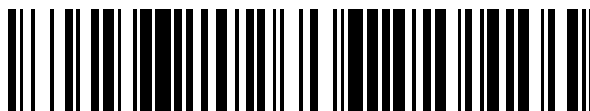


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 725**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01)
A61K 51/10	(2006.01)
C07K 16/18	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
C07B 59/00	(2006.01)
C07K 16/22	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2013 PCT/US2013/023277**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13112922**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2013 E 13703962 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2807192**

54 Título: **Composición y método para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades asociadas con la degeneración de las neuritas**

30 Prioridad:

27.01.2012 US 201261591324 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.07.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MUELLER, BERNHARD;
HUANG, LILI;
BARDWELL, PHILIP D.;
KUTSKOVA, YULIYA y
MEMMOTT, JOHN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 676 725 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición y método para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades asociadas con la degeneración de las neuritas

INFORMACIÓN DE SOLICITUD RELACIONADA

5 Esta solicitud reivindica el beneficio del documento de Estados Unidos con número de serie 61/591.324, presentado el 27 de enero, 2012.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos para tratar y diagnosticar enfermedades asociadas con la degeneración de las neuritas, tales como la esclerosis múltiple.

10 **ANTECEDENTES**

Los primeros estadios de muchas enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por un daño de las neuritas y una función sináptica comprometida. La degeneración de las neuritas conduce frecuentemente a la muerte de células neuronales y puede deteriorar la conducción de señales en los nervios afectados, causando un deterioro de la sensación, el movimiento, la cognición u otras funciones dependiendo de qué nervios estén implicados. La degeneración de las neuritas es también una característica patológica de la esclerosis múltiple ("EM"). La EM es una enfermedad autoinmune, neurodegenerativa que afecta a cerca de 350.000 personas en los Estados Unidos y es una causa importante de discapacidad del sistema nervioso o de muerte en adultos jóvenes. Una afección clínica común en los seres humanos que padecen EM es la formación degenerativa de lesiones neuronales que son el resultado de una degradación extensa de las vainas de mielina que rodean los axones de las neuronas y una degradación eventual de los propios axones. La desmielinización que se produce en la EM se cree que está iniciada por el ataque de enzimas proteasas a tres proteínas neurológicas principales: la proteína básica de mielina (MBP), la proteína proteo-lipídica (PLP) y la glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG). Mecánicamente, la EM es una enfermedad desmielinizante inflamatoria que se debe al menos parcialmente a una respuesta autoinmune frente a los productos de degradación de la mielina. Estudios recientes han destacado el papel de la lesión de neuritas y de axones además de la desmielinización bien conocida y mecanismos inflamatorios.

Generalmente, se diagnostica que los pacientes tienen una enfermedad degenerativa de las neuritas basándose en una combinación del historial del paciente y un examen neurológico, incluyendo la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) del cerebro y la médula espinal, procedimientos de electrodiagnóstico (por ejemplo, pruebas de potencial evocado, tales como potenciales visuales evocados, potenciales auditivos evocados del tronco cerebral o potenciales somatosensoriales evocados) y punción lumbar para buscar evidencias de una síntesis de inmunoglobulinas en el líquido cefalorraquídeo.

En la actualidad no existe una curación de las enfermedades asociadas con la degeneración de las neuritas, de modo que el tratamiento implica normalmente un control de los síntomas y el tratamiento de la frecuencia y la gravedad de las recaídas.

35 El documento de EE.UU. 2011/0135664 A1 describe proteínas que se unen a RGM A, en particular anticuerpos monoclonales y, en particular, versiones humanizadas de los mismos con injertos de CDRs, que tienen la capacidad de unirse a RGM A y evitar la unión de las proteínas RGM al receptor de RGM A y otras proteínas que se unen a RGM A y, por lo tanto, neutralizar la función de RGM A, para uso en el tratamiento de una degeneración de la capa de fibras nerviosas retinales (CFNR). El documento WHO 02/051438 A2 se refiere a la utilización de RGM y sus moduladores y describe anticuerpos policlonales anti-RGM1 y anti-RGM2, así como un anticuerpo monoclonal anti-RGM, F3D4. El documento WO 2004/003150 A2 se refiere a moduladores de la interacción entre RGM y neogenina y también describe un anticuerpo monoclonal anti-RGM, F3D4. Brinks et al. (J Neurosci 24(15):3862-3869, 2004) informan que RGMa inhibía la excrecencia de neuritas entorrinales *in vitro* y dicho efecto inhibitor se suprimía en presencia de un anticuerpo policlonal anti-RGMa.

45 **COMPENDIO DE LA INVENCION**

En un aspecto, la presente invención se dirige a un anticuerpo monoclonal aislado anti-Molécula de Orientación Repulsiva ("RGMa", por sus siglas en inglés). El anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una región determinante de complementariedad (CDR) 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 73. En realizaciones particulares, el anticuerpo comprende un dominio o una región seleccionada a partir de (a) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región de dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, (b) una cadena pesada variable comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, una

- 5 CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera variable que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, (c) una cadena pesada variable que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera variable que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73.
- 10 El anticuerpo puede ser humano. El anticuerpo puede comprender un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina seleccionado a partir del grupo que consiste en un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgG1 humana, un dominio constante de IgE humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana o un dominio constante de IgA humana. El dominio constante de IgG1 humana puede comprender o consistir en SEQ ID NO: 140.
- 15 El anticuerpo puede comprender una región variable pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1.
El anticuerpo aislado puede comprender una región variable ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5.
El anticuerpo aislado comprende un dominio variable ligero que comprende residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 73.
- 20 El anticuerpo aislado comprende un dominio variable pesado que comprende residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
El anticuerpo aislado puede comprender un dominio variable pesado que comprende residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y un dominio variable ligero que comprende residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.
- 25 El anticuerpo aislado puede comprender un agente seleccionado a partir del grupo que consiste en: una molécula de inmuno adhesión, un agente de formación de imágenes y un agente terapéutico. El agente de formación de imágenes puede ser un radiomarcador, una enzima, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador bioluminiscente, un marcador magnético o biotina. El radiomarcador puede ser ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁷⁷Lu, ¹⁶⁶Ho o ¹⁵³Sm.
- 30 El anticuerpo de la invención se puede unir al epítipo de RGMa PCKILKCNSEFWSATSGSHAPAS (hRGMa 47-69) (SEQ ID NO: 79). El anticuerpo que se une al epítipo de RGMa PCKILKCNSEFWSATSGSHAPAS (hRGMa 47-69) (SEQ ID NO: 79) puede comprender un dominio variable pesado que comprende residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y un dominio variable ligero que comprende residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.
- 35 En otro aspecto, la presente invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo descrito en este documento o sus mezclas.
- 40 Además, en este documento se describe un método para tratar, prevenir, modular o atenuar una enfermedad o trastorno asociado con la degeneración de las neuritas, que comprende administrar a un sujeto que lo requiere una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo descrito en este documento. El trastorno degenerativo de las neuritas puede ser esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson; enfermedad de Alzheimer; enfermedad de Huntington; esclerosis lateral amiotrófica y otras enfermedades de las neuronas motoras; enfermedad de Tay-Sachs; enfermedad de Niemann-Pick; enfermedad de Gaucher; síndrome de Hurler; enfermedades desmielinizantes inflamatorias idiopáticas; carencia de vitamina B12; mielolisis pontina central; tabes dorsal; mielitis transversa; enfermedad de Devic, leucoencefalopatía multifocal progresiva; neuritis óptica; lesión traumática en el SNC; ictus cerebral isquémico; una retinopatía; tal como glaucoma, retinopatía diabética o degeneración macular dependiente de la edad; y una leucodistrofia.
- 45 Además, en este documento se describe un método para determinar si un sujeto tiene un trastorno degenerativo de las neuritas. El método puede comprender una medición del nivel de RGMa en una muestra del sujeto; y comparar el nivel de RGMa en la muestra con un control normal. Un nivel alterado de RGMa indica que el sujeto tiene un trastorno degenerativo de las neuritas. Un aumento del nivel de RGMa en comparación con el control normal indica que el sujeto tiene un trastorno degenerativo de las neuritas. La muestra puede ser una muestra de sangre o una muestra de suero o una muestra de líquido cefalorraquídeo. La etapa de medir el nivel de RGMa en una muestra se puede llevar a cabo con un inmunoensayo. El inmunoensayo puede ser un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). El ELISA puede ser un ELISA de tipo sándwich.
- 50
55

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado que comprende SEQ ID NOs: 1-7 y 73.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado que comprende SEQ ID NOs: 1-7 y 73, que se une al epítipo de RGMa PCKILKCNSEFWSATSGSHAPAS (hRGMa 47-69) (SEQ ID NO: 79).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 La Figura 1 muestra los resultados de pruebas de un ensayo de crecimiento de neuritas utilizando 50 µg/ml de un fragmento de hRGMa. Este fragmento incluye los aminoácidos N-terminales 47-127 de SEQ ID NO: 65 (véase SEQ ID NO: 139) y contiene dominios de interacción de neogenina y proteína morfogénica ósea de alta afinidad.
- La Figura 2 muestra los resultados de pruebas de un ensayo de crecimiento de neuritas utilizando 50 µg/ml de hRGMa de longitud completa.
- 10 La Figura 3 muestra un gráfico de barras que refleja el nivel de crecimiento regenerativo *in vivo* de los axones de células ganglionares de la retina de forma perilesional (0-500 µm) en presencia del anticuerpo AE12-1.
- La Figura 4 muestra un gráfico de barras que refleja el nivel de crecimiento regenerativo *in vivo* de los axones de células ganglionares de la retina (500-1000 µm) en presencia del anticuerpo AE12-1 en comparación directa con 5F9.23 humano.
- 15 La Figura 5 muestra espectros de MS procedentes de la fracción E1 reducida de hRGMa de *E. coli* escindida con tripsina/Asp-N con mAb (anticuerpo monoclonal, del inglés "monoclonal Antibody") AE12-1 que muestra los estados de carga +3 y +4 (encuadrados) de dos péptidos correspondientes a las secuencias (SEQ ID NOS 74 y 80, respectivamente, por orden de aparición) mostrados en los espectros. Los picos marcados con * son péptidos que no se podían asignar al antígeno hRGMa y pueden estar relacionados con el anticuerpo.
- 20 La Figura 6 muestra espectros de MS (arriba) y MS/MS (parte inferior) procedentes de la fracción E1 reducida, desnaturalizada de hRGMa, (estructura artificial MYC) con el mAb AE12-1, escindida con tripsina y Asp-N, confirmando la secuencia del péptido escindido como KAGSPCKILKCNSEFWSATSGSHAPAS (SEQ ID NO: 81).
- La Figura 7 muestra espectros de MS (arriba) y MS/MS (parte inferior) procedentes de la fracción E1 reducida, desnaturalizada de hRGMa, (estructura artificial MYC) con el mAb AE12-1, escindida con tripsina y Asp-N, confirmando la secuencia del péptido escindido como AGSPCKILKCNSEFWSATSGSHAPAS (SEQ ID NO: 89).
- 25 La Figura 8 muestra micrografías de lesiones nerviosas en ratas tratadas con un anticuerpo de control (hIgG a 10 mg/kg; véase el panel superior), un anticuerpo AE12-1 a 1 mg/kg (véase el panel central) o un anticuerpo h5F9.23 a 1 mg/kg (véase el panel inferior).
- 30 La Figura 9 muestra los resultados de un análisis del crecimiento de las neuritas de células SH-SY5Y en placas de 96 pocillos recubiertas con fibronectina como sustrato, después del tratamiento con RGMa humana de longitud completa y su neutralización a través de AE12-1 (gráfico de barras de la izquierda) y AE12-1-H (gráfico de barras a la derecha). El anticuerpo y la hRGMa de longitud completa se añadieron al mismo tiempo y, posteriormente, se incubaron los cultivos durante 24 horas.
- 35 La Figura 10 muestra los resultados de un análisis del crecimiento de las neuritas de células SH-SY5Y en placas de 96 pocillos recubiertas con fibronectina como sustrato después del tratamiento con RGMa humana de longitud completa y su neutralización a través de AE12-1-K (gráfico de barras de la izquierda) y AE12-1-F (gráfico de barras a la derecha). El anticuerpo y la hRGMa de longitud completa se añadieron al mismo tiempo y, posteriormente, se incubaron los cultivos durante 24 horas.
- 40 La Figura 11 muestra los resultados de un análisis del crecimiento de las neuritas de células SH-SY5Y en placas de 96 pocillos recubiertas con fibronectina como sustrato después del tratamiento con RGMa humana de longitud completa y su neutralización a través de AE12-1-I (gráfico de barras de la izquierda) y AE12-1-L (gráfico de barras a la derecha). El anticuerpo y la hRGMa de longitud completa se añadieron al mismo tiempo y, posteriormente, se incubaron los cultivos durante 24 horas.
- 45 La Figura 12 muestra los resultados de un análisis del crecimiento de las neuritas de células SH-SY5Y en placas de 96 pocillos recubiertas con fibronectina como sustrato después del tratamiento con RGMa humana de longitud completa y su neutralización a través de AE12-1-V (gráfico de barras de la izquierda) y AE12-1-Y (gráfico de barras a la derecha). El anticuerpo y la hRGMa de longitud completa se añadieron al mismo tiempo y, posteriormente, se incubaron los cultivos durante 24 horas.
- 50 La Figura 13 muestra los resultados de un ensayo de unión de RGMa en células SH-SY5Y y neuronas primarias (HCA, análisis de contenido elevado) utilizando AE12-6, AE12-15 y AE12-23.
- La Figura 14 muestra los resultados de un ensayo de inhibición de la unión de RGMa en células SH-SY5Y (mediante un análisis de contenido elevado (HCA)) utilizando AE12-1y las variantes con cisteína de AE12-1.

La Figura 15 muestra el efecto neutralizante de AE12-1 y AE12-6 sobre la repulsión del crecimiento de neuritas de RGMa en un ensayo de crecimiento de neuritas en neuronas primarias del hipocampo de rata. El anticuerpo r5F9 se utiliza como control.

5 La Figura 16 muestra que tres (3) anticuerpos monoclonales selectivos de RGMa, específicamente, AE12-1, AE12-1Y y h5F9.23, inducen una regeneración masiva de fibras positivas para GAP-43 más allá del sitio de aplastamiento como se describe en el Ejemplo 9. Eje Y = número de haces de axones en el área 0-500 μm más allá del sitio de aplastamiento. *** $p < 0,001$: significación frente a hlgG, ** $p < 0,01$: significación frente a hlgG, * $p < 0,05$: significación frente a IgG humana.

10 La Figura 17 muestra que tres (3) anticuerpos monoclonales selectivos de RGMa, específicamente, AE12-1, AE12-1Y y h5F9.23, aumentan el número de haces axonales de la retina, protegiendo de este modo la capa de fibras nerviosas de la retina. Eje Y = número de haces de fibras en la retina como se describe en el Ejemplo 10. ** $p < 0,01$: significación frente a hlgG, * $p < 0,05$: significación frente a hlgG.

15 La Figura 18 muestra que los mAbs de RGMa AE12-1, AE12-1Y y h5F9.23 aceleran la recuperación funcional en el modelo de tEAE espinal como se describe en el Ejemplo 11. El tratamiento con anticuerpos (iv) se inició aproximadamente una semana después de la inyección de citocinas y se repitió una vez por semana. Las dosis administradas eran de 10 mg/kg. *** $p < 0,001$: significación frente a hlgG, ** $p < 0,01$: significación frente a hlgG, * $p < 0,05$: significación frente a hlgG.

20 La Figura 19 muestra que los mAbs de RGMa AE12-1, AE12-1Y y ABT-207 (h5F9.23) aumentan el área de GAP-43 y MBP y disminuyen la lesión inflamatoria en comparación directa con el anticuerpo de control IgG humana como se describe en el Ejemplo 11. *** $p < 0,001$: significación frente a hlgG, ** $p < 0,01$: significación frente a hlgG, * $p < 0,05$: significación frente a hlgG.

25 La Figura 20 muestra que el mAb de RGMa AE12-1Y-QL aceleraba la recuperación funcional en el modelo de tEAE espinal con tres dosis diferentes de 0,1; 1 y 10 mg/kg administradas una vez por semana por vía intravenosa como se describe en el Ejemplo 11. El tratamiento con anticuerpos (iv) se inició aproximadamente una semana después de la inyección de citocinas y se repitió una vez por semana. *** $p < 0,001$: significación frente a hlgG, ** $p < 0,01$: significación frente a hlgG, * $p < 0,05$: significación frente a hlgG.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

30 Los inventores han descubierto nuevos anticuerpos que se unen a la Molécula de Orientación Repulsiva a ("RGMa") y que se pueden emplear para tratar enfermedades relacionadas con la degeneración de las neuritas. En esta memoria se proporcionan anticuerpos específicos y no específicos que son capaces de atenuar los signos clínicos asociados con enfermedades relacionadas con la degeneración de las neuritas.

1. Definiciones

35 La terminología usada en este documento tiene únicamente el fin de describir realizaciones particulares y no pretende ser limitante. Tal y como se utilizan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

a. Aproximadamente

"Aproximadamente", tal y como se usa en el presente documento, puede referirse a aproximadamente una variación de +/- el 10% del valor indicado. Se ha de entender que una variación de este tipo está siempre incluida en cualquier valor dado proporcionado en el presente documento, se haga o no referencia específica a la misma.

40 b. Anticuerpo madurado por afinidad

45 Un "anticuerpo madurado por afinidad" se usa en el presente documento para referirse a un anticuerpo con una o varias alteraciones en una o varias CDRs, lo que produce una mejora de la afinidad (es decir, K_D , k_d o k_a) del anticuerpo hacia un antígeno diana, en comparación con un anticuerpo parental, que no posee la o las alteraciones. Los anticuerpos madurados por afinidad ejemplares tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares hacia el antígeno diana. Una variedad de procedimientos para la producción de anticuerpos madurados por afinidad se conoce en la técnica, incluyendo el escrutinio de un banco combinatorio de anticuerpos que se ha preparado utilizando la biopresentación. Por ejemplo, Marks et al., *Biotechnology*, 10: 779-783 (1992) describen la maduración por afinidad mediante redistribución de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de residuos de CDR y/o estructurales está descrita por Barbas et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91: 3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene*, 169: 147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.*, 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.*, 154(7): 3310-3319 (1995); y Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992). Una mutación selectiva en posiciones de mutagénesis selectivas y en posiciones de contacto o hipermutación con un residuo de aminoácido que mejora la actividad, se describe en el documento Patente de EE.UU. nº 6.914.128 B1.

c. Anticuerpo y anticuerpos

"Anticuerpo" y "anticuerpos" tal y como se utilizan en el presente documento, se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados (total o parcialmente humanizados), anticuerpos de animales tales como, pero no limitados a, un ave (por ejemplo, un pato o un ganso), un tiburón, una ballena y un mamífero, incluyendo un no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un camello, una llama, un caballo, una cabra, un conejo, una oveja, un hámster, un conejillo de indias, un gato, un perro, una rata, un ratón, etc.) o un primate no humano (por ejemplo, un mono, un chimpancé, etc.), anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, Fv de cadena simple ("scFv"), anticuerpos de dominio único, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos F(ab')₂, anticuerpos ligados por disulfuro Fv ("sdFv") y anti-idiotípicos ("anti-Id"), anticuerpos de dominio doble, anticuerpos de dominio doble variable (DVD) o de dominio triple variable (TVD) (inmunoglobulinas de dominio doble variable y métodos para prepararlas se describen en Wu, C., et al., Nature Biotechnology, 25(11): 1290-1297 (2007) y el documento de Solicitud Internacional PCT WO 2001/058956), y fragmentos que se unen a epítipo funcionalmente activos de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio que se une al analito. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase. Por razones de simplicidad, un anticuerpo contra un analito se denomina con frecuencia en este documento como un "anticuerpo anti-analito," o simplemente un "anticuerpo de analito" (por ejemplo, un anticuerpo anti-RGMa o un anticuerpo de RGMa).

d. Fragmento de anticuerpo

Un "fragmento de anticuerpo" tal y como se utiliza en este documento, se refiere a una porción de un anticuerpo intacto que comprende el sitio de unión a antígeno o la región variable. La porción no incluye los dominios constantes de la cadena pesada (es decir, CH2, CH3 o CH4, dependiendo del isotipo del anticuerpo) de la región Fc del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos Fab'-SH, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fd, fragmentos Fv, diacuerpos, moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), polipéptidos de cadena sencilla que contienen solo un dominio variable de la cadena ligera polipéptidos de cadena sencilla que contienen las tres CDRs del dominio variable de la cadena ligera, polipéptidos de cadena sencilla que contienen solo una región variable de la cadena pesada y polipéptidos de cadena sencilla que contienen las tres CDRs de la región variable de la cadena pesada.

e. Constantes de unión

Las "constantes de unión" se describen en el presente documento. La expresión "constante de la tasa de asociación", "k_{on}" o "k_a" tal y como se emplea en este documento, se refiere al valor que indica la tasa de unión de un anticuerpo con su antígeno diana o la tasa de formación de complejo entre un anticuerpo y un antígeno como se muestra en la siguiente ecuación:



La expresión "constante de la tasa de disociación", "k_{off}" o "k_d" tal y como se usa indistintamente en este documento, se refiere al valor que indica la tasa de disociación de un anticuerpo desde su antígeno diana o la separación de un complejo Ab-Ag a lo largo del tiempo en anticuerpo y antígeno libre como se muestra en la siguiente ecuación:



Los métodos para determinar las constantes de la tasa de asociación y disociación son bien conocidos en la técnica. El uso de técnicas basadas en la fluorescencia ofrece una sensibilidad elevada y la capacidad de examinar muestras en tampones fisiológicos en equilibrio. Otros enfoques experimentales e instrumentos tales como un ensayo BIAcore[®] (análisis de interacción biomolecular) se pueden utilizar (por ejemplo, una instrumentación disponible en BIAcore International AB, una compañía de GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Además, un ensayo KinExA[®] (Ensayo de Exclusión Cinética), disponible en Savidyne Instruments (Boise, Idaho), también se puede utilizar.

