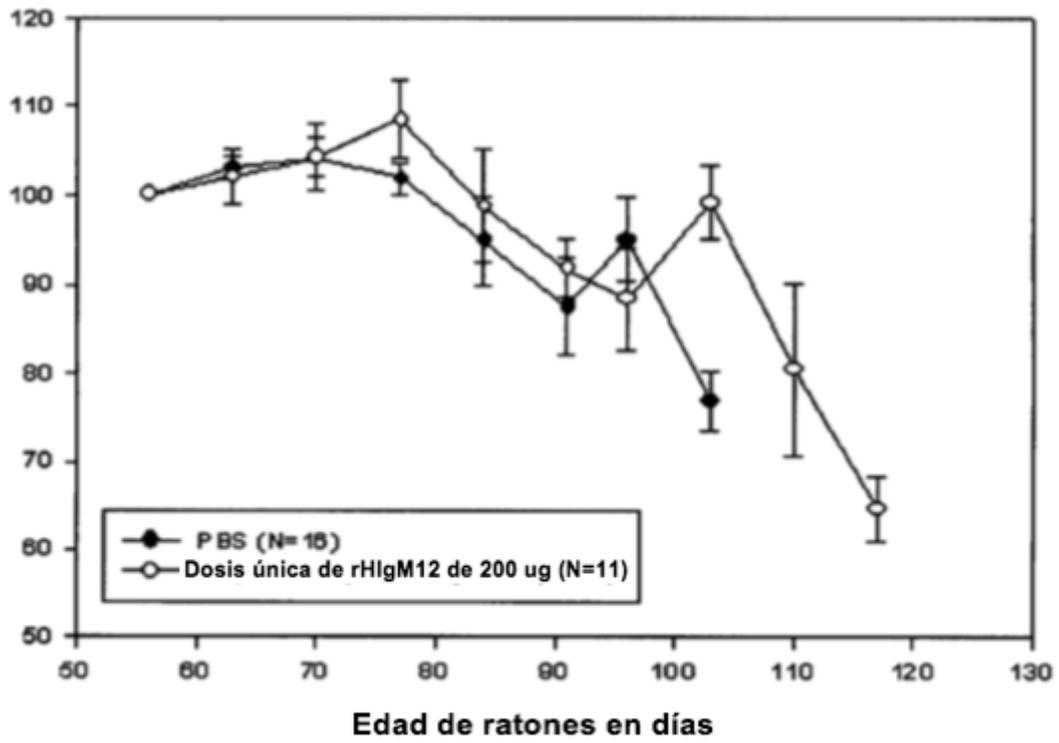


FIGURA 40

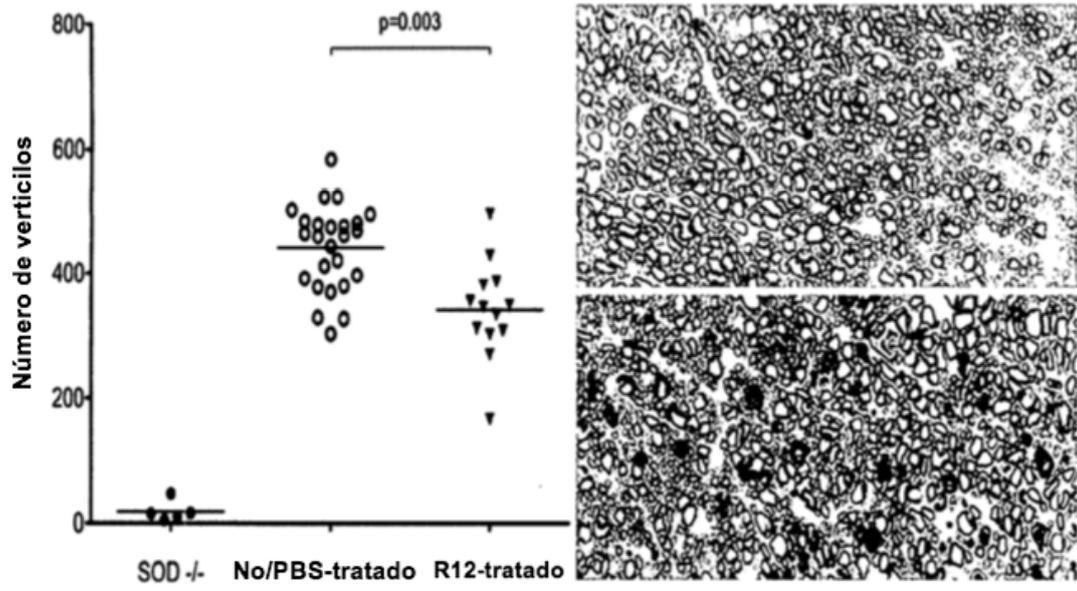


FIGURA 41

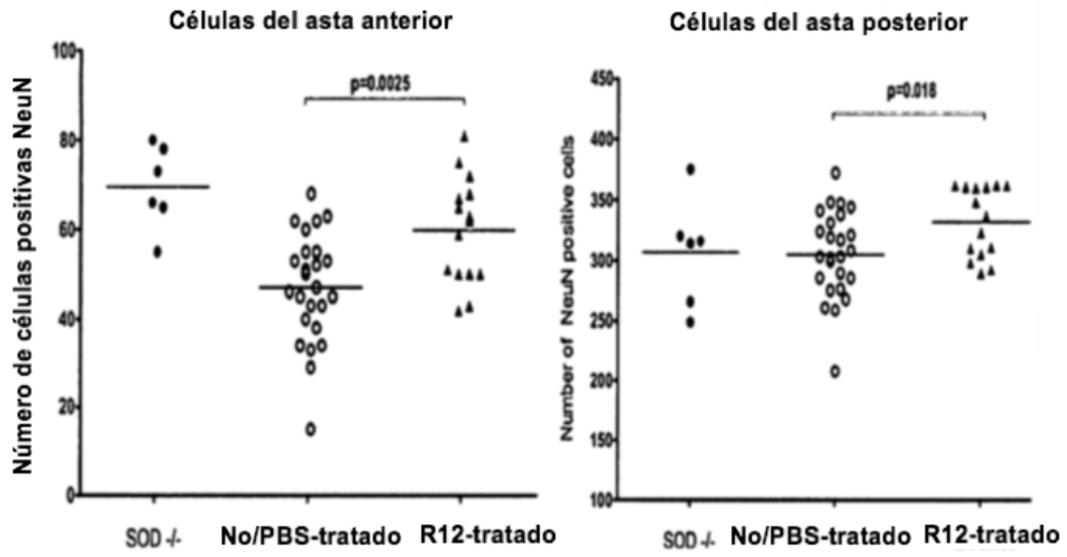


FIGURA 42