La expresión "constante de disociación en equilibrio" o "K_D" tal y como se usa de manera intercambiable, en el presente documento, se refiere al valor obtenido dividiendo la tasa de disociación (k_{off}) por la tasa de asociación (k_{on}). La tasa de asociación, la tasa de disociación y la constante de disociación en equilibrio se utilizan para representar la afinidad de la unión de un anticuerpo con un antígeno.

f. Proteína de unión

"Proteína de unión" se usa en este documento para referirse a una proteína monomérica o multimérica que se une y forma un complejo con un ligando tal como, por ejemplo, un polipéptido, un antígeno, un compuesto químico u otra molécula, o un sustrato de cualquier tipo. Una proteína de unión se une específicamente a un ligando. Las proteínas de unión incluyen anticuerpos, así como fragmentos que se unen a antígeno de los mismos y otras diversas formas y derivados de los mismos como se conocen en la técnica y se describen en el presente documento a continuación, y otras moléculas que comprenden uno o varios dominios de unión a antígeno que se unen a una molécula de antígeno o a un sitio en particular (epítipo) sobre la molécula de antígeno. Por consiguiente, una proteína de unión

incluye, pero no se limita a, un anticuerpo, una inmunoglobulina tetramérica, una molécula de IgG, una molécula de IgG1, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo madurado por afinidad y cualquier fragmento de cualquiera de tales anticuerpos que conservan la capacidad de unirse a un antígeno.

5 **g. Anticuerpo biespecífico**

Un "anticuerpo biespecífico" se utiliza en este documento para referirse a un anticuerpo de longitud completa que se genera por la tecnología de cuadroma (véase, Milstein et al., *Nature*, 30 (5934): 537-540 (1983)), por conjugación química de dos anticuerpos monoclonales diferentes (véase, Staerz et al., *Nature*, 314(6012): 628-631 (1985)) o por botón-en-oyal o enfoques similares, que introducen mutaciones en la región Fc (véase, Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(14): 6444-6448 (1993)), dando como resultado múltiples especies diferentes de inmunoglobulinas de las cuales solo una es el anticuerpo biespecífico funcional. Un anticuerpo biespecífico se une a un antígeno (o epítipo) sobre uno de sus dos brazos de unión (una pareja de HC/LC) y se une a un antígeno diferente (o epítipo) sobre su segundo brazo (una pareja diferente de HC/LC). Con esta definición, un anticuerpo biespecífico tiene dos brazos distintos que se unen a antígeno (tanto en las secuencias de CDRs como en la especificidad) y es monovalente para cada antígeno al que se une.

15 **h. CDR**

"CDR" se utiliza en este documento para referirse a la "región determinante de complementariedad" dentro de una secuencia variable de anticuerpo. Hay tres CDRs en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se designan "CDR1", "CDR2" y "CDR3", para cada una de las regiones variables. La expresión "conjunto de CDRs" tal y como se emplea en este documento, se refiere a un grupo de tres CDRs que se producen en una sola región variable que se une al antígeno. Los límites exactos de estas CDRs se han definido de manera diferente de acuerdo con distintos sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no solo proporciona un sistema preciso de numeración de los residuos, aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites precisos de los residuos que definen las tres CDRs. Estas CDRs se pueden denominar "CDRs de Kabat". Chothia y colaboradores (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987); y Chothia et al., *Nature*, 342: 877-883 (1989)) encontraron que ciertas subporciones dentro de las CDRs de Kabat adoptan conformaciones casi idénticas del esqueleto peptídico, a pesar de tener una gran diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Estas subporciones se designaron "L1", "L2" y "L3" o "H1", "H2" y "H3", en donde la "L" y el "H" designan las regiones de la cadena ligera y de la cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse "CDRs de Chothia", las cuales tienen límites que se solapan con las CDRs de Kabat. Otros límites que definen CDRs que se solapan con las CDRs de Kabat han sido descritos por Padlan, *FASEB J.*, 9: 133-139 (1995), y MacCallum, *J. Mol. Biol.*, 262(5): 732-745 (1996). Sin embargo otras definiciones de límites de CDRs pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas del presente documento, sino que, no obstante, se solapan con las CDRs de Kabat, aunque pueden estar acortadas o alargadas teniendo en cuenta hallazgos previstos o experimentales de que residuos particulares o grupos de residuos o incluso CDRs enteras no afectan significativamente a la unión al antígeno. Los métodos utilizados en el presente documento pueden utilizar CDRs definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque ciertas realizaciones usan CDRs definidas por Kabat o Chothia.

25 **i. Componente o componentes**

"Componente", "componentes" o "al menos un componente," se refieren en general a un anticuerpo de captura, un calibrador de detección o conjugado, un control, un panel de sensibilidad, un recipiente, un tampón, un diluyente, una sal, una enzima, un cofactor para una enzima, un reactivo de detección, un reactivo/solución de pretratamiento, un sustrato (por ejemplo, como una solución), una solución de parada y similares, que pueden estar incluidos en un kit para el ensayo de una muestra de una prueba, tal como una muestra de orina, de suero o de plasma de un paciente, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento y otros métodos conocidos en la técnica. Algunos componentes pueden estar en solución o liofilizado para una reconstitución para uso en un ensayo.

35 **j. Consenso o secuencia de consenso**

"Consenso" o "secuencia de consenso" tal y como se emplea en este documento, se refiere a una secuencia sintética de ácido nucleico o una secuencia polipeptídica correspondiente, construida basándose en el análisis de una alineación de múltiples subtipos de un antígeno particular. La secuencia se puede usar para inducir una amplia inmunidad contra múltiples subtipos o serotipos de un antígeno particular. Antígenos sintéticos, tales como proteínas de fusión, pueden ser manipulados para que sean secuencias de consenso (o antígenos de consenso).

40 **k. Control**

55 "Control" tal y como se emplea en este documento, se refiere a una composición conocida por no contener un analito de interés ("negativo"), por ejemplo, RGMa (tal como RGMa asociada a una membrana, RGMa soluble, fragmentos de RGMa asociada a membrana, fragmentos de RGMa soluble, variantes de RGMa (RGMa asociada a una mem-

brana o soluble) o cualquiera de sus combinaciones) o por contener un analito de interés ("control positivo"), por ejemplo, RGMA (tal como RGMA asociada a una membrana, RGMA soluble, fragmentos de RGMA asociada a una membrana, fragmentos de RGMA soluble, variantes de RGMA (RGMA asociada a una membrana o soluble) o cualquiera de sus combinaciones). Un control positivo puede comprender una concentración conocida de RGMA. "Control", "control positivo" y "calibrador" pueden utilizarse de forma intercambiable en este documento para referirse a una composición que comprende una concentración conocida de RGMA. Un "control positivo" se puede utilizar para establecer las características de rendimiento del ensayo y es un indicador útil de la integridad de los reactivos (por ejemplo, los analitos). Un "control normal" puede referirse a una muestra o a un sujeto que está exento de una enfermedad o trastorno relacionado con el hierro.

10 I. Derivado

"Derivado" de un anticuerpo tal y como se usa en el presente documento, puede referirse a un anticuerpo que tiene una o varias modificaciones en su secuencia de aminoácidos cuando se compara con un anticuerpo genuino o parental y muestra una estructura de dominio modificado. El derivado todavía puede ser capaz de adoptar la configuración típica de dominio que se encuentra en los anticuerpos naturales, así como una secuencia de aminoácidos, que es capaz de unirse a dianas (antígenos) con especificidad. Ejemplos típicos de derivados de anticuerpos son los anticuerpos acoplados a otros polipéptidos, dominios de anticuerpos reordenados o fragmentos de anticuerpos. El derivado también puede comprender al menos un compuesto adicional, por ejemplo, un dominio de proteína, en donde dicho dominio de proteína está unido por enlaces covalentes o no covalentes. La unión puede basarse en una fusión genética según los métodos conocidos en la técnica. El dominio adicional presente en la proteína de fusión que comprende el anticuerpo empleado de acuerdo con la invención, puede estar ligado preferentemente por un enlazador flexible, ventajosamente, un enlazador peptídico, en donde dicho enlazador peptídico comprende aminoácidos plurales, hidrofílicos, unidos a péptidos, con una longitud suficiente para incluir la distancia entre el extremo C-terminal del dominio proteico adicional y el extremo N-terminal del anticuerpo o viceversa. El anticuerpo puede estar ligado a una molécula efectora que tiene una conformación adecuada para una actividad biológica o una unión selectiva a un soporte sólido, una sustancia biológicamente activa (por ejemplo, una citocina o una hormona de crecimiento), un agente químico, un péptido, una proteína o un fármaco, por ejemplo.

m. Anticuerpo de doble especificidad

"Anticuerpo de doble especificidad" se utiliza en este documento para referirse a un anticuerpo de longitud completa que se puede unir a dos antígenos diferentes (o epítomos) en cada uno de sus dos brazos de unión (una pareja de HC/LC) (véase el documento de publicación PCT WO 02/02773). De acuerdo con ello, una proteína de unión específica doble tiene dos brazos idénticos que se unen a antígeno, con especificidad idéntica y secuencias de CDRs idénticas, y es bivalente para cada antígeno al que se une.

n. Dominio variable doble

"Dominio variable doble" se utiliza en este documento para referirse a dos o más sitios de unión a antígeno en una proteína de unión, que pueden ser divalentes (dos sitios de unión a antígeno), tetravalentes (cuatro sitios de unión a antígeno) o proteínas de unión multivalentes. Los DVDs pueden ser monoespecíficos, es decir, capaces de unirse a un antígeno (o un epítomo específico) o multispecíficos, es decir, capaces de unirse a dos o más antígenos (es decir, dos o más epítomos de la misma molécula de antígeno diana o dos o más epítomos de diferentes antígenos diana). Una proteína que se une a DVD preferida comprende dos polipéptidos de DVD de cadena pesada y dos polipéptidos de DVD de cadena ligera y se denomina una "inmunoglobulina DVD" o "Ig DVD". Una proteína de unión a Ig DVD de este tipo es, por tanto, tetramérica y una reminiscencia de una molécula de IgG, pero proporciona más sitios de unión a antígeno que una molécula de IgG. Por tanto, cada mitad de una molécula de Ig DVD tetramérica es una reminiscencia de una mitad de una molécula de IgG y comprende un polipéptido DVD de cadena pesada y un polipéptido DVD de cadena ligera pero, a diferencia de una pareja de cadenas pesadas y ligeras de una molécula de IgG que proporciona un dominio de unión a antígeno único, una pareja de cadenas pesadas y ligeras de una Ig DVD proporciona dos o más sitios de unión a antígeno.

Cada sitio de unión a antígeno de una proteína de unión Ig DVD se puede obtener a partir de un anticuerpo monoclonal donante ("parental") y por lo tanto comprende un dominio variable de la cadena pesada variable (VH) y un dominio variable de la cadena ligera (VL) con un total de seis CDRs implicadas en la unión al antígeno por cada sitio de unión a antígeno. Por consiguiente, una proteína de unión a Ig DVD que se une a dos epítomos diferentes (es decir, dos epítomos diferentes de dos moléculas de antígeno diferentes o dos epítomos diferentes de la misma molécula de antígeno) comprende un sitio de unión a antígeno obtenido a partir de un primer anticuerpo monoclonal parental y un sitio de unión a antígeno de un segundo anticuerpo monoclonal parental.

Una descripción del diseño, la expresión y la caracterización de moléculas de unión a Ig DVD se proporciona en el documento de publicación PCT n° WO 2007/024715, la patente de EE.UU. n° 7.612.181 y Wu et al., Nature Biotech, 25: 1290-1297 (2007). Un ejemplo preferido de tales moléculas de Ig DVD comprende una cadena pesada que comprende la fórmula estructural VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n, en donde VD1 es un primer dominio variable de la cadena pesada, VD2 es un segundo dominio variable de la cadena pesada, C es un dominio constante de la cadena pesada, X1 es un enlazador con la condición de que no sea CH1, X2 es una región Fc y n es 0 o 1, pero preferiblemente

1; y una cadena ligera que comprende la fórmula estructural $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, en donde VD1 es un primer dominio variable de la cadena ligera, VD2 es un segundo dominio variable de la cadena ligera, C es un dominio constante de la cadena ligera, X1 es un enlazador con la condición de que no sea CH1, X2 no comprende una región Fc; y n es 0 o 1, pero preferiblemente 1. Una Ig DVD de este tipo puede comprender dos cadenas pesadas de este tipo y dos cadenas ligeras de este tipo, en donde cada cadena comprende dominios variables unidos en tándem sin una región constante intercalada entre las regiones variables, en donde una cadena pesada y una cadena ligera se asocian para formar sitios de unión a antígeno funcionales en tándem y una pareja de cadenas pesadas y ligeras se puede asociar con otra pareja de cadenas pesadas y ligeras para formar una proteína de unión tetramérica con cuatro sitios funcionales de unión a antígeno. En otro ejemplo, una molécula de Ig DVD puede comprender cadenas pesadas y ligeras que comprenden cada una tres dominios variables (VD1, VD2, VD3) unidos en tándem sin una región constante intercalada entre los dominios variables, en donde una pareja de cadenas pesadas y ligeras se puede asociar para formar tres sitios de unión a antígeno, y en donde una pareja de cadenas pesadas y ligeras se puede asociar con otra pareja de cadenas pesadas y ligeras para formar una proteína de unión tetramérica con seis sitios de unión a antígeno.

En una realización preferida, una proteína de unión Ig DVD de acuerdo con la invención no solo se une a las mismas moléculas diana a las que se unen sus anticuerpos monoclonales parentales, sino que también posee una o varias propiedades deseables de uno o varios de sus anticuerpos monoclonales parentales. Preferiblemente, una propiedad adicional de este tipo es un parámetro de anticuerpo de uno o varios de los anticuerpos monoclonales parentales. Los parámetros de anticuerpo que se pueden aportar a una proteína de unión Ig DVD procedente de uno o varios de sus anticuerpos monoclonales parentales, incluyen, pero no se limitan a, la especificidad del antígeno, la afinidad del antígeno, la potencia, la función biológica, el reconocimiento del epítipo, la estabilidad de la proteína, la solubilidad de la proteína, la eficacia de la producción, la inmunogenicidad, la farmacocinética, la biodisponibilidad, la reactividad cruzada tisular y la unión a antígenos ortólogos.

Una proteína de unión a Ig DVD se une al menos a un epítipo de RGMA. Ejemplos no limitantes de una proteína de unión a Ig DVD incluyen una proteína de unión a Ig DVD que se une a uno o varios epítopos de RGMA, una proteína de unión a Ig DVD que se une a un epítipo de una RGMA humana y un epítipo de una RGMA de otra especie (por ejemplo, ratón) y una proteína de unión a Ig DVD que se une a un epítipo de una RGMA humana y un epítipo de otra molécula diana (por ejemplo, VEGFR2 o VEGFR1).

o. Epítipo o epítopos

"Epítipo" o "epítopos" o "epítopos de interés" se refieren a uno o varios sitios sobre cualquier molécula que reconocen y se pueden unir a uno o varios sitios complementarios sobre su ligando específico. La molécula y un ligando específico forman parte de una pareja de unión específica. Por ejemplo, un epítipo puede estar sobre un polipéptido, una proteína, un hapteno, un antígeno de hidrato de carbono (tal como, pero no limitados a, glicolípidos, glicoproteínas o lipopolisacáridos) o un polisacárido. Su ligando específico puede ser, pero no se limita a, un anticuerpo.

p. Región estructural o secuencia estructural

"Región estructural" (FR) o "secuencia estructural" tal y como se usa en el presente documento, puede significar las secuencias restantes de una región variable menos las CDRs. Debido a que la definición exacta de una secuencia de CDR se puede determinar por diferentes sistemas (por ejemplo, véase más arriba), el significado de una secuencia estructural está sujeta correspondientemente a diferentes interpretaciones. Las seis CDRs (CDR-L1, -L2 y -L3 de la cadena ligera y CDR-H1, -H2 y -H3 de la cadena pesada) también dividen las regiones estructurales en la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en donde CDR1 se coloca entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región estructural, como se indica por otros, representa las FRs combinadas dentro de la región variable de una sola cadena de inmunoglobulina, de origen natural. Tal y como se emplea en este documento, una FR representa una de las cuatro subregiones y FRs representa dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región estructural.

De las secuencias de FRs de la cadena pesada y la cadena ligera humana se conoce en la técnica que se pueden utilizar como secuencias estructurales "aceptoras" de la cadena pesada y la cadena ligera (o simplemente, secuencias "aceptoras") para humanizar un anticuerpo no humano usando métodos conocidos en la técnica. En una realización, las secuencias aceptoras de la cadena pesada y de la cadena ligera humana se seleccionan a partir de las secuencias estructurales indicadas en bases de datos disponibles públicamente, tales como V-base (hypertext transfer protocol://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/) o en el sistema de información internacional ImMunoGeneTics® (IMGT®) (hypertext transfer protocol://imgt.cines.fr/texts/IMGTrepertoire/LocusGenes/).

q. Sitio funcional de unión al antígeno

"Sitio funcional de unión al antígeno" tal y como se usa en el presente documento, puede significar un sitio sobre una

proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) que es capaz de unirse a un antígeno diana. La afinidad de la unión al antígeno del sitio de unión a antígeno puede no ser tan fuerte como el de la proteína de unión parental, por ejemplo, el anticuerpo parental, a partir del que se obtiene el sitio de unión al antígeno, pero la capacidad de unión al antígeno debe ser medible usando uno cualquiera entre una variedad de métodos conocidos para la evaluación de una proteína, por ejemplo, un anticuerpo, que se une a un antígeno. Por otra parte, la afinidad de la unión al antígeno de cada uno de los sitios de unión a antígeno de una proteína multivalente, por ejemplo, un anticuerpo multivalente, en el presente documento no tiene que ser cuantitativamente la misma.

r. Anticuerpo humano

"Anticuerpo humano", tal y como se usa en el presente documento puede incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes obtenidas a partir de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal y como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDRs obtenidas a partir de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertadas sobre secuencias estructurales humanas.

s. Anticuerpo humanizado

"Anticuerpo humanizado" se usa en el presente documento para describir un anticuerpo que comprende secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una especie no humana (por ejemplo, un ratón) pero en el que al menos una porción de la secuencia de VH y/o VL ha sido alterada para ser más "similar a la humana", es decir, más similar a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo o una variante, un derivado, un análogo o un fragmento del mismo, que se une inmuno específicamente a un antígeno de interés y que comprende una región estructural (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Tal y como se utiliza en este documento, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de al menos uno y normalmente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDRs corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, un anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales son las de una secuencia de consenso de una inmunoglobulina humana. En una realización, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de una inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene la cadena ligera, así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena ligera humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena pesada humanizada. En realizaciones específicas, un anticuerpo humanizado solo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o de una cadena pesada humanizada.

Un anticuerpo humanizado se puede seleccionar a partir de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE y cualquier isotipo, incluyendo, sin limitación IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Un anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo y, en particular, se pueden seleccionar dominios constantes para optimizar las funciones efectoras deseadas usando métodos bien conocidos en la técnica.

Las regiones estructurales y las CDRs de un anticuerpo humanizado no tienen que corresponderse exactamente con las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR del anticuerpo donante o la región estructural de consenso pueden estar mutagenizadas mediante sustitución, inserción y/o delección de al menos un residuo de aminoácido, de manera que el residuo de la CDR o la región estructural en ese sitio no se corresponde con el del anticuerpo donante o la región estructural de consenso. En una realización preferida, tales mutaciones, sin embargo, no serán extensas. Por lo general, al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% y lo más preferiblemente al menos 95% de los residuos del anticuerpo humanizado se corresponden con los de las secuencias de FRs y CDRs parentales. Tal como se utiliza en este documento, la expresión "región estructural de consenso" se refiere a la región estructural en la secuencia de consenso de la inmunoglobulina. Tal y como se utiliza en este documento, la expresión "secuencia de consenso de una inmunoglobulina" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que se presentan más frecuentemente en una familia de secuencias de inmunoglobulinas relacionadas (véase, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987)). Una "secuencia de consenso de inmunoglobulina" puede comprender por tanto una o varias "regiones estructurales de consenso" y/o "CDRs de consenso". En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia de consenso está ocupada por el aminoácido que se presenta con más frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos se presentan con igual frecuencia, ambos se pueden incluir en la secuencia de consenso.

t. Idéntico o identidad

"Idéntico" o "identidad", tal y como se emplea en este documento, en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos o polinucleótidos, puede significar que las secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos que son iguales sobre una región especificada. El porcentaje se puede calcular mediante una alineación de manera óptima de las dos secuencias, la comparación de las dos secuencias sobre la región especificada, determinando el número de posiciones en las que el residuo idéntico se presenta en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la región especificada y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de la secuencia. En casos en los que las dos secuencias tienen longitudes diferentes o la alineación produce uno o varios extremos escalonados y la región especificada de la comparación incluye solo una secuencia sencilla, los residuos de la secuencia sencilla se incluyen en el denominador pero no en el numerador del cálculo.

u. Polinucleótido aislado

"Polinucleótido aislado" tal y como se usa en el presente documento, puede significar un polinucleótido (por ejemplo, de origen genómico, ADNc o sintético, o una combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, el polinucleótido aislado no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido con el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza; está ligado funcionalmente a un polinucleótido al que no está ligado en la naturaleza; o no se presenta en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

v. Marcador y marcador detectable

"Marcador" y "marcador detectable", tal y como se usan en el presente documento se refieren a un resto fijado a un anticuerpo o un analito para que la reacción entre el anticuerpo y el analito sea detectable y el anticuerpo o el analito marcado de este modo se denomina "marcado de manera detectable". Un marcador puede producir una señal que es detectable por medios visuales o instrumentales. Diversos marcadores incluyen sustancias productoras de señal, tales como cromógenos, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, compuestos radiactivos y similares. Ejemplos representativos de marcadores incluyen restos que producen luz, por ejemplo, compuestos de acridinio y restos que producen fluorescencia, por ejemplo, fluoresceína. Otros marcadores se describen en este documento. A este respecto, el resto en sí, puede no ser detectable pero puede llegar a ser detectable tras la reacción con otro resto adicional. El uso de la expresión "marcado de manera detectable" se entiende que incluye tales formas de marcar.

Se puede emplear cualquier marcador detectable adecuado como se conoce en la técnica. Por ejemplo, el marcador detectable puede ser un marcador radiactivo (tal como ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P y ^{33}P), un marcador enzimático (como peroxidasa de rábano picante, peroxidasa alcalina, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y similares), un marcador quimioluminiscente (por ejemplo, ésteres de acridinio, tioésteres o sulfonamidas; luminol, isoluminol, ésteres de fenantridinio y similares), un marcador fluorescente (tal como fluoresceína (por ejemplo, 5-fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 3'6-carboxifluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, 6-hexacloro-fluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína y similares)), rodamina, ficobiliproteínas, R-ficoeritrina, puntos cuánticos (por ejemplo, seleniuro de cadmio coronado con sulfuro de zinc), un marcador termométrico o un marcador de la reacción en cadena de inmuno-polimerasa. Una introducción a los marcadores, los procedimientos para marcar y la detección de marcadores se encuentra en Polak y Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry*, 2ª ed., Springer Verlag, N.Y. (1997), y en Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1996), que es un manual combinado y el catálogo publicado por Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon. Un marcador fluorescente se puede utilizar en FPIA (véase, por ejemplo, los documentos de Patente de EE.UU. nº 5.593.896, 5.573.904, 5.496.925, 5.359.093 y 5.352.803).

Un compuesto de acridinio se puede utilizar como marcador detectable en un ensayo de quimioluminiscencia homogéneo (véase, por ejemplo, Adamczyk et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 1324-1328 (2006); Adamczyk et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4: 2313-2317 (2004); Adamczyk et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 3917-3921 (2004); y Adamczyk et al., *Org. Lett.* 5: 3779-3782 (2003)).

En un aspecto, el compuesto de acridinio es una acridinio-9-carboxamida. Los métodos para preparar acridinio 9-carboxamidas se describen en Mattingly, *J. Biolumin. Chemilumin.* 6: 107-114 (1991); Adamczyk et al., *J. Org. Chem.* 63: 5636-5639 (1998); Adamczyk et al., *Tetrahedron* 55: 10899-10914 (1999); Adamczyk et al., *Org. Lett.* 1: 779-781 (1999); Adamczyk et al., *Bioconjugate Chem.* 11: 714-724 (2000); Mattingly et al., *In Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications*; Dyke, K. V. Ed; CRC Press: Boca Raton, pp. 77-105 (2002); Adamczyk et al., *Org. Lett.* 5: 3779-3782 (2003); y los documentos de Pat. de EE.UU. nº 5.468.646, 5.543.524 y 5.783.699.

Otro ejemplo de un compuesto de acridinio es un éster arílico de acridinio-9-carboxilato. Un ejemplo de un éster arílico de acridinio-9-carboxilato de fórmula II es fluorosulfonato de 10-metil-9-(fenoxicarbonil)acridinio (disponible en Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Los métodos para preparar ésteres arílicos de acridinio-9-carboxilato se describen en McCapra et al., *Photochem. Photobiol.* 4: 1111-21 (1965); Razavi et al., *Luminescence* 15: 245-249 (2000); Razavi et al., *Luminescence* 15: 239-244 (2000); y el documento de Pat. de EE.UU. nº 5.241.070.

Los ésteres arílicos de acridinio-9-carboxilato de este tipo son indicadores quimioluminiscentes eficaces para el peróxido de hidrógeno producido en la oxidación de un analito por al menos una oxidasa, en términos de intensidad

de la señal y/o rapidez de la señal. El curso de la emisión quimioluminiscente del éster arílico de acridinio-9-carboxilato se completa rápidamente, es decir, en menos de 1 segundo, mientras que la emisión quimioluminiscente de acridinio-9-carboxamida se extiende durante más de 2 segundos. El éster arílico de acridinio-9-carboxilato, sin embargo, pierde sus propiedades quimioluminiscentes en presencia de proteína. Por lo tanto, su uso requiere la ausencia de proteínas durante la generación de la señal y la detección. Los métodos para separar o eliminar las proteínas en la muestra son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a ultrafiltración, extracción, precipitación, diálisis, cromatografía y/o digestión (véase, p. ej., Wells, High Throughput Bioanalytical Sample Preparation. Methods and Automation Strategies, Elsevier (2003)). La cantidad de proteína eliminada o separada de la muestra del ensayo puede ser de aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90% o aproximadamente el 95%. Otros detalles con respecto al éster arílico de acridinio-9-carboxilato y su uso se exponen en el documento de Pat. de EE.UU. n° 11/697.835, presentada el 9 de abril de 2007. Los ésteres arílicos de acridinio-9-carboxilato se pueden disolver en cualquier disolvente adecuado, tal como *N,N*-dimetilformamida (DMF) desgasificada anhidro o colato de sodio acuoso.

w. Secuencia enlazadora y secuencia peptídica enlazadora

"Secuencia enlazadora" o "secuencia peptídica enlazadora" se refiere a una secuencia polipeptídica natural o artificial que está conectada a una o varias secuencias de polipéptidos de interés (por ejemplo, de longitud completa, fragmentos, etc.). El término "conectada" se refiere a la unión de la secuencia enlazadora con la secuencia polipeptídica de interés. Tales secuencias de polipéptidos se unen preferiblemente mediante uno o varios enlaces peptídicos. Las secuencias enlazadoras pueden tener una longitud de aproximadamente 4 a aproximadamente 50 aminoácidos. Preferiblemente, la longitud de la secuencia enlazadora es de aproximadamente 6 a aproximadamente 30 aminoácidos. Las secuencias enlazadoras naturales se pueden modificar mediante sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos para crear secuencias enlazadoras artificiales. Las secuencias enlazadoras a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: (i) marcadores de histidina (His), tal como un marcador 6X His (SEQ ID NO: 148), que tiene una secuencia de aminoácidos de HHHHHH (SEQ ID NO: 148), son útiles como secuencias enlazadoras para facilitar el aislamiento y la purificación de polipéptidos y anticuerpos de interés; (ii) sitios de escisión de enterocinasas, como los marcadores His, se utilizan en el aislamiento y la purificación de proteínas y anticuerpos de interés. A menudo, los sitios de escisión de enterocinasas se utilizan junto con marcadores His en el aislamiento y la purificación de proteínas y anticuerpos de interés. Diversos sitios de escisión de enterocinasas se conocen en la técnica. Ejemplos de sitios de escisión de enterocinasas incluyen, pero no se limitan a, la secuencia de aminoácidos de DDDDK (SEQ ID NO: 149) y derivados de la misma (por ejemplo, ADDDDK (SEQ ID NO: 150), etc.); (iii) secuencias variadas se pueden usar para enlazar o conectar las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera de fragmentos de la región variable de una cadena sencilla. Ejemplos de otras secuencias enlazadoras se pueden encontrar en Bird et al., Science 242: 423-426 (1988); Huston et al., PNAS USA 85: 5879-5883 (1988); y McCafferty et al., Nature 348: 552-554 (1990). Las secuencias enlazadoras también se pueden modificar para funciones adicionales, tales como la fijación de fármacos o la fijación a soportes sólidos. En el contexto de la presente descripción, el anticuerpo monoclonal, por ejemplo, puede contener una secuencia enlazadora, tal como un marcador His, un sitio de escisión de enterocinasa o ambos.

x. Proteína de unión multivalente

"Proteína de unión multivalente" se utiliza en este documento para referirse a una proteína de unión que comprende dos o más sitios que se unen a antígeno (también denominados en este documento "dominios de unión a antígeno"). Una proteína de unión multivalente está diseñada preferiblemente para tener tres o más sitios de unión a antígeno y generalmente no es un anticuerpo de origen natural. La expresión "proteína de unión multispecifica" se refiere a una proteína de unión que se puede unir a dos dianas o más relacionadas o no relacionadas, incluyendo una proteína de unión capaz de unirse a dos o más epítopos diferentes de la misma molécula diana.

y. Punto de corte predeterminado y nivel predeterminado

"Punto de corte predeterminado" y "nivel predeterminado" se refieren en general a un valor de punto de corte del ensayo que se utiliza para evaluar los resultados de la eficacia del diagnóstico/pronóstico/terapéutica mediante una comparación de los resultados del ensayo frente al punto de corte/nivel predeterminado, en donde el punto de corte/nivel predeterminado ya se han relacionado o asociado con varios parámetros clínicos (por ejemplo, gravedad de la enfermedad, progresión/no progresión/mejora, etc.). La presente descripción proporciona niveles predeterminados ejemplares. Sin embargo, es bien sabido que los valores de punto de corte pueden variar dependiendo de la naturaleza del inmunoensayo (por ejemplo, anticuerpos empleados, etc.). Además dentro de la experiencia habitual de un experto en la técnica está el adaptar la descripción de este documento a otros inmunoensayos para obtener valores de punto de corte del inmunoensayo para esos otros inmunoensayos basándose en esta descripción. Considerando que el valor preciso del punto de corte/nivel predeterminado puede variar entre los ensayos, las correlaciones tal y como se describen en el presente documento se deben poder aplicar en general.

z. Reactivo de pretratamiento

"Reactivo de pretratamiento", por ejemplo, reactivo de lisis, precipitación y/o solubilización, tal como se utiliza en un ensayo de diagnóstico como se describe en el presente documento, es uno que lisa cualquier célula y/o solubiliza cualquier analito que está presente en una muestra del ensayo. El pretratamiento no es necesario para todas las muestras, como se describe adicionalmente en este documento. Entre otras cosas, solubilizar el analito (es decir, RGMa (como una RGMa asociada a la membrana, RGMa soluble, fragmentos de RGMa asociada a la membrana, fragmentos de RGMa soluble, variantes de RGMa (RGMa asociada a la membrana o soluble) o cualquiera de sus combinaciones)) implica la liberación del analito desde cualquiera de las proteínas de unión endógenas presentes en la muestra. Un reactivo de pretratamiento puede ser homogéneo (que no requiere una etapa de separación) o heterogéneo (que requiere una etapa de separación). Con el uso de un reactivo de pretratamiento heterogéneo hay una eliminación de cualquier proteína unida a un analito precipitada desde la muestra del ensayo antes de proceder a la siguiente etapa del ensayo. El reactivo de pretratamiento puede comprender opcionalmente: (a) uno o varios disolventes y una sal, (b) uno o varios disolventes, sal y detergente, (c) detergente, (d) detergente y sal o (e) cualquier reactivo o combinación de reactivos apropiada para la lisis celular y/o la solubilización del analito.

aa. Reactivos de control de calidad

"Reactivos de control de calidad" en el contexto de los inmunoensayos y kits descritos en este documento, incluyen, pero no se limitan a, calibradores, controles y paneles de sensibilidad. Un "calibrador" o "patrón" se utiliza normalmente (por ejemplo, uno o varios, tal como una pluralidad) con el fin de establecer curvas de calibración (estándar) para la interpolación de la concentración de un analito, tal como un anticuerpo o un analito. Alternativamente, un solo calibrador, que está cerca de un punto de corte positivo/negativo predeterminado, se puede utilizar. Múltiples calibradores (es decir, más de un calibrador o una cantidad variable de calibrador(es)) se pueden utilizar en conjunción con el fin de comprender un "panel de sensibilidad."

bb. Anticuerpo recombinante y anticuerpos recombinantes

"Anticuerpo recombinante" y "anticuerpos recombinantes" se refieren a anticuerpos preparados mediante una o varias etapas, incluyendo la clonación de secuencias de ácidos nucleicos que codifican la totalidad o una parte de uno o varios anticuerpos monoclonales en un vector de expresión apropiado, por técnicas recombinantes y, posteriormente, la expresión del anticuerpo en una célula hospedadora apropiada. Los términos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales producidos de forma recombinante, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados (total o parcialmente humanizados), estructuras multiespecíficas o multivalentes formadas a partir de fragmentos de anticuerpos, anticuerpos bifuncionales, Abs heteroconjugados, Ig DVD[®]s y otros anticuerpos como se describen en (i) en el presente documento. (Inmunoglobulinas de dominio variable doble y métodos para prepararlas se describen en Wu, C., et al., Nature Biotechnology, 25: 1290-1297 (2007)). La expresión "anticuerpo bifuncional", tal y como se emplea en este documento, se refiere a un anticuerpo que comprende un primer brazo que tiene una especificidad para un sitio antigénico y un segundo brazo que tiene una especificidad para un sitio antigénico diferente, es decir, los anticuerpos bifuncionales tienen doble especificidad.

cc. Muestra, muestra del ensayo y muestra de paciente

"Muestra", "muestra del ensayo" y "muestra de paciente" se pueden usar indistintamente en el presente documento. La muestra, tal como una muestra de orina, suero, plasma, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, células o tejido de la placenta, células endoteliales, leucocitos o monocitos, se puede utilizar directamente tal y como se obtiene a partir de un paciente o se puede tratar previamente, tal como por filtración, destilación, extracción, concentración, centrifugación, inactivación de componentes que interfieren, adición de reactivos y formas similares, para modificar el carácter de la muestra de alguna de las maneras que se han descrito en el presente documento o de otra manera tal y como se conoce en la técnica.

dd. Serie de calibración de composiciones

"Serie de calibración de composiciones" se refiere a una pluralidad de composiciones que comprenden una concentración conocida de Cys-CRGMa, en donde cada una de las composiciones se diferencia de las otras composiciones de la serie por la concentración de Cys-CRGMa.

ee. Fase sólida

"Fase sólida" se refiere a cualquier material que es insoluble o que se puede hacer insoluble mediante una reacción posterior. La fase sólida se puede elegir por su capacidad intrínseca para atraer e inmovilizar un agente de captura. Alternativamente, la fase sólida puede haber fijado sobre la misma un agente enlazador que tiene la capacidad de atraer e inmovilizar al agente de captura. El agente enlazador puede incluir, por ejemplo, una sustancia cargada que está cargada opuestamente con respecto al agente de captura en sí o una sustancia cargada conjugada con el agente de captura. En general, el agente enlazador puede ser cualquier ligando (preferiblemente específico) que está inmovilizado sobre (fijado a) la fase sólida y que tiene la capacidad de inmovilizar al agente de captura a través de una reacción de unión. El agente enlazador permite la unión indirecta del agente de captura a un material en fase sólida antes de la realización del ensayo o durante la realización del ensayo. La fase sólida puede ser, por ejemplo, plástico, plástico derivatizado, metal magnético o no magnético, vidrio o silicio, incluyendo, por ejemplo, un tubo de ensayo, un pocillo de microtitulación, una lámina, una perla, una micropartícula, un chip y otras configuraciones

conocidas por los expertos ordinarios en la técnica.

ff. Unión específica

"Unión específica" o "uniendo específicamente", tal y como se usa en el presente documento, puede referirse a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, en donde la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o un epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de a las proteínas en general. Si un anticuerpo es específico de un epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre, no marcado), en una reacción que contiene el marcador "A" y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

gg. Ligando específico

"Ligando específico" es un miembro de una pareja de unión específica. Una pareja de unión específica comprende dos moléculas diferentes, que se unen específicamente entre sí a través de medios químicos o físicos. Por lo tanto, además de las parejas de unión específicas de antígeno y anticuerpo de los inmunoensayos comunes, otras parejas de unión específica pueden incluir biotina y avidina (o estreptavidina), hidratos de carbono y lectinas, secuencias de nucleótidos complementarios, moléculas efectoras y receptoras, cofactores y enzimas, enzimas e inhibidores de enzimas y similares. Además, las parejas de unión específica pueden incluir miembros que son análogos a los miembros de unión específica originales, por ejemplo, un análogo de analito. Los miembros de una unión específica inmunorreactiva incluyen antígenos, fragmentos de antígenos y anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales y policlonales así como complejos y fragmentos de los mismos, producidos tanto de forma aislada como recombinante.

hh. Condiciones rigurosas

"Condiciones rigurosas" se usa en este documento para describir la hibridación de ADN unido a un filtro en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de uno o varios lavados en 0,2 x SSC/0,1% de SDS a aproximadamente 50-65°C. La expresión "en condiciones altamente rigurosas", se refiere a una hibridación de un ácido nucleico unido a un filtro en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido de uno o varios lavados en 0,1 x SSC/0,2% de SDS a aproximadamente 68°C o con otras condiciones de hibridación rigurosas. Véase, por ejemplo, Ausubel, FM et al., compiladores, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, vol. I, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, en las páginas 6.3.1-6.3.6 y 2.10.3.

ii. Tratar, tratando o tratamiento

"Tratar", "tratando" o "tratamiento" se emplea cada uno de forma intercambiable en este documento para describir, revertir, aliviar o inhibir el progreso de una enfermedad o uno o varios síntomas de tal enfermedad, a la que se aplica tal término. Dependiendo del estado del sujeto, el término también se refiere a prevenir una enfermedad, e incluye la prevención del inicio de una enfermedad o prevenir los síntomas asociados con una enfermedad. Un tratamiento puede llevarse a cabo ya sea en una forma aguda o crónica. El término también se refiere a reducir la gravedad de una enfermedad o los síntomas asociados con tal enfermedad antes de padecer la enfermedad. Una prevención o reducción de ese tipo de la gravedad de una enfermedad antes de padecerla, se refiere a la administración de una composición de anticuerpo o farmacéutica de la presente invención a un sujeto que en el momento de la administración no padece la enfermedad. "Prevención" también se refiere a la prevención de la recurrencia de una enfermedad o de uno o varios síntomas asociados con tal enfermedad. "Tratamiento" y "terapéuticamente", se refieren al acto de tratar, tal y como se ha definido "tratar" anteriormente.

jj. Trazador

"Trazador" tal y como se utiliza en este documento, se refiere a un analito o un fragmento de analito conjugado con un marcador, tal como Cys-CRGMa conjugado con un resto fluoresceína, en donde el analito conjugado con el marcador puede competir eficazmente con el analito por sitios sobre un anticuerpo específico del analito.

kk. Variante

"Variante" se utiliza en este documento para describir un péptido o un polipéptido que difiere en la secuencia de aminoácidos por la inserción, delección o sustitución conservadora de aminoácidos, pero que conserva al menos una actividad biológica. Ejemplos representativos de "actividad biológica" incluyen la capacidad de unirse a un anticuerpo específico o para promover una respuesta inmune. Variante también se utiliza en este documento para describir una proteína con una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una proteína de referencia con una secuencia de aminoácidos que conserva al menos una actividad biológica. Una sustitución conservadora de un aminoácido, es decir, la sustitución de un aminoácido por un aminoácido diferente con propiedades similares (por ejemplo, hidrofilia, grado y distribución de las regiones cargadas) se reconoce en la técnica porque implica normalmente un cambio menor. Estos cambios menores se pueden identificar, en parte, considerando el índice hidropático de los aminoácidos, tal y como se entiende en la técnica. Kyte et al., J. Mol. Biol. 157: 105-132 (1982). El índice hidropático de un aminoácido se basa en la consideración de su hidrofobicidad y carga. Se conoce en la técnica que los ami-

noácidos con índices hidropáticos similares se pueden sustituir y todavía conservan la función proteica. En un aspecto, los aminoácidos que tienen índices hidropáticos de ± 2 están sustituidos. La hidrofilia de los aminoácidos también se puede utilizar para revelar sustituciones que darían como resultado proteínas que conservan una función biológica. Una consideración de la hidrofilia de los aminoácidos en el contexto de un péptido, permite el cálculo de la mayor hidrofilia promedio local de ese péptido, una medida útil que se ha descrito que se correlaciona bien con la antigenicidad y la inmunogenicidad. Documento de Patente de EE.UU. n° 4.554.101.

La sustitución de aminoácidos que tienen valores de hidrofilia similares puede dar como resultado péptidos que conservan una actividad biológica, por ejemplo la inmunogenicidad, tal y como se entiende en la técnica. Las sustituciones se pueden realizar con aminoácidos que tienen valores de hidrofilia de ± 2 ambos. Tanto el índice de hidrofobicidad como el valor de hidrofilia de los aminoácidos están influenciados por la cadena lateral particular de ese aminoácido. En consonancia con esta observación, las sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la función biológica se entiende que dependerán de la similitud relativa de los aminoácidos y particularmente de las cadenas laterales de los aminoácidos, según lo revelado por la hidrofobicidad, hidrofilia, carga, tamaño y otras propiedades. "Variante" también se puede utilizar para referirse a un fragmento antigénicamente reactivo de un anticuerpo anti-RGMa que difiere del fragmento correspondiente del anticuerpo anti-RGMa en la secuencia de aminoácidos, pero que todavía es antigénicamente reactivo y puede competir con el fragmento correspondiente de anticuerpo anti-RGMa para unirse con RGMa. "Variante" se puede utilizar también para describir un polipéptido o un fragmento del mismo que se ha procesado de forma diferencial, tal como por proteólisis, fosforilación o cualquier otra modificación post-traducciona, pero que conserva su reactividad con el antígeno.

II. Vector

"Vector" se usa en el presente documento para describir una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN de doble cadena circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma vírico. Ciertos vectores pueden replicarse de manera autónoma en una célula hospedadora en la que se han introducido (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula hospedadora después de la introducción en la célula hospedadora y de ese modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están ligados funcionalmente. Tales vectores se denominan en este documento "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en forma de plásmidos. "Plásmido" y "vector" se pueden emplear indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector utilizada más comúnmente. Sin embargo, otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados de replicación defectuosa), que sirven para funciones equivalentes, se pueden utilizar. En este sentido, las versiones de ARN de vectores (incluyendo vectores víricos de ARN) también pueden encontrar uso en el contexto de la presente descripción.

Para citar los intervalos numéricos en este documento, cada número intermedio se contempla explícitamente con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, para el intervalo de 6-9, los números 7 y 8 se contemplan, además de 6 y 9 y para el intervalo de 6,0-7,0, los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0 se contemplan explícitamente.

2. Anticuerpos anti-RGMa

En este documento se proporcionan anticuerpos para uso en métodos de tratamiento de enfermedades y trastornos degenerativos de las neuritis. Varios de los anticuerpos descritos en este documento se han seleccionado para la unión a RGMa, mientras que se minimiza o elimina la reactividad con la Molécula de Orientación Repulsiva c ("RGMc"). Por ejemplo, véase la Tabla 4, en donde el anticuerpo monoclonal obtenido a partir de PROfusion, AE12-1 y las variantes de AE12-1 (AE12-1F, AE12-1H, AE12-1L, AE12-1V, AE12-1I, AE12-1K y AE12-1Y) muestran una actividad neutralizante de RGMa sin (detección baja) una reacción cruzada con RGMc. Debido a que los anticuerpos generados contra RGMa pueden reaccionar frecuentemente de forma cruzada con RGMc y, a dosis intravenosas altas pueden dar lugar a una acumulación de hierro en los hepatocitos, la unión específica de los anticuerpos descritos en este documento a RGMa tiene un beneficio terapéutico. Además, la selectividad elevada de estos anticuerpos ofrece ventanas o intervalos de dosis terapéuticas grandes para el tratamiento.

a. RGMa

RGMa humana, que puede existir como una proteína de 450 aminoácidos con un péptido señal N-terminal previsto de 47 aminoácidos y una señal de fijación de GPI C-terminal, se propuso primero para regular la orientación de los axones retinales mediante la unión a neogenina, una proteína de membrana que es también un receptor para las netrinas, que son moléculas secretadas que tienen un papel en el desarrollo neuronal y la supervivencia celular. Además de regular la orientación axonal retinal, se ha mostrado que RGMa inhibe el crecimiento axonal en ratas adultas. Véase, Yamashita et al., Current Opinion in Neurobiology (2007) 17: 1-6. De acuerdo con estos mecanismos, la expresión de RGMa aumenta después de una lesión en la médula espinal, tiempo durante el cual la inhibi-

ción de RGMa aumenta el crecimiento axonal. Véase, Kitayama et al., PLoS One, (2011) vol.6 (9), páginas 1-9; y Hata et al., J. Cell Biol. (2006) 173: 47-58. La expresión de RGMa también está regulada al alza en el sitio de la lesión y en el tejido de la cicatriz de seres humanos que padecen isquemia cerebral focal o lesión cerebral traumática. Véase, Yamashita et al., Current Opinion in Neurobiology (2007) 17: 1-6; Schwab et al., Arch Neurol (2005) 22: 2134-2144; y Muramatsu et al., Nat. Medicine (2011) 17: 488-94.

RGMa puede tener la siguiente secuencia de aminoácidos:

MQPPRERLVV TGRAGWMGMG RGAGRSALGF WPTLAFLLCSPAATSPCKI
 LKCNSFWSA TSGSHA PASDDTPEFC AALRSYALCT RRTARTCRGD LAYHSAVHGI
 EDLMSQHNCS KDGPTSQPRL RTLPPAGDSQ ERSDSPEICH YEKSFKHSA
 TPNYTHCGLF GDPHLRFTD RFQTCKVQGA WPLIDNNYLN VQVTNTPVLP
 GSAATATSKL TIFKNFQEC VDQKVYQAEM DELPAAFVDG SKNGGDKHGA
 NSLKITEKVS GQHVEIQAKY IGTIVVRQV GRYLTFAVRM PEEVVNAVED
 WDSQGLYLCL RGCPLNQQID FQAFHTNAEG TGARRLAAAS PAPTAPETFP
 YETAVAKCKE KLPVEDLYYQ ACVFDLLTTG DVNFTLAAYY ALEDVKMLHS
 NKDKLHLYER TRDLPGRAAA GLPLAPRPLL GALVPLLALL PVFC (SEQ ID NO:65).

RGMa puede ser un fragmento o una variante de SEQ ID NO: 65.

El fragmento de RGMa puede tener una longitud entre 5 y 425 aminoácidos, entre 10 y 400 aminoácidos, entre 50 y 350 aminoácidos, entre 100 y 300 aminoácidos, entre 150 y 250 aminoácidos, entre 200 y 300 aminoácidos o entre 75 y 150 aminoácidos. El fragmento puede comprender una cantidad de aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 65.

El fragmento de RGMa puede tener la siguiente secuencia de aminoácidos: PCKI LKCNSFWSA TSGSHA PASDDTPEFC AALRSYALCT RRTARTCRGD LAYHSAVHGI EDLMSQHNCS KDGPTSQPRL RTLPPAGDSQ ERSDSPEICH YEKSFKHSA TPNYTHCGLF GD (SEQ ID NO: 66), que se corresponde con los aminoácidos 47-168 de SEQ ID NO: 65. El fragmento de RGMa puede ser un fragmento de SEQ ID NO: 66. El fragmento de RGMa puede ser una variante de SEQ ID NO: 66. El fragmento de RGMa puede tener la siguiente secuencia de RGMa: PCKILKCNSFWSATSGSHAPAS (SEQ ID NO: 74).

RGMa puede existir como una forma unida a la membrana celular y/o como una forma soluble.

b. Anticuerpo que reconoce a RGMa

El anticuerpo es un anticuerpo que se une a RGMa, un fragmento del mismo o una variante del mismo. Además, los fragmentos del anticuerpo anti-RGMa, las variantes y los derivados del mismo se describen en el presente documento, así como un anticuerpo anti-RGMa que es un anticuerpo policlonal o monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena única, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano o un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab o una mezcla de los mismos. Los fragmentos o derivados del anticuerpo pueden comprender fragmentos F(ab')₂, Fv o scFv. Los derivados del anticuerpo se pueden producir mediante peptidomiméticos. Además, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla.

Los anticuerpos humanos se pueden obtener a partir de la tecnología de presentación en fagos o a partir de ratones transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humano se puede generar como resultado de una respuesta inmune *in vivo* humana y se puede aislar. Véase, por ejemplo, Funaro et al., BMC Biotechnology, 2008(8): 85. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser un producto del repertorio humano y no animal. Debido a que es de origen humano, los riesgos de reactividad contra auto-antígenos se pueden minimizar. Alternativamente, los bancos de presentación en levadura y las tecnologías de presentación convencionales se pueden usar para seleccionar y aislar anticuerpos anti-RGMa humanos. Por ejemplo, bancos de fragmentos variables de cadena sencilla humanos (scFv) no tratados previamente se pueden utilizar para seleccionar anticuerpos anti-RGMa humanos. Animales transgénicos se pueden utilizar para expresar los anticuerpos humanos.

Los anticuerpos humanizados pueden ser moléculas de anticuerpo procedentes de anticuerpos de especies no humanas que se unen al antígeno deseado que tiene una o varias regiones determinantes de complementariedad (CDRs) procedentes de la especie no humana y regiones estructurales de una molécula de inmunoglobulina humana.

El anticuerpo es distinguible de los anticuerpos conocidos porque posee funciones biológicas diferentes de las conocidas en la técnica. Por ejemplo, no solo los anticuerpos de la invención reconocen y se unen a RGMa, se caracterizan adicionalmente por tener una actividad biológica adicional, por ejemplo, la capacidad de atenuar los signos clíni-

cos asociados con enfermedades relacionadas con la degeneración de las neuritas.

El anticuerpo se puede unir específicamente a RGMa. El anticuerpo de RGMa específico para RGMa puede comprender SEQ ID NOs: 1 y 5; SEQ ID NOs: 2-4 y 6-8; o SEQ ID NOs: 2-4, 6, 7 y 73. El anticuerpo se puede unir a SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 74 o a un fragmento o variante de las mismas. El anticuerpo puede reconocer y unirse específicamente a un epítipo presente en un polipéptido o una variante de RGMa como se ha descrito anteriormente. El epítipo puede ser SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 74 o una variante de las mismas.

(1) Características de la unión del anticuerpo

El anticuerpo puede unirse inmunespecíficamente a RGMa (SEQ ID NO: 65), SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 74, a un fragmento de la misma o a una variante de la misma y puede tener una k_{off} (o k_d) de al menos $1,0 \times 10^{-3} s^{-1}$, de al menos $1,0 \times 10^{-4} s^{-1}$, de al menos $1,0 \times 10^{-5} s^{-1}$, de al menos $1,0 \times 10^{-6} s^{-1}$ o tener una k_{off} (o k_d) en el intervalo desde $1,0 \times 10^{-3} s^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-6} s^{-1}$, de $1,0 \times 10^{-3} s^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-5} s^{-1}$ o de $1,0 \times 10^{-3} s^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-4} s^{-1}$. El fragmento puede ser SEQ ID NO: 66 o SEQ ID NO: 74.

El anticuerpo puede unirse inmunespecíficamente a RGMa (SEQ ID NO: 65), SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 74, a un fragmento de la misma o a una variante de la misma y tiene una k_{on} (o k_a) de al menos $2,4 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, de al menos aproximadamente $2,5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, de al menos aproximadamente $3,3 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, de al menos aproximadamente $5,0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, de al menos aproximadamente $1,25 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, de al menos aproximadamente $1,35 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, de al menos aproximadamente $1,0 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, de al menos aproximadamente $1,0 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ o tiene una k_{on} (o k_a) que varía desde aproximadamente $5,0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$, desde aproximadamente $3,3 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ a aproximadamente $1,0 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$, desde aproximadamente $2,5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ a aproximadamente $1,25 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, desde aproximadamente $2,4 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ a aproximadamente $1,35 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$. El fragmento puede ser SEQ ID NO: 66 o SEQ ID NO: 74.

(2) Estructura del anticuerpo

(a) CDRs de cadena pesada y de cadena ligera

El anticuerpo se puede unir inmunespecíficamente a RGMa (SEQ ID NO: 65), SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 74, a un fragmento de la misma o a una variante de la misma y comprende una cadena pesada variable y/o una cadena ligera variable mostradas en la Tabla 1. El anticuerpo puede unirse inmunespecíficamente a RGMa, a un fragmento de la misma o a una variante de la misma y comprende una o varias de las secuencias de CDRs de cadena pesada o de cadena ligera que también se muestran en la Tabla 1. La cadena ligera del anticuerpo puede ser una cadena kappa o una cadena lambda. Por ejemplo, véase la Tabla 1.

En este documento se incluye un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo que se une inmunespecíficamente a RGMa, a un fragmento de la misma o a una variante de la misma. El ácido nucleico aislado puede comprender una secuencia de nucleótidos que se hibrida, en condiciones rigurosas, con la molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende secuencias de CDRs de la cadena pesada o de la cadena ligera mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1 Lista de secuencias de aminoácidos de regiones VH y VL de anticuerpos monoclonales completamente humanos anti-RGMa (AE12-1 a AE12-8, AE12-13, AE12-15, AE12-20, AE12-21, AE12-23 y AE12-24)

REGIÓN DE LA PROTEÍNA	SEQ ID NO.	SECUENCIA
AE12-1 (VH)	1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA: GYTFTSHGISWVRQAPGQGLDWMG WISPYSGNTNYAQKLQGRVTMTTD TSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR VGSGPYYYMDVWGQGLTVSS
AE12-1 (VH) CDR-H1	2	SHGIS
AE12-1 (VH) CDR-H2	3	WISPYSGNTNYAQKLQG
AE12-1 (VH) CDR-H3	4	VGSGPYYYMDV
AE12-1 (VL) (cadena Lambda)	5	

ES 2 676 725 T3

REGIÓN DE LA PROTEÍNA	SEQ ID NO.	SECUENCIA
		QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTG TSSSVGDSIYVSWYQQHPGKAPK LMLYDVTKRPSGVPDRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCCSY AGTDTLFGGGTKVTVL
AE12-1 (VL) CDR-L1	6	TGTSSSVGDSIYVS
AE12-1 (VL) CDR-L2	7	DVTKRPS
AE12-1 (VL) CDR-L3	8	CSYAGTDL
AE12-2 (VH)	9	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYDINWVRQATGQG LEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQ GRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSE DTAVYYCARSTLSVWGQGLVT
		VSS
AE12-2 (VH) CDR-H1	10	SYDIN
AE12-2 (VH) CDR-H2	11	WMNPNSGNTGYAQKFQG
AE12-2 (VH) CDR-H3	12	STLSV
AE12-2 (VL) (cadena Lambda)	13	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGD KLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIY QDSKRPSGIPKRFSGSNSGDTATLT ISGTQAMDEADYYCQAWDSSTGV FGPGTKVTVL
AE12-2 (VL) CDR-L1	14	SGDKLGDKYAC
AE12-2 (VL) CDR-L2	15	QDSKRPS
AE12-2 (VL) CDR-L3	16	QAWDSSTGV
AE12-3 (VH)	17	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCA ASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVAVISYDGSNKYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARERVYSSGKEGYYYG MDVWGQGTMTVSS
AE12-3 (VH) CDR-H1	18	DYAMH
AE12-3 (VH) CDR-H2	19	VISYDGSNKYYADSVKG
AE12-3 (VH) CDR-H3	20	ERVYSSGKEGYYYGMDV
AE12-3 (VL) (cadena Lambda)	21	

ES 2 676 725 T3

REGIÓN DE LA PROTEÍNA	SEQ ID NO.	SECUENCIA
		QSGLTQPPSVSAAPGQRVTISCTG SGSNIGAGYGVHWYQQLPATAPK ILYGDYNRPSGVPDRFSGSRSGTS ASLTITGLQAEDEADYYCQSYDNS LRGVLFGGGTKLTVL
AE12-3 (VL) CDR-L1	22	TGSGSNIGAGYGVH
AE12-3 (VL) CDR-L2	23	GDYNRPS
AE12-3 (VL) CDR-L3	24	QSYDNSLRGVL
AE12-4 (VH)	25	EVQLVESGGGVVQPGETSL
		RLSCAASGFPFSSYGMHW VRQAPGKGLEWVAAISG DGILKYYTDSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNLSGEDTG LYYCARNYDNSLDYWGQGT LTVSS
AE12-4 (VH) CDR-H1	26	SYGMH
AE12-4 (VH) CDR-H2	27	AISGDGILKYYTDSVKG
AE12-4 (VH) CDR-H3	28	NYDNSLDY
AE12-4 (VL) (cadena Lambda)	29	QPVLTSQSPSVSASLGASVKV TCTLSSGHSAYAIAWHQQP EKGPRYLMKVNSDGSHNK GDGVPDRFSGSSSGAERYL IISGLQSEDEADYYCQTWG PGIRVFGGGTKLTVL
AE12-4 (VL) CDR-L1	30	TLSSGHSAYAIA
AE12-4 (VL) CDR-L2	31	VNSDGSHNKGD
AE12-4 (VL) CDR-L3	32	QTWGPGIRV
AE12-5 (VH)	33	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV VSGHSLSELTIHWRQAPGKGLEW MGGFDPEDGRGTYAPNFRGRVTM TEDTSTDYAYMELSGLRSEDAAYV YCATLLGEYDSYFDLWGRGTLVTV SS
AE12-5 (VH) CDR-H1	34	ELTIH
AE12-5 (VH) CDR-H2	35	GFDPEDEGRGTYAPNFRG

ES 2 676 725 T3

REGIÓN DE LA PROTEÍNA	SEQ ID NO.	SECUENCIA
AE12-5 (VH) CDR-H3	36	LLGEYDSYFDL
AE12-5 (VL) (cadena Kappa)	37	DVVMTQSPDFQSVTPEDKVTITCR ASQSIGSCLHWYQQKPDQSPKLLI KYASQSIGVPSRFSGSGSGTDFTL TINSLEAEDAATYYCHQSSSLPYT FGQGTKLEIK
AE12-5 (VL) CDR-L1	38	RASQSIGSCLH
AE12-5 (VL) CDR-L2	39	YASQSIGS
AE12-5 (VL) CDR-L3	40	HQSSSLPYT
AE12-6 (VH)	41	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YIFTNYDIAWVRQAPGQGLEWMGWM NPDSGNTGFVQKFKGRVTATSNTDITT AYMELSSLTSEDYAVYYCARDRFSGSY DLDHWGQGTLLTVSS
AE12-6 (VH) CDR-H1	42	NYDIA
AE12-6 (VH) CDR-H2	43	WMNPDSGNTGFVQKFKG
AE12-6 (VH) CDR-H3	44	DRFGSGYDLDH
AE12-6 (VL) (cadena Lambda)	45	SYELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGS KSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADY YCQVWGSSSDHYVFGTGTKVTVL
AE12-6 (VL) CDR-L1	46	GGNNIGSKSVH
AE12-6 (VL) CDR-L2	47	DDSDRPS
AE12-6 (VL) CDR-L3	48	QVWGSSSDHYV
AE12-7 (VH)	49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TSSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSGISGS GESTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRVEDTAIYYCARQGYGAHDYWG QGTLTVTVSS
AE12-7 (VH) CDR-H1	50	SYAMT
AE12-7 (VH) CDR-H2	51	GISGSGESTYYADSVKGG
AE12-7 (VH) CDR-H3	52	QGYGAHDY
AE12-7 (VL) (cadena Lambda)	53	

ES 2 676 725 T3

REGIÓN DE LA PROTEÍNA	SEQ ID NO.	SECUENCIA
		QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGASSNVG SNRVNWFYQQFPGMAPKLLIYSNNQRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCA AWDDSLNGYVFGTGTKVTVL
AE12-7 (VL) CDR-L1	54	SGASSNVGSNRVN
AE12-7 (VL) CDR-L2	55	SNNQRPS
AE12-7 (VL) CDR-L3	56	AAWDDSLNGYV
AE12-8 (VH)	57	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFD DYAMHWVRQAPGKGLEWVSLISWDGG STYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCAKDIPKVGGSYGYG ALGYWGQGPVTVSS
AE12-8 (VH) CDR-H1	58	DYAMH
AE12-8 (VH) CDR-H2	59	LISWDGGSTYYADSVKG
AE12-8 (VH) CDR-H3	60	DIPKVGGSYGYGALGY
AE12-8 (VL) (cadena Lambda)	61	SYELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGD ISVHWYQQKSGQAPMLVHDDSDRPSG IPERFSGSNGSSATLTISRVEAGDEAD YHCQVWDSGSGHHVFGTGTKVTVL
AE12-8 (VL) CDR-L1	62	GGNIGDISVH
AE12-8 (VL) CDR-L2	63	DDSDRPS
AE12-8 (VL) CDR-L3	64	QVWDSGSGHHV
AE12-13 (VH)	91	EVQLQESGAGLLKPSETLSLTCVYGG SFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEINHS GSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARDGAGVFDLW GRGTLVTVSS
AE12-13 (VH) CDR-H1	92	GYYS
AE12-13 (VH) CDR-H2	93	EINHSGSTNYNPSLKS
AE12-13 (VH) CDR-H3	94	DDGAGVFDL
AE12-13 (VL) (cadena Kappa)	95	DIQLTQSPSSLSASVGDGVTITCQASQ DISNYLNWFYQQKPGKAPKLLIYDASN LETGVPSRFSGSGSTFFTLTINLQPE DFATYYCQQSGNTPWTFGQGTKVEINR

ES 2 676 725 T3

REGIÓN DE LA PROTEÍNA	SEQ ID NO.	SECUENCIA
AE12-13 (VL) CDR-L1	96	QASQDISNYLN
AE12-13 (VL) CDR-L2	97	DASNLET
AE12-13 (VL) CDR-L3	98	QQSGNTPWT
AE12-15 (VH)	99	EVQLVQSGAEVKEPGASVKVSCKA SGYTFTDYYIQWVRQAPGHGLEWM GWINPKTGGTNYLQKFQGRVTMTR DTSTRTAYMELSSLRSDDTAFYYCV REDMNTVLATSWFDPWGQGLVTVSS
AE12-15 (VH) CDR-H1	100	DYYIQ
AE12-15 (VH) CDR-H2	101	WINPKTGGTNYLQKFQG
AE12-15 (VH) CDR-H3	102	EDMNTVLATSWFDP
AE12-15 (VL) (cadena Lambda)	103	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGNQ LGHKFASWYQQKPGQSPVVIYED KKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISG TQAMDEADYYCQVWDVITDHYVF GTGTKVTVLG
AE12-15 (VL) CDR-L1	104	SGNQLGHKFAS
AE12-15 (VL) CDR-L2	105	EDKKRPS
AE12-15 (VL) CDR-L3	106	QVWDVITDHYV
AE12-20 (VH)	107	EVQLVQSGSEVKKPGASVKLSCKT SGYTFTNSAIHWVRQAPGQRLEWM GWINAGNGNTKYSQKFQGRVTITR DTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCA WAYCGGDCYSLDYWGQGLVTVSS
AE12-20 (VH) CDR-H1	108	NSAIH
AE12-20 (VH) CDR-H2	109	WINAGNGNTKYSQKFQG
AE12-20 (VH) CDR-H3	110	AYCGGDCYSLDY
AE12-20 (VL) (cadena Kappa)	111	DIQVTQSPSSLAASVGDRVTITCQAS QDISNYLNWYQQRPGKAPKLLIYDA SNLETGVPPRFSGDGSSTHFSFTITNV
		QPEDVGTYYCQQYDSLPLTFGQGR LEIKR

ES 2 676 725 T3

REGIÓN DE LA PROTEÍNA	SEQ ID NO.	SECUENCIA
AE12-20 (VL) CDR-L1	112	QASQDISNYLN
AE12-20 (VL) CDR-L2	113	DASNLET
AE12-20 (VL) CDR-L3	114	QQYDSLPLT
AE12-21 (VH)	115	EVQLLESGGDLVRPGGSLRLTCEGSG FNFFTQTIHWVRQAPGKGLEWVASIS SDSNYIYHADSLKGRFTVSRDNAQDS VFLQMNSLRVEDTAVYYCARDILLEP LAPHYYYGLDVWGQGTITVTVSS
AE12-21 (VH) CDR-H1	116	TQTIH
AE12-21 (VH) CDR-H2	117	SISSDSNYIYHADSLKG
AE12-21 (VH) CDR-H3	118	DILLEPLAPHYYYGLDV
AE12-21 (VL) (cadena Kappa)	119	DIQVTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QPISTYVNWYQQKPGKAPKLLIYDA STLEIGVPSRISGSGSGTDFTFTISLQ PEDIATYYCQQYDNFPLTFGGGTKV DIKR
AE 12-21 (VL) CDR-L1	120	RASQPISTYVN
AE12-21 (VL) CDR-L2	121	DASTLEI
AE12-21 (VL) CDR-L3	122	QQYDNFPLT
AE12-23 (VH)	123	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISGYYSWIRQSPGKGLEWIGEIFH TGRTYYNPSLRSRLTISVDTSKNQFSL KLSSLTAADTAVYYCARDSAFGSFD YWGQGLVTVSS
AE12-23 (VH) CDR-H1	124	GYYS
AE12-23 (VH) CDR-H2	125	EIFHTGRTYYNPSLRS
AE12-23 (VH) CDR-H3	126	DSAFGSFDY
AE12-23 (VL) (cadena Kappa)	127	DIRVTQSPSSLSASVGDRVTITCQAN EDISIYLNWYQQRPGKAPKLLIYDA SNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISS LQPEDFATYYCQQYHTYPFTFGGGT KVDIKR
AE 12-23 (VL) CDR-L1	128	QANEDISIYLN

REGIÓN DE LA PROTEÍNA	SEQ ID NO.	SECUENCIA
AE12-23 (VL) CDR-L2	129	DASNLET
AE12-23 (VL) CDR-L3	130	QQYHTYPFT
AE12-24 (VH)	131	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCNVSG GSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGNIYY SGSTNYNPSLKSRTISVDTSKSKQFSLK LSSVTAADTAVYYCARALDFWSGQY FDYWGQGTLVTVSS
AE12-24 (VH) CDR-H1	132	SYWWS
AE12-24 (VH) CDR-H2	133	NIYSGSTNYNPSLKS
AE12-24 (VH) CDR-H3	134	ALDFWSGQYFDY
AE12-24 (VL) (cadena Kappa)	135	DIVMTQTPSSLSASVGDRTITCQASQD ISDYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASTLE SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDF ATYYCQQSYSIPPTFGPGTRLEIKR
AE12-24 (VL) CDR-L1	136	QASQDISDYLN
AE12-24 (VL) CDR-L2	137	DASTLES
AE12-24 (VL) CDR-L3	138	QSYSIPPT

5 El anticuerpo o una variante o un derivado del mismo puede contener una o varias secuencias de aminoácidos que tienen una identidad mayor que el 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55% o 50% con una o varias de SEQ ID NOs: 1-64 y 67-73. El anticuerpo o una variante o un derivado del mismo pueden estar codificados por una o varias secuencias de ácido nucleico que tienen una identidad mayor que el 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55% o 50% con una o varias de SEQ ID NOs: 1-64 y 67-73. La identidad y la homología del polipéptido se pueden determinar, por ejemplo, mediante el algoritmo descrito en el informe: Wilbur, W.J. y Lipman, D.J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 726-730 (1983). El anticuerpo, una variante o un derivado del mismo descritos en el presente documento, pueden estar codificados por un ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento de una o varias de SEQ ID NOs: 3-42. El anticuerpo, una variante o un derivado del mismo descritos en el presente documento pueden estar codificados por un ácido nucleico que se hibrida en condiciones altamente rigurosas con el complemento de uno o varios ácidos nucleicos que codifican una o varias de SEQ ID NOs: 1-64 y 67-73.

15 El anticuerpo puede comprender SEQ ID NO: 8, en donde el residuo Cys de SEQ ID NO: 8 se sustituye por otro aminoácido. El anticuerpo puede comprender SEQ ID NOs: 1 y 5 o 2-4 y 6-8, en donde el residuo Cys de SEQ ID NO: 8 se sustituye por otro aminoácido o en donde el residuo Cys en la posición 91 de SEQ ID NO: 5 está sustituido por otro aminoácido. El residuo Cys en la posición 91 de SEQ ID NO: 5 puede estar sustituido por una fenilalanina, una histidina, una leucina, una valina, una isoleucina, una lisina o una tirosina, por ejemplo. El residuo Cys de SEQ ID NO: 8 puede estar sustituido por una fenilalanina (véase SEQ ID NO: 67), una histidina (véase SEQ ID NO: 68), una leucina (véase SEQ ID NO: 69), una valina (véase SEQ ID NO: 70), una isoleucina (véase SEQ ID NO: 71), una lisina (véase SEQ ID NO: 72) o una tirosina (véase SEQ ID NO: 73), por ejemplo. Véase la Tabla 2.

20 El anticuerpo puede ser una clase de molécula de IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o una subclase. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser una molécula de IgG1 que tiene la siguiente secuencia de la región constante:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:140).

5 La región constante anterior en SEQ ID NO: 140 contiene dos (2) mutaciones de la secuencia de la región constante de tipo silvestre en las posiciones 234 y 235. Específicamente, estas mutaciones son cambios de leucina a alanina en cada una de las posiciones 234 y 235 (que se denominan mutaciones "LLAA"). Estas mutaciones se muestran arriba en negrita y subrayadas. El fin de estas mutaciones es eliminar la función efectora.

10 Alternativamente, una molécula de IgG1 puede tener la secuencia de la región constante anterior (SEQ ID NO: 140) que contiene una o varias mutaciones. Por ejemplo, la secuencia de la región constante de SEQ ID NO: 140 puede contener una mutación en el aminoácido 250, en donde la treonina se sustituye por glutamina (SEQ ID NO: 141), una mutación en el aminoácido 428, en donde la metionina se sustituye por leucina (SEQ ID NO: 142) o mutaciones en el aminoácido 250, en donde la treonina se sustituye por glutamina y una mutación en el aminoácido 428, en donde la metionina se sustituye por leucina (SEQ ID NO: 143), como se muestra a continuación en la Tabla 2A.

15 Alternativamente, una molécula de IgG1 puede contener una cadena pesada que comprende: AE12-1 (VH) CDR-H1 (SEQ ID NO: 2), AE12-1 (VH) CDR-H2 (SEQ ID NO: 3), AE12-1 (VH) CDR-H3 (SEQ ID NO: 4) y una cadena ligera que comprende: AE12-1 (VL) CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), AE12-1 (VL) CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) y AE12-1-V (VL) CDR-L3 (SEQ ID NO: 70) y una secuencia constante de SEQ ID NO: 143 como se muestra a continuación en la Tabla 2B (este anticuerpo se denomina AE12-1 V-QL y tiene una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 144 y una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 145).

20 Alternativamente, una molécula de IgG1 puede contener una cadena pesada que comprende: AE12-1 (VH) CDR-H1 (SEQ ID NO: 2), AE12-1 (VH) CDR-H2 (SEQ ID NO: 3), AE12-1 (VH) CDR-H3 (SEQ ID NO: 4) y una cadena ligera que comprende: AE12-1 (VL) CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), AE12-1 (VL) CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) y AE12-1-Y (VL) CDR-L3 (SEQ ID NO: 73) y una secuencia constante de SEQ ID NO: 143 como se muestra a continuación en la Tabla 2B (este anticuerpo se denomina AE12-1Y-QL y tiene una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 146 y una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 147).

25

Tabla 2

REGIÓN DE LA PROTEÍNA	SEQ ID NO.	SECUENCIA
AE12-1-F (VL) CDR-L3	67	FSYAGTDTL
AE12-1-H (VL) CDR-L3	68	HSYAGTDTL
AE12-1-L (VL) CDR-L3	69	LSYAGTDTL
AE12-1-V (VL) CDR-L3	70	VSYAGTDTL
AE12-1-I (VL) CDR-L3	71	ISYAGTDTL
AE12-1-K (VL) CDR-L3	72	KSYAGTDTL
AE12-1-Y (VL) CDR-L3	73	YSYAGTDTL

Tabla 2A

Mutación de aminoácidos	SEQ ID NO:	SECUENCIA
Ninguna	140	

ES 2 676 725 T3

Mutación de aminoácidos	SEQ ID NO:	SECUENCIA
		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKD <u>TI</u> MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSV <u>M</u> HEALHNHYTQKSLSLSPGK
T250Q	141	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKD <u>QL</u> MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSV <u>M</u> HEALHNHYTQKSLSLSPGK
M428L	142	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKD <u>TL</u> MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSV <u>L</u> HEALHNHYTQKSLSLSPGK
T250Q y M428L	143	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKD <u>QL</u> MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSV <u>L</u> HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Tabla 2B

REGIÓN DE LA PROTEÍNA	SEQ ID NO:	SECUENCIA
Cadena ligera AE12-1V-QL (CDRs subrayadas y mutaciones en negrita)	144	<u>QSAL</u> <u>TQ</u> <u>PR</u> <u>SV</u> <u>SG</u> <u>SP</u> <u>GS</u> <u>VT</u> <u>IS</u> <u>CT</u> <u>GT</u> <u>SS</u> <u>SG</u> <u>DS</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>VS</u> <u>W</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>Y</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>*</u>
Cadena pesada AE12-1V-QL (CDRs subrayadas y mutaciones en negrita)	145	

REGIÓN DE LA PROTEÍNA	SEQ ID NO:	SECUENCIA
		EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF FTSHG ISWVRQAPGGQGLDW MGWISPYSGNTINYAOKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARVGS GE YYYMDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCS VLHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
Cadena ligera AE12-1Y-QL (CDRs subrayadas y mutaciones en negrita)	146	QSALTPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSSVGDSIYVSWYQQHPGKAP KLMLYDVT KRPS GVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCY YAGTDTLFGGGTKVIVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAFTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPE QWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS*
Cadena pesada AE12-1Y-QL (CDRs subrayadas y mutaciones en negrita)	147	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF FTSHG ISWVRQAPGGQGLDWM GWI SPYSGNTINYAOKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARVGS GE YYYMDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVLHEALHNHYTQKSL SLSPGK*

c. Preparación/Producción del anticuerpo

- Los anticuerpos se pueden preparar mediante cualquiera entre una variedad de técnicas. En general, los anticuerpos pueden ser producidos por técnicas de cultivo celular, incluyendo la generación de anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales o mediante transfección de genes de anticuerpos, cadenas pesadas y/o cadenas ligeras en hospedadores celulares bacterianos o de mamífero, adecuados, con el fin de permitir la producción de anticuerpos, en donde los anticuerpos pueden ser recombinantes. Las diversas formas del término "transfección" pretenden incluir una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procarionta o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospedadoras procariontas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas es preferible, y lo más preferible en células hospedadoras de mamífero porque tales células eucariotas (y en particular las células de mamífero), son más propensas que las células eucariotas a ensamblar y secretar un anticuerpo plegado de forma adecuada e inmunológicamente activo.
- Células hospedadoras de mamífero a modo de ejemplo para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (que incluyen células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216-4220 (1980)), utilizadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp, J. Mol. Biol., 159: 601-621 (1982), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos se introducen en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse desde el medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales.
- Las células hospedadoras también se pueden utilizar para producir fragmentos de anticuerpos funcionales, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que variaciones del procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula hospedadora con ADN que codifica fragmentos funcionales de la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo de esta invención. La tecnología de ADN recombinante también se puede emplear para eliminar algún o todo, el ADN que codifica una o ambas de las cadenas ligeras y pesadas, que no es necesario para la unión de los antígenos de interés. Las molé-

culas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncadas también están incluidas en los anticuerpos de la invención. Además, los anticuerpos bifuncionales se pueden producir de modo que una cadena pesada y una ligera son un anticuerpo de la invención (es decir, se une a RGMA humana) y la otra cadena pesada y cadena ligera son específicas de un antígeno distinto de RGMA humana, mediante el entrecruzamiento entre un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo por métodos de entrecruzamiento químico convencionales.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo, se introduce en células dhfr-CHO mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo se ligan cada uno funcionalmente con elementos reguladores de potenciador CMV/promotor AdMLP para dirigir niveles elevados de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también es portador de un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera desde el medio de cultivo. Se emplean técnicas convencionales de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar los transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo desde el medio de cultivo. Aún más, la descripción proporciona un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la invención cultivando una célula hospedadora de la descripción en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetiza un anticuerpo recombinante de la invención. El método puede comprender además aislar el anticuerpo recombinante desde el medio de cultivo.

Los métodos para preparar anticuerpos monoclonales implican la preparación de líneas celulares inmortales capaces de producir anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Tales líneas celulares pueden ser producidas a partir de células de bazo obtenidas a partir de un animal inmunizado. El animal puede estar inmunizado con RGMA o un fragmento y/o una variante de la misma. Por ejemplo, cualquiera de SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 74, un fragmento de SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 o SEQ ID NO: 74 o una variante de SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 74 se puede utilizar para inmunizar el animal. El péptido utilizado para inmunizar el animal puede comprender aminoácidos que codifican Fc humano, por ejemplo la región cristalizante del fragmento o la región de la cola del anticuerpo humano. Las células del bazo se pueden immortalizar después, por ejemplo, mediante una fusión con un ligando de células de mieloma. Se puede emplear una variedad de técnicas de fusión. Por ejemplo, las células de bazo y las células de mieloma pueden combinarse con un detergente no iónico durante unos pocos minutos y luego extender en placas con baja densidad en un medio selectivo que favorece el crecimiento de células híbridas, pero no de células de mieloma. Una técnica de este tipo utiliza la selección con hipoxantina, aminopterina, timidina (HAT). Después de un tiempo suficiente, por lo general aproximadamente 1 a 2 semanas, se observan colonias de híbridos. Se seleccionan colonias individuales y el material sobrenadante de su cultivo se somete a ensayo para estudiar la actividad de unión frente al polipéptido. Los híbridos que tienen una reactividad y especificidad elevadas se pueden utilizar.

Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar a partir del material sobrenadante de colonias de hibridoma en crecimiento. Además, se pueden emplear diversas técnicas para mejorar el rendimiento, tales como una inyección de la línea celular de hibridoma en la cavidad peritoneal de un hospedador vertebrado adecuado, tal como un ratón. Los anticuerpos monoclonales se pueden recoger entonces a partir del fluido ascítico o la sangre. Los contaminantes se pueden eliminar de los anticuerpos mediante técnicas convencionales, tales como cromatografía, filtración en gel, precipitación y extracción. La cromatografía de afinidad es un ejemplo de un método que se puede utilizar en un proceso para purificar los anticuerpos.

La enzima proteolítica papaína escinde preferencialmente moléculas de IgG para producir varios fragmentos, dos de los cuales (los fragmentos F(ab)) comprenden cada uno un heterodímero covalente que incluye un sitio de unión a antígeno intacto. La enzima pepsina es capaz de escindir las moléculas de IgG para proporcionar varios fragmentos, incluyendo el fragmento F(ab')₂, que comprende ambos sitios de unión a antígeno.

El fragmento Fv se puede producir mediante una escisión proteolítica preferencial de una IgM y en raras ocasiones moléculas de inmunoglobulina IgG o IgA. El fragmento Fv se puede obtener usando técnicas recombinantes. El fragmento Fv incluye un heterodímero VH::VL no covalente que incluye un sitio de unión a antígeno que conserva gran parte de las capacidades de reconocimiento y unión a antígeno de la molécula de anticuerpo natural.

El anticuerpo, el fragmento de anticuerpo o el derivado pueden comprender un conjunto de regiones determinantes de complementariedad ("CDR") de la cadena pesada y de la cadena ligera, interpuesto, respectivamente, entre un conjunto de regiones estructurales ("FR") de la cadena pesada y la cadena ligera que proporciona soporte a las CDRs y define la relación espacial de las CDRs de una respecto a la otra. El conjunto de CDRs puede contener tres regiones hipervariables de una región V de la cadena pesada o ligera. Partiendo del extremo N-terminal de una cadena pesada o ligera, estas regiones se indican como "CDR1", "CDR2" y "CDR3", respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por lo tanto, puede incluir seis CDRs, que comprenden el conjunto de CDRs de cada región V de la cadena pesada y la cadena ligera. Un polipéptido que comprende una única CDR, (por ejemplo, una CDR1, CDR2 o CDR3) se puede denominar una "unidad de reconocimiento molecular." Análisis cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo han demostrado que los residuos de aminoácidos de CDRs forman un contacto extenso con el antígeno unido, en donde el contacto más amplio con el antígeno es con la CDR3 de la cadena pesada. Por lo tanto,

las unidades de reconocimiento molecular pueden ser las principales responsables de la especificidad de un sitio de unión a antígeno. En general, los residuos de CDRs están implicados directamente y de forma más sustancial en influir en la unión al antígeno.

Otros métodos adecuados para producir o aislar anticuerpos con la especificidad requerida se pueden utilizar, incluyendo, pero no limitados a métodos que seleccionan anticuerpos recombinantes a partir de un banco de péptidos o proteínas (por ejemplo, pero no limitados a, un banco de presentación en bacteriófagos, ribosomas, oligonucleótidos, ARN, ADNc, levadura o similares); por ejemplo, como están disponibles en diferentes suministradores comerciales tales como Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, Reino Unido), MorphoSys (Martinsreid/Planegg, Del.), Biovation (Aberdeen, Escocia, Reino Unido) BioInvent (Lund, Suecia), utilizando métodos conocidos en la técnica. Véanse los documentos de patente de EE.UU. n.º 4.704.692; 5.723.323; 5.763.192; 5.814.476; 5.817.483; 5.824.514; 5.976.862. Los métodos alternativos se basan en la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones SCID, Nguyen et al. (1997) *Microbiol. Immunol.* 41:901-907; Sandhu et al. (1996) *Crit. Rev. Biotechnol.* 16:95-118; Eren et al. (1998) *Immunol.* 93:154-161) que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos, como se conoce en la técnica y/o como se describe en el presente documento. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, presentación en ribosomas (Hanes et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:4937-4942; Hanes et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:14130-14135); tecnologías productoras de anticuerpos en una sola célula (por ejemplo, el método de anticuerpo con linfocitos seleccionados ("SLAM") (documento de Patente de EE.UU. n.º 5.627.052, Wen et al. (1987) *J. Immunol.* 17:887-892; Babcook et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848); microgota de gel y citometría de flujo (Powell et al. (1990) *Biotechnol.* 8:333-337; One Cell Systems, (Cambridge, Mass.); Gray et al. (1995) *J. Imm. Meth.* 182:155-163; Kenny et al. (1995) *Bio/Technol.* 13:787-790); selección de linfocitos B (Steenbakkers et al. (1994) *Molec. Biol. Reports* 19:125-134 (1994)).

Un anticuerpo madurado por afinidad puede ser producido por cualquiera de una serie de procedimientos que son conocidos en la técnica. Por ejemplo, véase Marks et al., *Biotechnology*, 10: 779-783 (1992) que describe la maduración por afinidad mediante redistribución de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de residuos CDR y/o estructurales se describe por Barbas et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91: 3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene*, 169: 147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.*, 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.*, 154(7): 3310-3319 (1995); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992). La mutación selectiva en posiciones de mutagénesis selectiva y en posiciones de contacto o hipermutación con una actividad potenciadora del residuo de aminoácido, se describe en el documento de Patente de EE.UU. n.º 6.914.128 B1.

Las variantes de anticuerpos de la presente invención también se pueden preparar usando la entrega de un polinucleótido que codifica un anticuerpo de esta invención a un hospedador adecuado de modo que se proporciona a animales o mamíferos transgénicos, tales como cabras, vacas, caballos, ovejas y similares, que producen tales anticuerpos en su leche. Estos métodos son conocidos en la técnica y se describen por ejemplo en los documentos de Patente de EE.UU. n.º 5.827.690; 5.849.992; 4.873.316; 5.849.992; 5.994.616; 5.565.362; y 5.304.489.

Las variantes de anticuerpos se pueden preparar también mediante la entrega de un polinucleótido de la presente invención para proporcionar plantas transgénicas y células vegetales cultivadas (por ejemplo, pero no limitadas a tabaco, maíz y lenteja de agua) que producen tales anticuerpos, porciones especificadas o variantes en partes de la planta o en células cultivadas de la misma. Por ejemplo, Cramer et al. (1999) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240:95-118 y las referencias citadas en ese documento, describen la producción de hojas de tabaco transgénico que expresan grandes cantidades de proteínas recombinantes, por ejemplo, usando un promotor inducible. El maíz transgénico se ha utilizado para expresar proteínas de mamífero a niveles de producción comercial, con actividades biológicas equivalentes a las producidas en otros sistemas recombinantes, o purificadas a partir de fuentes naturales. Véase, por ejemplo, Hood et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* (1999) 464:127-147 y las referencias citadas en ese documento. Variantes de anticuerpos también se han producido en grandes cantidades a partir de semillas de plantas transgénicas, incluyendo fragmentos de anticuerpos, tales como anticuerpos de cadena sencilla (scFvs), incluyendo semillas de tabaco y tubérculos de patata. Véase, por ejemplo, Conrad et al. (1998) *Plant Mol. Biol.* 38:101-109 y las referencias citadas en ese documento. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención también se pueden producir usando plantas transgénicas, de acuerdo con métodos conocidos.

Los derivados de anticuerpos pueden ser producidos, por ejemplo, mediante la adición de secuencias exógenas para modificar la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, la afinidad, la tasa de asociación, la tasa de separación, la avidéz, la especificidad, la semivida o cualquier otra característica adecuada. Generalmente parte o la totalidad de las secuencias de CDRs no humanas o humanas se conservan, mientras que las secuencias no humanas de las regiones variables y constantes se sustituyen con aminoácidos humanos o de otro tipo.

Los fragmentos pequeños de anticuerpos pueden ser diacuerpos que tienen dos sitios de unión a antígeno, en donde los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH VL). Véanse, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollanger et. al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448. Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno.

no. Véase también, el documento de Patente de EE.UU. n° 6.632.926 de Chen et al., el cual da a conocer variantes de anticuerpos que tienen uno o varios aminoácidos insertados en una región hipervariable del anticuerpo parental y una afinidad de unión hacia un antígeno diana que es al menos aproximadamente dos veces más fuerte que la afinidad de la unión del anticuerpo parental hacia el antígeno.

5 El anticuerpo puede ser un anticuerpo lineal. El procedimiento para la preparación de un anticuerpo lineal se conoce en la técnica y está descrito por Zapata et al. (1995) *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062. Brevemente, esos anticuerpos comprenden una pareja de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que forman una pareja de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

10 Los anticuerpos se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes por métodos conocidos incluyendo, pero no limitados a, purificación de proteína A, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxipatita y cromatografía de lectina. La cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") también se puede utilizar para la purificación.

15 Puede ser útil marcar de forma detectable o terapéutica el anticuerpo. Los métodos para conjugar anticuerpos con estos agentes son conocidos en la técnica. Únicamente con fines ilustrativos, los anticuerpos se pueden marcar con un resto detectable tal como un átomo radioactivo, un cromóforo, un fluoróforo o similares. Tales anticuerpos marcados se pueden usar para técnicas de diagnóstico, ya sea *in vivo* o en una muestra del ensayo aislada. Los anticuerpos también se pueden conjugar, por ejemplo, con un agente farmacéutico, tal como un fármaco quimioterapéutico o una toxina. Pueden estar ligados a una citocina, a un ligando, a otro anticuerpo. Los agentes adecuados para el acoplamiento a anticuerpos para lograr un efecto anti-tumoral incluyen citocinas, tales como interleucina 2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral (TNF); fotosensibilizadores, para uso en terapia fotodinámica, incluyendo aluminio (III) tetrasulfonato de ftalocianina, hematoporfirina y ftalocianina; radionucleidos, tales como yodo-131 (131I), itrio-90 (90Y), bismuto-212 (212Bi), bismuto-213 (213Bi), tecnecio-99m (99mTc), renio-186 (186Re) y renio-188 (188Re); antibióticos, tales como doxorubicina, adriamicina, daunorubicina, metotrexato, daunomicina, neocarzinostatina y carboplatino; toxinas bacterianas, vegetales y otras toxinas, tales como la toxina de la difteria, la exotoxina A de *Pseudomonas*, la enterotoxina A estafilocócica, la toxina abrina-A, la ricina A (ricina A desglucosilada y ricina A natural), la toxina de TGF-alfa, citotoxina de cobra china (naja naja atra) y la gelonina (una toxina vegetal); proteínas inactivadoras de ribosomas procedentes de plantas, bacterias y hongos, tales como restrictocina (una proteína inactivadora de ribosomas producida por *Aspergillus restrictus*), saporina (una proteína inactivadora de ribosomas de *Saponaria officinalis*) y ARNasa; inhibidores de la tirosina cinasa; ly207702 (un nucleósido de purina difluorado); liposomas que contienen agentes antiqúísticos (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, plásmidos que codifican toxinas, metotrexato, etc.); y otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, tales como F(ab).

20
25
30

Los anticuerpos se pueden secuenciar y replicar por medios recombinantes o sintéticos. También se pueden secuenciar adicionalmente al revés hasta la secuencia lineal de nucleótidos que los codifican. De acuerdo con ello, esta invención proporciona estos polinucleótidos, solos o en combinación con un vehículo, vector o célula hospedadora como se ha descrito anteriormente, que codifican una secuencia de un anticuerpo de esta invención.

35

La producción de anticuerpos mediante el uso de tecnología de hibridoma, el método de anticuerpos con linfocitos seleccionados (SLAM), los animales transgénicos y los bancos de anticuerpos recombinantes se describen con más detalle a continuación.

40 **(1) Anticuerpos monoclonales anti-RGMA empleando tecnología de hibridoma**

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y presentación en fagos o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas de hibridoma incluyendo aquellas conocidas en la técnica y que se describen, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, segunda edición, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988); Hammerling, et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, (Elsevier, N.Y., 1981). También se observa que la expresión "anticuerpo monoclonal" tal y como se usa en el presente documento, no se limita a anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se obtiene a partir de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago y no al método por el cual se produce.

45

50 En el presente documento se proporcionan métodos para generar anticuerpos monoclonales, así como anticuerpos producidos por el método. El método puede comprender cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la invención en donde, preferiblemente, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados a partir de un animal, por ejemplo, una rata o un ratón, inmunizado con RGMA, con células de mieloma y después escrutando los hibridomas resultantes de la fusión en busca de clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la invención. Brevemente, las ratas se pueden inmunizar con un antígeno RGMA. Preferiblemente, el antígeno RGMA se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Tales adyuvantes incluyen adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (dipéptidos de muramilo) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Tales adyuvantes pueden proteger al polipéptido de una dispersión rápida mediante el secuestro en un depósito local o pueden contener sustancias que estimulan al hospedador a secretar factores que son quimiotácticos para

55

macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Preferiblemente, si se está administrando un polipéptido, la pauta de la inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, distribuidas a lo largo de varias semanas; sin embargo, también se puede usar una única administración del polipéptido.

5 Después de la inmunización de un animal con un antígeno RGMa, los anticuerpos y/o las células productoras de anticuerpo se pueden obtener a partir del animal. Un suero que contiene anticuerpo anti-RGMa se obtiene a partir del animal mediante sangrado o el sacrificio del animal. El suero se puede emplear tal y como se obtiene desde el animal, una fracción de inmunoglobulina se puede obtener a partir del suero o los anticuerpos anti-RGMa se pueden purificar a partir del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidas de este modo son policlonales, teniendo por tanto una variedad heterogénea de propiedades.

10 Una vez que se detecta una respuesta inmune, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno RGMa en el suero de la rata, el bazo de la rata se extirpa y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan después por técnicas bien conocidas con cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponible en la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Va., EE.UU.). Los hibridomas se seleccionan y se clonan mediante dilución limitada. Los clones de los hibridomas se someten a ensayo después por métodos conocidos en la técnica para buscar células que secretan anticuerpos capaces de unirse a RGMa. El fluido ascítico, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, se puede generar mediante la inmunización de ratas con clones de hibridoma positivos.

15 Los hibridomas inmortalizados que producen anticuerpos se pueden preparar a partir del animal inmunizado. Después de la inmunización, se sacrifica al animal y los linfocitos B esplénicos se fusionan con células de mieloma inmortalizadas como es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, supra. Preferiblemente, las células de mieloma no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Después de la fusión y la selección con antibiótico, los hibridomas se escrutan utilizando RGMa o una porción de la misma o una célula que expresa RGMa. También se prefiere que el escrutinio inicial se lleve a cabo utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), preferiblemente un ELISA. Un ejemplo de escrutinio con ELISA se proporciona en el documento de publicación PCT nº WO 00/37504.

20 Los hibridomas productores de anticuerpos anti-RGMa se seleccionan, se clonan y se escrutan adicionalmente en busca de características deseables, incluyendo un crecimiento robusto del hibridoma, producción elevada de anticuerpos y características deseables del anticuerpo, como se describe más adelante. Los hibridomas se pueden cultivar y expandir *in vivo* en animales singénicos, en animales que carecen de sistema inmunológico, por ejemplo, ratones sin pelo o en un cultivo celular *in vitro*. Los métodos de selección, clonación y expansión de los hibridomas son bien conocidos por los expertos normales en la técnica.

35 Preferiblemente, los hibridomas son hibridomas de rata. Alternativamente, los hibridomas se pueden producir en una especie no humana, que no sea rata, tal como ratones, ovejas, cerdos, cabras, vacas o caballos. También se prefieren los hibridomas humanos, en los que un mieloma no secretor humano se fusiona con una célula humana que expresa un anticuerpo anti-RGMa.

40 Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos se pueden generar por técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ se pueden producir mediante una escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas tales como papaína (para producir dos fragmentos Fab idénticos) o pepsina (para producir un fragmento F(ab')₂). Un fragmento F(ab')₂ de una molécula de IgG conserva los dos sitios de unión a antígeno de la molécula de IgG más grande ('parental'), incluyendo ambas cadenas ligeras (que contienen las regiones variables y constantes de la cadena ligera), los dominios CH1 de las cadenas pesadas y una región bisagra que forma un disulfuro de la molécula de IgG parental. Por consiguiente, un fragmento F(ab')₂ todavía es capaz de entrecruzarse con moléculas de antígeno como la molécula de IgG parental.

(2) Anticuerpos monoclonales anti-RGMa empleando SLAM.

Los anticuerpos recombinantes también se pueden generar a partir de linfocitos aislados, individuales, usando un procedimiento denominado en la técnica el método de anticuerpo con linfocitos seleccionados (SLAM), como se describe en los documentos de Patente de EE.UU. nº 5.627.052; Publicación PCT nº WO 92/02551; y Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 7843-7848 (1996). En este método, células individuales que secretan anticuerpos de interés, por ejemplo, linfocitos obtenidos a partir de cualquiera de los animales inmunizados, se escrutan usando un ensayo de placa hemolítica específica de antígeno, en donde el antígeno RGMa, una subunidad de RGMa o un fragmento de la misma, se acopla a glóbulos rojos de oveja usando un enlazador, tal como biotina y se usan para identificar células individuales que secretan anticuerpos con especificidad por RGMa. Después de la identificación de las células que secretan el anticuerpo de interés, se rescatan los ADNc de la región variable de la cadena pesada y ligera a partir de las células mediante transcriptasa inversa-PCR (RT-PCR) y esas regiones variables se pueden expresar entonces, en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (por ejemplo, regiones constantes humanas), en células hospedadoras de mamífero, tales como células COS o CHO. Las células hospeda-

doras transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, obtenidas a partir de los linfocitos seleccionados *in vivo*, se pueden someter después a un análisis y selección adicional *in vitro*, por ejemplo, mediante una selección de las células transfectadas para aislar las células que expresan anticuerpos de RGMa. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas se pueden manipular adicionalmente *in vitro*, tal como mediante el método de maduración por afinidad *in vitro*. Véase, por ejemplo, el documento de Publicación PCT nº WO 97/29131 y la Publicación PCT nº WO 00/56772.

(3) Anticuerpos monoclonales anti-RGMa empleando animales transgénicos.

Los anticuerpos también pueden ser producidos mediante una inmunización de un animal no humano que comprende algunos o todos, los loci de la inmunoglobulina humana, con un antígeno RGMa. En un ejemplo, el animal no humano es un ratón transgénico Xenomouse[®], una cepa de ratón modificado genéticamente que comprende fragmentos grandes de los loci de inmunoglobulina humana y es deficiente en la producción de anticuerpos de ratón. Véase, por ejemplo, Green et al., *Nature Genetics*, 7: 13-21 (1994) y los documentos de Patente de EE.UU. nº 5.916.771; 5.939.598; 5.985.615; 5.998.209; 6.075.181; 6.091.001; 6.114.598; y 6.130.364. Véanse también los documentos de Publicación PCT nº WO 91/10741; WO 94/02602; WO 96/34096; WO 96/33735; WO 98/16654; WO 98/24893; WO 98/50433; WO 99/45031; WO 99/53049; WO 00/09560; y WO 00/37504. El ratón transgénico Xenomouse[®] produce un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos totalmente humanos y genera anticuerpos monoclonales humanos específicos de antígeno. El ratón transgénico Xenomouse[®] contiene aproximadamente 80% del repertorio de anticuerpos humanos mediante la introducción de los fragmentos YAC de configuración de línea germinal de tamaño de megabases, de los loci de la cadena pesada humana y x loci de la cadena ligera humana. Véase, Mendez et al., *Nature Genetics*, 15: 146-156 (1997), Green y Jakobovits, *J. Exp. Med.*, 188: 483-495 (1998).

(4) Anticuerpos monoclonales anti-RGMa empleando bancos de anticuerpos recombinantes.

Se pueden emplear también métodos *in vitro* para preparar los anticuerpos de la invención, en donde un banco de anticuerpos se escruta para identificar un anticuerpo que tenga la especificidad de unión a RGMa deseada. Los métodos para tal escrutinio de bancos de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica e incluyen métodos descritos, por ejemplo, en los documentos de patente de EE.UU. nº 5.223.409 (Ladner et al.); Publicación PCT nº WO 92/18619 (Kang et al.); Publicación PCT nº WO 91/17271 (Dower et al.); Publicación PCT nº WO 92/20791 (Winter et al.); Publicación PCT nº WO 92/15679 (Markland et al.); Publicación PCT nº WO 93/01288 (Breitling et al.); Publicación PCT nº WO 92/01047 (McCafferty et al.); Publicación PCT nº WO 92/09690 (Garrard et al.); Fuchs et al., *Bio/Technology*, 9: 1369-1372 (1991); Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas*, 3: 81-85 (1992); Huse et al., *Science*, 246: 1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992); Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992); Garrard et al., *Bio/Technology*, 9: 1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991); Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991); Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. nº 2003/0186374; y la publicación PCT nº WO 97/29131.

El banco de anticuerpos recombinantes puede proceder de un sujeto inmunizado con RGMa o una porción de RGMa. Alternativamente, el banco de anticuerpos recombinantes puede proceder de un sujeto no tratado previamente, es decir, uno que no ha sido inmunizado con RGMa, tal como un banco de anticuerpos humanos de un sujeto humano que no ha sido inmunizado con RGMa humana. Los anticuerpos de la invención se seleccionan mediante el escrutinio del banco de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende RGMa humana para seleccionar de ese modo aquellos anticuerpos que reconocen RGMa. Los métodos para llevar a cabo dicho escrutinio y selección son bien conocidos en la técnica, tal como se describe en las referencias en el párrafo anterior. Para seleccionar anticuerpos de la invención que tienen afinidades de unión específicas hacia RGMa, tales como los que se disocian de RGMa humana con una constante de tasa K_{off} particular, el método conocido en la técnica de resonancia de plasmón de superficie se puede utilizar para seleccionar anticuerpos que tienen la constante de tasa K_{off} deseada. Para seleccionar anticuerpos de la invención que tienen una actividad neutralizante particular para hRGMa, tales como los que tienen una CI_{50} particular, se pueden emplear métodos estándar conocidos en la técnica para evaluar la inhibición de la actividad de RGMa.

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo aislado o a una porción que se une a antígeno del mismo, que se une a RGMa humana. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal.

Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención también pueden generarse usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se muestran en la superficie de partículas de fago que son portadoras de secuencias de polinucleótidos que los codifican. Un fago de este tipo se puede utilizar para mostrar dominios que se unen a antígeno expresados a partir de un repertorio o un banco de anticuerpos combinatorio (por ejemplo, humano o murino). Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés, se pueden seleccionar o identificar con un antígeno, por ejemplo, usando un antígeno marcado o un antígeno unido o capturado sobre una superficie sólida o una perla. Los fagos usados en estos métodos son normalmente fagos filamentosos que incluyen dominios de unión a fd y M13 expresados desde los fagos con dominios de anticuerpos Fab, Fv o Fv estabilizados con disulfuro, fusio-

5 nados recombinantemente con la proteína del gen III o el gen VIII del fago. Ejemplos de métodos de presentación en fagos que se pueden emplear para preparar los anticuerpos de la presente invención, incluyen los descritos en Brinkmann et al., J. Immunol. Methods, 182: 41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods, 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol., 24: 952-958 (1994); Persic et al., Gene, 187: 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology, 57: 191-280 (1994); documentos de Publicación PCT nº WO 92/01047; Publicaciones PCT nº WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Patentes de EE.UU. nº 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743; y 5.969.108.

10 Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección en fagos, las regiones del fago que codifican el anticuerpo se pueden aislar y usar para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado y expresar en cualquier hospedador deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias, por ejemplo, como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, las técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ también pueden emplearse usando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en el documento de publicación PCT nº WO 92/22324; Mullinax et al., BioTechniques, 12(6): 864-869 (1992); Sawai et al., Am. J. Reprod. Immunol., 34: 26-34 (1995); y Better et al., Science, 240: 1041-1043 (1988). Ejemplos de técnicas que se pueden emplear para producir Fvs de cadena sencilla y anticuerpos incluyen las descritas en los documentos de Patente de EE.UU. nº 4.946.778. y 5.258.498; Huston et al., Methods in Enzymology, 203: 46-88 (1991); Shu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7995-7999 (1993); y Skerra et al., Science, 240: 1038-1041 (1988).

20 Como alternativa al escrutinio de bancos de anticuerpos recombinantes mediante presentación en fagos, otras metodologías conocidas en la técnica para el escrutinio de grandes bancos combinatorios se pueden aplicar para identificar anticuerpos de la invención. Un tipo de sistema de expresión alternativo es uno en el que el banco de anticuerpos recombinantes se expresa como fusiones de ARN-proteína, como se describe en el documento de publicación PCT nº WO 98/31700 (Szostak y Roberts), y en Roberts y Szostak, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 12297-12302 (1997). En este sistema, se crea una fusión covalente entre un ARNm y el péptido o la proteína que lo codifica mediante una traducción *in vitro* de ARNm sintéticos que son portadores de puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, en su extremo 3'. Por lo tanto, un ARNm específico puede enriquecerse a partir de una mezcla compleja de ARNm (por ejemplo, un banco combinatorio) basándose en las propiedades del péptido o proteína codificados, por ejemplo, un anticuerpo o una porción del mismo, tal como la unión del anticuerpo o una porción del mismo, al antígeno con especificidad doble. Las secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos o porciones de los mismos, recuperadas por un escrutinio de dichos bancos, se pueden expresar por medios recombinantes como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, en células hospedadoras de mamífero) y, además, se pueden someter a una maduración por afinidad adicional mediante rondas adicionales de escrutinio de fusiones de ARNm-péptido en las que se han introducido mutaciones en la o las secuencias seleccionadas originalmente o por otros métodos para una maduración por afinidad *in vitro* de anticuerpos recombinantes, como se ha descrito anteriormente. Un ejemplo preferido de esta metodología, es la tecnología de visualización PROfusion.

40 En otro enfoque, los anticuerpos de la presente invención también se pueden generar usando métodos de presentación en levadura conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en levadura, se emplean métodos genéticos para amarrar dominios del anticuerpo a la pared celular de la levadura y presentarlos en la superficie de la levadura. En particular, una levadura de este tipo se puede utilizar para presentar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o un banco de anticuerpos combinatorio (por ejemplo, humano o murino). Ejemplos de métodos de presentación en levadura que se pueden utilizar para preparar los anticuerpos de la presente invención, incluyen los descritos en el documento de Patente de EE.UU. nº 6.699.658 (Wittrup et al.).

d. Producción de anticuerpos recombinantes de RGMA

45 Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir mediante cualquiera de una serie de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la expresión desde células hospedadoras, en donde el o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras se transfectan en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transfección" se entiende que incluyen una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procarionta o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar los anticuerpos de la invención en cualquiera de las células hospedadoras procariontas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas es preferible y lo más preferible en células hospedadoras de mamífero, debido a que con tales células eucariotas (y en particular las células de mamífero) es más probable que se ensamblen las células procariontas y que secreten un anticuerpo plegado de forma adecuada y que sea inmunológicamente activo.

60 Los ejemplos de células hospedadoras de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216-4220 (1980), que se utilizan con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp, J. Mol. Biol., 159: 601-621 (1982), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos se introducen en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras

durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales.

- 5 Las células hospedadoras también se pueden utilizar para producir fragmentos de anticuerpo funcionales, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que variaciones sobre el procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula hospedadora con ADN que codifica fragmentos funcionales de la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo de esta invención. La tecnología de ADN recombinante también se puede emplear para eliminar algún o todo, el ADN que codifica una o ambas de las cadenas ligeras y pesadas, que no sea necesario para la unión a los antígenos de interés. Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncadas también están incluidas en los anticuerpos de la invención. En adición, los anticuerpos bifuncionales se pueden producir de modo que una cadena pesada y una ligera sean un anticuerpo de la invención (es decir, se une a RGMa humana) y la otra cadena pesada y ligera son específicas de un antígeno distinto de RGMa humana, mediante retrocruzamiento de un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo mediante métodos convencionales de entrecruzamiento.

En un sistema preferido para una expresión recombinante de un anticuerpo o una porción del mismo que se une a un antígeno, de la invención, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo, se introduce en células dhfr-CHO mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo están cada uno ligado funcionalmente a elementos reguladores de potenciador CMV/promotor AdMLP para dirigir los niveles elevados de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también es portador de un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera a partir del medio de cultivo. Se emplean técnicas convencionales de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar los transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo a partir del medio de cultivo. Aún más, la descripción proporciona un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la invención cultivando una célula hospedadora descrita en este documento en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetiza un anticuerpo recombinante de la invención. El método puede comprender además aislar el anticuerpo recombinante desde el medio de cultivo.

(a) Anticuerpo humanizado

El anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo o una variante, un derivado, un análogo o una porción del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región estructural (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. El anticuerpo humanizado puede ser de un anticuerpo de una especie no humana que se une al antígeno deseado que tiene una o varias regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones estructurales de una molécula de inmunoglobulina humana.

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "sustancialmente" en el contexto de una CDR, se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de al menos uno y normalmente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv) en donde todas o sustancialmente todas las regiones CDRs se corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, un anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. Según un aspecto, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera, así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena ligera humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena pesada humanizada. En realizaciones específicas, un anticuerpo humanizado solo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o de una cadena pesada.

El anticuerpo humanizado se puede seleccionar a partir de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE y cualquier isotipo, incluyendo sin limitación IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo y dominios constantes particulares se pueden seleccionar para optimizar las funciones efectoras deseadas usando métodos bien conocidos en la técnica.

Las regiones estructurales y CDRs de un anticuerpo humanizado no tienen que corresponderse exactamente con las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR del anticuerpo donante o la región estructural de consenso pueden estar mutagenizadas mediante sustitución, inserción y/o deleción de al menos un residuo de aminoácido, de manera que el residuo de la CDR o de la región estructural en ese sitio no se corresponde con el anticuerpo donante o la región

estructural de consenso. En un ejemplo, este tipo de mutaciones, sin embargo, no será extenso. Por lo general, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos el 99% de los residuos de anticuerpos humanizados se corresponderán con los de las secuencias de FRs y CDRs parentales. Tal y como se utiliza en este documento, la expresión "región estructural de consenso" se refiere a la región estructural en la secuencia de inmunoglobulina de consenso. Tal y como se utiliza en este documento, la expresión "secuencia de inmunoglobulina de consenso" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos presentes más frecuentemente (o nucleótidos) en una familia de secuencias de inmunoglobulinas relacionadas (véase, Winnaker, From Genes a Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987)). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido presente con más frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos están presentes con la misma frecuencia, se pueden incluir ambos en la secuencia de consenso.

El anticuerpo humanizado se puede diseñar para minimizar una respuesta inmunológica no deseada frente a anticuerpos anti-humanos de roedor, lo que limita la duración y la eficacia de aplicaciones terapéuticas de esos restos en receptores humanos. El anticuerpo humanizado puede tener uno o varios residuos de aminoácidos introducidos en él procedentes de una fuente que no es humana. Estos residuos no humanos se denominan frecuentemente residuos "importados", que se toman normalmente a partir de un dominio variable. La humanización se puede llevar a cabo mediante la sustitución de secuencias de una región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente procedente de una especie no humana. Por ejemplo, véase el documento Patente de Estados Unidos nº 4.816.567.

El anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo humano en el que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. La humanización o la modificación genética de anticuerpos de la presente invención se puede realizar usando cualquier método conocido, tal como, pero no limitado a los descritos en los documentos de Patente de EE.UU. nº 5.723.323; 5.976.862; 5.824.514; 5.817.483; 5.814.476; 5.763.192; 5.723.323; 5.766.886; 5.714.352; 6.204.023; 6.180.370; 5.693.762; 5.530.101; 5.585.089; 5.225.539; y 4.816.567.

El anticuerpo humanizado puede conservar una alta afinidad hacia RGMa y otras propiedades biológicas favorables. El anticuerpo humanizado se puede preparar mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales, usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. Una inspección de estas presentaciones permite el análisis de la posible función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar con las secuencias del receptor y las importadas, de modo que se consiguen las características de anticuerpos deseadas, tales como una afinidad incrementada hacia RGMa. En general, los residuos de la región hipervariable pueden estar implicados directamente y de forma más sustancial en influir en la unión al antígeno.

Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos (también denominados en este documento "anticuerpos completamente humanos"). Por ejemplo, es posible aislar anticuerpos humanos a partir de bancos mediante PROfusión y/o tecnologías relacionadas con la levadura. Véanse los Ejemplos proporcionados a continuación. También es posible producir animales transgénicos (por ejemplo ratones que son capaces, después de una inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de una producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, la delección homocigota del gen de la región que se une a la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal, da como resultado una inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la variedad génica de la inmunoglobulina de la línea humana en tales ratones mutantes de la línea germinal, dará como resultado la producción de anticuerpos humanos después de la exposición al antígeno. Los anticuerpos humanizados o completamente humanos se pueden preparar de acuerdo con los métodos descritos en los documentos de Patente de EE.UU. nº 5.770.429; 5.833.985; 5.837.243; 5.922.845; 6.017.517; 6.096.311; 6.111.166; 6.270.765; 6.303.755; 6.365.116; 6.410.690; 6.682.928; y 6.984.720.

3. Composiciones farmacéuticas

El anticuerpo puede ser un componente en una composición farmacéutica. La composición farmacéutica también puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de la invención son para emplear en, pero no limitado a, el diagnóstico, la detección o el seguimiento de un trastorno, en la prevención, el tratamiento, la gestión o la mejora de un trastorno o uno o varios síntomas del mismo, y/o en investigación. En una realización específica, una composición comprende uno o varios anticuerpos de la invención. En otra realización, la composición farmacéutica comprende uno o varios anticuerpos de la invención y uno o varios agentes profilácticos o terapéuticos distintos de los anticuerpos de la invención, para tratar un trastorno en el que la actividad de una RGMa que es diana es perjudicial. En una realización adicional, los agentes profilácticos o terapéuticos son conocidos por ser útiles o porque han sido útiles o están siendo utilizados actualmente en la prevención, tratamiento, gestión o mejora de un trastorno o uno o varios síntomas del mismo. De acuerdo con estas

realizaciones, la composición puede comprender, además, un vehículo, un diluyente o un excipiente.

Los anticuerpos de la invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas, adecuadas para la administración a un sujeto. Normalmente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal y como se emplea en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o varios entre agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o la eficacia del anticuerpo.

En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno como se describe en este documento.

Se conocen diversos sistemas de entrega y se pueden utilizar para administrar uno o varios anticuerpos de la invención o la combinación de uno o varios anticuerpos de la invención y un agente profiláctico o un agente terapéutico útil para prevenir, gestionar, tratar o mejorar un trastorno o uno o varios síntomas del mismo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral o de otro tipo, etc. Los métodos de administración de un agente profiláctico o terapéutico de la invención incluyen, pero no se limitan a, la administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), la administración epidural, la administración intratumoral y la administración en la mucosa (por ejemplo, vías intranasales y orales). Además, se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y una formulación con un agente de aerosolización. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de EE.UU. n° 6.019.968; 5.985.320; 5.985.309; 5.934.272; 5.874.064; 5.855.913; 5.290.540; y 4.880.078; y las publicaciones PCT n° WO 92/19244; WO97/32572; WO97/44013; WO98/31346; y WO99/66903.

Por ejemplo, un anticuerpo de la invención, una terapia de combinación o una composición de la invención se puede administrar usando la tecnología de administración de fármacos por vía pulmonar Alkermes AIR[®] (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.). Los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención también se pueden administrar por vía intramuscular, intravenosa, intratumoral, oral, intranasal, pulmonar o subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

En casos específicos, puede ser deseable administrar los anticuerpos de la invención de forma local en el área que requiere un tratamiento; esto se puede conseguir mediante, por ejemplo y no a modo de limitación, infusión local, mediante inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante un material poroso o no poroso que incluye membranas y matrices, tales como membranas sialásticas, polímeros, matrices fibrosas (por ejemplo, Tissuel[®]) o matrices de colágeno. Por ejemplo, una cantidad eficaz de uno o varios anticuerpos de la invención se puede administrar localmente a la zona afectada a un sujeto para prevenir, tratar, gestionar y/o mejorar un trastorno o un síntoma del mismo. Además, una cantidad eficaz de uno o varios anticuerpos de la invención se puede administrar localmente en la zona afectada en combinación con una cantidad eficaz de una o varias terapias (por ejemplo, uno o varios agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de un anticuerpo de la invención de un sujeto para prevenir, tratar, controlar y/o mejorar un trastorno o uno o varios síntomas del mismo.

El anticuerpo también se puede entregar mediante un sistema de liberación controlada o sostenida. Por ejemplo, una bomba se puede usar para lograr una liberación controlada o sostenida (véase Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otro ejemplo, se pueden usar materiales poliméricos para lograr una liberación controlada o sostenida de las terapias (véase, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (compiladores), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (compiladores), Wiley, New York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; véase también Levy et al., 1985, Science 228:190; Doring et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105); los documentos de Patente de EE.UU. n° 5.679.377; Patente de EE.UU. n° 5.916.597; Patente de EE.UU. n° 5.912.015; Patente de EE.UU. n° 5.989.463; Patente de EE.UU. n° 5.128.326; Publicación PCT n° WO99/15154; y Publicación PCT n° WO99/20253. Ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etilen-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicolidas (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA) y poliortoésteres. En una realización particular, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, está exento de impurezas lixiviables, es estable al almacenamiento, estéril y biodegradable. En aún otra realización,

un sistema de liberación controlada o sostenida se puede situar en la proximidad de la diana profiláctica o terapéutica, requiriéndose de este modo solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

5 Los sistemas de liberación controlada se describen en la revisión de Langer (1990, *Science* 249: 1527-1533). Cualquier técnica conocida por un experto en el campo se puede utilizar para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o varios anticuerpos de la invención. Véanse, por ejemplo, los documentos Patente de EE.UU. n° 4.526.938, publicación PCT WO91/05548, publicación PCT WO96/20698, Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189; Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long- Circulating Emulsions", *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact Mater.* 24:853-854; y Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery", *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759- 760.

15 Cuando la composición es un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo* para favorecer la expresión de su anticuerpo codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se convierta en intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase el documento patente de EE.UU. n° 4.980.286) o por inyección directa o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o mediante recubrimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección o administrándolo junto con un péptido de tipo homeobox del cual se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868). Alternativamente, un ácido nucleico se puede introducir intracelularmente e incorporar dentro del ADN de la célula hospedadora para una expresión mediante recombinación homóloga.

25 Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Ejemplos de vías de administración incluyen, pero no se limitan a, parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (por ejemplo, inhalación), transdérmica (por ejemplo, tópica), transmucosal y rectal. En una realización específica, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para una administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal o tópica a los seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente de solubilización y un anestésico local tal como lignocaína para disminuir el dolor e el sitio de la inyección.

35 Si las composiciones de la invención se van a administrar por vía tópica, las composiciones se pueden formular en forma de pomada, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, spray, aerosol, solución, emulsión u otra forma bien conocida por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 19ª ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para formas de dosificación tópicas no pulverizables, las formas viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un vehículo o uno o varios excipientes compatibles con una aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica mayor que el agua, se emplean normalmente. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, ungüentos y similares, los cuales, si se desea, están esterilizados o mezclados con agentes auxiliares (por ejemplo, agentes conservantes, estabilizantes, humectantes, tampones o sales) para influir sobre diversas propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópicas adecuadas incluyen preparaciones en aerosol, pulverizables en las que el ingrediente activo, por ejemplo, en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un agente volátil presurizado (por ejemplo, un propulsor gaseoso, tal como freón) o en un frasco comprimible. También se pueden añadir agentes hidratantes o humectantes a las composiciones farmacéuticas y a las formas de dosificación, si se desea. Ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

50 Si la composición se va a administrar por vía intranasal, la composición se puede formular en forma de aerosol, spray, vaporización o en forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para uso de acuerdo con la presente invención se pueden administrar convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos (compuestos, por ejemplo, de gelatina) para uso en un inhalador o un insuflador, se pueden formular de modo que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

60 Si la composición se va a administrar por vía oral, las composiciones se pueden formular oralmente en forma de comprimidos, cápsulas, sellos, cápsulas de gel, soluciones, suspensiones y similares. Los comprimidos o cápsulas se pueden preparar por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de

magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico). Los comprimidos se pueden recubrir por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden estar en forma de, pero no limitadas a, soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para constituir con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tamponadas, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral se pueden formular adecuadamente para una liberación lenta, liberación controlada o liberación sostenida de uno o varios agentes profilácticos o terapéuticos.

Para la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, las composiciones se pueden formular con un agente de aerosolización. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de EE.UU. nº 6.019.968; 5.985.320; 5.985.309; 5.934.272; 5.874.064; 5.855.913; 5.290.540; y 4.880.078; y las publicaciones PCT nº WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903. Específicamente, un anticuerpo de la invención, una terapia de combinación y/o una composición se pueden administrar usando tecnología de administración de fármacos por vía pulmonar Alkermes AIR[®] (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

Las composiciones se pueden formular para una administración parenteral mediante inyección (por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria (por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis) con un conservante añadido. Las composiciones pueden estar en formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para una constitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril exenta de pirógenos) antes del uso. Adicionalmente, las composiciones se pueden formular como preparaciones en depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, las composiciones se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados escasamente solubles (por ejemplo, como una sal poco soluble).

Las composiciones se pueden formular como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como las obtenidas a partir de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. y las formadas con cationes tales como las obtenidas a partir de hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio, hierro, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

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

En particular, la invención proporciona también uno o varios de los anticuerpos o composiciones farmacéuticas, de la invención envasados en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o sobre, que indica la cantidad de anticuerpo. En una realización, uno o varios de los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de la invención se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco o un concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente cerrado y se puede reconstituir (por ejemplo, con agua o solución salina) hasta la concentración apropiada para la administración a un sujeto. En una realización, uno o varios de los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de la invención se suministran como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente sellado con una dosificación unitaria de al menos 5 mg, por ejemplo al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg o al menos 100 mg. Los anticuerpos liofilizados o las composiciones farmacéuticas de la invención se deben almacenar a entre 2°C y 8°C, en su envase original y los anticuerpos o las composiciones farmacéuticas de la invención se deben administrar dentro de 1 semana, por ejemplo, dentro de 5 días, dentro de 72 horas, dentro de 48 horas, dentro de 24 horas, dentro de 12 horas, dentro de 6 horas, dentro de 5 horas, dentro de 3 horas o dentro de 1 hora después de haber sido reconstituidos. En una realización alternativa, uno o varios de los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de la invención se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente sellado que indica la cantidad y la concentración del anticuerpo. En una realización adicional, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un recipiente herméticamente sellado en al menos 0,25 mg/ml, por ejemplo, al menos 0,5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml. La forma líquida se debe almacenar a entre 2°C y 8°C en su envase original.

Los anticuerpos de la invención se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para una administración parenteral. En un aspecto, los anticuerpos se pueden preparar como una solución inyectable que contiene 0,1-250 mg de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta por una forma de dosificación líquida o liofilizada en un vial Flint o ámbar, una ampolla o una jeringa precargada. El tampón puede ser L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10 mM, a pH 5,0 a 7,0 (óptimamente pH 6,0). Otros tampones adecuados incluyen pero no se limitan a, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. El cloruro de sodio se puede utilizar para modificar la tonicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Se pueden incluir crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 0-10% de sacarosa (de manera óptima 0,5-1,0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Los agentes de carga se pueden incluir para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 1-10% de manitol (de manera óptima 2-4%). Los agentes estabilizadores se pueden utilizar tanto en las formas de dosificación líquidas como las liofilizadas, principalmente L-metionina 1-50 mM (de manera óptima 5-10 mM). Otros agentes de carga adecuados incluyen glicina, arginina, se pueden incluir como 0-0,05% de polisorbato-80 (de manera óptima 0,045-0,01%). Los tensioactivos adicionales incluyen pero no se limitan a polisorbato 20 y tensioactivos BRIJ. La composición farmacéutica que comprende los anticuerpos de la invención preparados como una solución inyectable para una administración parenteral, puede comprender además un agente útil como adyuvante, tal como los que se utilizan para aumentar la absorción o dispersión del anticuerpo. Un adyuvante particularmente útil es la hialuronidasa, tal como Hylenex[®] (hialuronidasa humana recombinante). La adición de hialuronidasa en la solución inyectable mejora la biodisponibilidad humana después de una administración parenteral, particularmente una administración subcutánea. También permite mayores volúmenes en el sitio de la inyección (es decir, más de 1 ml) con menos dolor y malestar, y una incidencia mínima de reacciones en el sitio de la inyección. (Véase el documento de Publicación de Solicitud Internacional n° WO 04/078140 y la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. n° US2006104968).

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

Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada, adecuada para una alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (es decir, una proteína de unión, por ejemplo un anticuerpo, de la presente invención) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con un ingrediente o una combinación de ingredientes mencionados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los mencionados anteriormente. En el caso de polvos estériles, liofilizados para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación comprenden el secado al vacío y el secado por pulverización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución del mismo previamente esterilizada por filtración. La fluidez apropiada de una solución se puede conservar, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Una absorción prolongada de composiciones inyectables se puede provocar incluyendo en la composición, un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

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

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se puede administrar oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El anticuerpo (y otros ingredientes, si se desea) también pueden estar incluidos en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimidos en comprimidos o incorporados directamente en la dieta del sujeto. Para una administración terapéutica oral, el anticuerpo se puede incorporar con excipientes y usar en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un anticuerpo de la invención mediante una administración distinta a la parenteral, puede ser necesario recubrir el anticuerpo con, o coadministrar el anticuerpo con, un material para evitar

su inactivación.

Compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se coformula y/o coadministra con uno o varios agentes terapéuticos adicionales que son útiles para el tratamiento de trastornos o enfermedades descritas en el presente documento. Por ejemplo, un anticuerpo anti-RGMA de la invención, se puede coformular y/o coadministrar con uno o varios anticuerpos adicionales que se unen a otras dianas (por ejemplo, anticuerpos que se unen a otros antígenos solubles o que se unen a moléculas de la superficie celular). Además, uno o varios anticuerpos de la invención se pueden usar en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Tales terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosis menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando de este modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención está ligado a un vehículo que extiende la semivida, conocido en la técnica. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, el dominio Fc, polietilenglicol y dextrano. Tales vehículos se describen, por ejemplo, en el documento de solicitud de EE.UU. n° de serie 09/428.082 y la Solicitud PCT publicada n° WO 99/25044.

Las secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un anticuerpo de la invención se pueden administrar para tratar, prevenir, gestionar o mejorar un trastorno o uno o varios síntomas del mismo por medio de terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. Los ácidos nucleicos pueden producir su anticuerpo codificado de la invención que media en un efecto profiláctico o terapéutico.

Cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica se puede emplear de acuerdo con la presente invención. Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, *Science* 260:926- 932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; May, 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que se pueden utilizar, se describen en Ausubel et al. (compiladores), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990). Una descripción detallada de diversos métodos de terapia génica se describe en el documento USA20050042664 A1.

Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar solos o en combinación para tratar enfermedades o afecciones asociadas con la degeneración de las neuritas, tales como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, demencia, enfermedad de Parkinson, una lesión traumática en el sistema nervioso central o cualquier otra enfermedad o afección asociada con RGMA.

Debe entenderse que los anticuerpos de la invención se pueden usar solos o en combinación con uno o varios agentes adicionales, por ejemplo, un agente terapéutico (por ejemplo, una molécula pequeña o biológica), en donde dicho agente adicional es seleccionado por el experto en la materia para su finalidad prevista. Por ejemplo, el agente terapéutico adicional puede ser un inmunosupresor o un agente que trata uno o varios síntomas asociados con la esclerosis múltiple. El fármaco adicional puede ser un interferón beta, como Avonex, Betaseron, Extavia y Rebif, pueden disminuir la velocidad a la que los síntomas de la esclerosis múltiple empeoran con el tiempo. El agente adicional puede ser Glatiramer (Copaxone), que puede bloquear el ataque del sistema inmune a la mielina. El agente adicional puede ser Fingolimod (Gilenya), que puede atrapar células inmunes en los ganglios linfáticos. El agente adicional puede ser Natalizumab (Tysabri), que puede interferir con el movimiento de células inmunes potencialmente dañinas desde el torrente sanguíneo al cerebro y la médula espinal. El fármaco adicional puede ser Mitoxantrona (Novantrone), que es un fármaco inmunosupresor.

El agente terapéutico adicional puede ser un "fármaco potenciador cognitivo", que es un fármaco que mejora capacidades cognitivas humanas deterioradas del cerebro (es decir, pensamiento, aprendizaje y memoria). Los fármacos que mejoran el aspecto cognitivo funcionan mediante una alteración de la disponibilidad de los agentes neuroquímicos (por ejemplo, neurotransmisores, enzimas y hormonas), mediante una mejora del suministro de oxígeno, mediante una estimulación del crecimiento de los nervios o mediante una inhibición del daño en los nervios. Ejemplos de fármacos potenciadores cognitivos incluyen un compuesto que aumenta la actividad de la acetilcolina tal como, pero no limitado a, un agonista del receptor de acetilcolina (por ejemplo, un modulador agonista o alostérico del receptor nicotínico α -7 agonista, un modulador agonista o alostérico del receptor nicotínico α 4 β 2), un inhibidor de acetilcolinesterasa (por ejemplo, donepezil, rivastigmina y galantamina), un inhibidor de la butirilcolinesterasa, un antagonista del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) (p. ej., memantina), un agonista de una proteína neuroprotectora dependiente de la actividad (ADNP), un agonista del receptor de serotonina 5-HT1A (p. ej., xaliproden), un agonista del receptor de 5-HT4, un antagonista del receptor de 5-HT6, un antagonista del receptor de serotonina 1A, un antagonista del receptor de histamina H3, un inhibidor de calpaína, una proteína o agonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un factor de crecimiento trófico, un compuesto anti-apoptótico, un activador del receptor de glutamato de tipo AMPA, un bloqueador o modulador del canal de calcio de tipo L o N, un bloqueador del canal de potasio, un activador del factor inducible por hipoxia (HIF), un inhibidor de prolil 4-hidroxilasa de HIF, un agente antiinflamatorio, un inhibidor del péptido A β amiloide o la placa amiloide, un inhibidor de la hiperfosforilación

de tau, un inhibidor de la fosfodiesterasa 5 (p. ej., tadalafil, sildenafil), un inhibidor de la fosfodiesterasa 4, un inhibidor de la monoamina oxidasa o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Ejemplos específicos de tales fármacos potenciadores cognitivos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la colinesterasa tales como donepezil (Aricept®), rivastigmina (Exelon®), galantamina (Reminyl®), antagonistas de N-metil-D-aspartato tales como memantina (Namenda®). Al menos un fármaco potenciador cognitivo se puede administrar simultáneamente con los anticuerpos de la presente invención o secuencialmente con los anticuerpos de la presente invención (y en cualquier orden), incluyendo aquellos agentes reconocidos actualmente o en el futuro, por ser útiles para tratar la enfermedad o la afección que se está tratando con un anticuerpo de la presente invención). Adicionalmente, se cree que las combinaciones descritas en este documento pueden tener efectos aditivos o sinérgicos cuando se usan en el tratamiento anteriormente descrito. El agente adicional también puede ser un agente que imparte un atributo beneficioso a la composición terapéutica, por ejemplo, un agente que afecta a la viscosidad de la composición.

Debe entenderse además que las combinaciones son aquellas combinaciones útiles para su fin previsto. Los agentes indicados anteriormente son para fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Las combinaciones pueden comprender un anticuerpo y al menos un agente adicional seleccionado a partir de la lista más abajo. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales, si la combinación es de un modo que la composición formada puede realizar su función prevista.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo puede estar determinada por una persona experta en la técnica y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que los efectos tóxicos o perjudiciales, en su caso, del anticuerpo están compensados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, puesto que una dosis profiláctica se emplea en los sujetos antes o durante un estadio temprano de enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según esté indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria tal y como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se van a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas de dosificación unitarias están dictadas por o dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se va a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formulación de un compuesto activo de este tipo para el tratamiento de una sensibilidad en individuos.

Un intervalo no limitativo, ejemplar para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del anticuerpo es una dosis desde entre 0,1 y 200 mg/kg, por ejemplo entre 0,1 y 10 mg/kg. La cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del anticuerpo puede ser desde entre 1 y 200 mg/kg, 10 y 200 mg/kg, 20 y 200 mg/kg, 50 y 200 mg/kg, 75 y 200 mg/kg, 100 y 200 mg/kg, 150 y 200 mg/kg, 50 y 100 mg/kg, 5 y 10 mg/kg o 1 y 10 mg/kg. Se observará que los valores de la dosificación pueden variar con el tipo y gravedad de la afección que se va a aliviar. Además, la dosis de anticuerpo puede ser determinada por una persona experta en la técnica y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. La dosis es también una en la que los efectos tóxicos o perjudiciales, en su caso, del anticuerpo están compensados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Se entiende además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar con el transcurso del tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones y que los intervalos de dosificación establecidos en este documento son únicamente a modo de ejemplo.

4. Método de tratamiento, prevención, modulación o atenuación de una enfermedad asociada con la degeneración de las neuritas

En cualquier sujeto, se puede realizar una evaluación sobre si el sujeto tiene un trastorno degenerativo de las neuritas. La evaluación puede indicar el curso apropiado de una terapia, como terapia preventiva, terapia de mantenimiento o terapia modulativa. En consecuencia, se proporciona en este documento un método para tratar, prevenir, modular o atenuar una enfermedad/trastorno de degeneración de las neuritas. El anticuerpo se puede administrar a un sujeto que lo requiera. El anticuerpo se puede administrar en una cantidad terapéuticamente eficaz.

En general, la dosificación de anticuerpos administrados variará dependiendo de factores tales como la edad del

paciente, el peso, la altura, el sexo, el estado médico general y el historial médico anterior. Normalmente, es deseable proporcionar al receptor una dosificación de componente de anticuerpo, inmunoconjugado o proteína de fusión que esté en el intervalo desde aproximadamente 1 pg/kg a 10 mg/kg (cantidad de agente/peso corporal del paciente), aunque una dosificación menor o mayor también se puede administrar según dicten las circunstancias. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, un único bolo se puede administrar, varias dosis divididas se pueden administrar a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según esté indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria tal y como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se van a someter a ensayo; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas de dosificación unitaria de la presente invención vienen dictadas y son directamente dependientes de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se quiere conseguir y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de formulación de compuestos, tal como un compuesto activo para el tratamiento de una sensibilidad en los individuos.

Un intervalo a modo de ejemplo, no limitativo para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención, es de 0,1-20 mg/kg más preferiblemente 0,5-10 mg/kg. Se observará que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección que se va a aliviar. Se entiende además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar con el tiempo según las necesidades individuales y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación establecidos en este documento son únicamente ejemplares.

La administración de anticuerpos a un paciente puede ser por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleurar, intratecal, intraocular, intravítrea, por perfusión a través de un catéter regional o mediante inyección intralesional directa. Cuando se administran proteínas terapéuticas mediante inyección, la administración puede ser por infusión continua o mediante bolos únicos o múltiples. La inyección intravenosa proporciona un modo útil de administración debido a la eficacia de la circulación para distribuir rápidamente los anticuerpos. El anticuerpo se puede administrar oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El anticuerpo y otros ingredientes, si se desea, pueden estar encerrados en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimidos en forma de comprimidos, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares.

Los anticuerpos anti-RGMA se pueden administrar en dosis bajas de proteína, tales como 20 miligramos hasta 2 gramos de proteína por dosis, administrados una vez o varias veces, por vía parenteral. Alternativamente, los anticuerpos se pueden administrar en dosis de 20 a 1000 miligramos de proteína por dosis, o 20 a 500 miligramos de proteína por dosis, o 20 a 100 miligramos de proteína por dosis.

Los anticuerpos se pueden administrar solos o se pueden conjugar con liposomas y se pueden formular de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, con lo cual los anticuerpos se combinan en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" puede ser tolerado por un paciente receptor. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19ª ed. (1995).

Para los fines de una terapia, los anticuerpos se administran a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una que es fisiológicamente significativa. El anticuerpo es fisiológicamente significativo si su presencia produce un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor. En el presente contexto, el anticuerpo puede ser fisiológicamente significativo si su presencia da como resultado, por ejemplo, una disminución de la secreción de interferón- γ (INF- γ), interleucina-2 (IL-2), IL-4 y/o IL-17 desde los linfocitos T CD4⁺. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia da como resultado, por ejemplo, una reducción de las respuestas proliferativas y/o la expresión de citocinas proinflamatorias en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).

Los métodos de tratamiento adicionales pueden ser empleados para controlar la duración de la acción de un anticuerpo en una aplicación terapéutica. Preparaciones de liberación controlada se pueden preparar mediante el uso de polímeros para formar complejos o adsorber el anticuerpo. Por ejemplo, los polímeros biocompatibles incluyen matrices de poli(acetato de etileno-co-vinilo) y matrices de un copolímero de polianhídrido de un dímero de ácido esteárico y ácido sebáico. Sherwood et al., *Bio/Technology* 10: 1446 (1992). La tasa de liberación de un anticuerpo desde una matriz de este tipo depende del peso molecular de la proteína, la cantidad de anticuerpo dentro de la matriz y el tamaño de las partículas dispersadas. Saltzman et al., *Biophys. J.* 55: 163 (1989); Sherwood et al., *supra*. Otras formas de dosificación sólida se describen en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19ª ed. (1995).

60 a. Trastornos/Enfermedades degenerativas de neuritis

El trastorno/enfermedad de las neuritis puede ser cualquier enfermedad o trastorno en el que exista un daño de las neuritis y una función sináptica comprometida. Este daño y función comprometida pueden ser el resultado de nervios que carecen de una mielinización suficiente y/o una transección de los axones. El trastorno o enfermedad degenerativa de las neuritis puede ser esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y otras enfermedades de las neuronas motoras, enfermedad de Huntington, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Gaucher, síndrome de Hurler, enfermedades desmielinizantes inflamatorias idiopáticas, falta de vitamina B12, mielínolisis central pontina, tabes dorsal, mielitis transversa, enfermedad de Devic, leucoencefalopatía multifocal progresiva, neuritis óptica y otras retinopatías asociadas con la degeneración de las neuritis, como glaucoma, neuropatía diabética y degeneración macular dependiente de la edad, lesión traumática en el sistema nervioso central o leucodistrofias, por ejemplo. El trastorno o la enfermedad degenerativa de las neuritis puede ser el resultado de fibras nerviosas que carecen de una envoltura suficiente de capas de tejido compuesto por una grasa (lipoproteína) llamada mielina. Estas capas forman la vaina de mielina. La vaina de mielina puede permitir que los impulsos eléctricos sean conducidos a lo largo de la fibra nerviosa con velocidad y precisión. Cuando la vaina de mielina está dañada o no está presente, los nervios no conducen los impulsos eléctricos normalmente. A veces, como resultado de la vaina de mielina dañada o que falta, las fibras nerviosas también pueden estar dañadas.

Los niños pequeños pueden carecer normalmente de vainas de mielina maduras. Como resultado, sus movimientos son bruscos, sin coordinación y torpes. A medida que se desarrollan las vainas de mielina, los movimientos se vuelven más suaves, más voluntarios y más coordinados. Sin embargo, las vainas de mielina no se desarrollan normalmente en niños con ciertas enfermedades, como la enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Gaucher y el síndrome de Hurler.

En los adultos, la vaina de mielina se puede destruir por una apoplejía, inflamación, trastornos inmunológicos, trastornos metabólicos y deficiencias nutricionales (tales como la falta de vitamina B12). Venenos, fármacos (tales como el antibiótico etambutol) y un abuso excesivo de alcohol pueden dañar o destruir la vaina de mielina. Si la vaina es capaz de una reparación y de regenerarse a sí misma, la función nerviosa normal puede regresar. Sin embargo, si la vaina está gravemente dañada, la fibra nerviosa subyacente puede morir. Debido a que las fibras nerviosas en el sistema nervioso central (cerebro y médula espinal) rara vez se regeneran, un daño de este tipo es irreversible.

Algunos trastornos degenerativos de las neuritis que causan una desmielinización afectan principalmente al sistema nervioso central. Otros afectan principalmente a los nervios en otras partes del cuerpo. Los trastornos degenerativos de las neuritis que causan una desmielinización en el sistema nervioso central y tienen una causa desconocida, se denominan trastornos desmielinizantes primarios. La esclerosis múltiple es el más común de estos trastornos.

(1) Esclerosis múltiple

El curso clínico de la EM se puede dividir en cuatro categorías principales (o subtipos): recurrente remitente (EMRR), progresiva secundaria (EMPS), progresiva primaria (EMPP) y progresiva recurrente (EMPR). Los pacientes que tienen recaídas clínicas cada pocos meses o años con periodos de estabilidad clínica definen la EMRR. La EMRR puede ser dos veces más común en mujeres que en hombres en la segunda o tercera década de la vida. En contraste con la EMRR, los pacientes con EMPS muestran un deterioro progresivo entre las recaídas. Los pacientes con EMRR se pueden convertir en EMPS con el tiempo caracterizándose por una disminución gradual de la función neurológica. Aproximadamente el 15% de los pacientes con EM tienen EMPP caracterizada por una aparición tardía y un deterioro inexorable de la función neurológica desde la aparición de la enfermedad. La EM benigna se define arbitrariamente como aquellos pacientes con EMRR que después de 15 años del diagnóstico inicial siguen siendo móviles y muestran carencias leves (Escala Ampliada del Estado de Discapacidad [EDSS, por sus siglas en inglés]). Por lo general, estos pacientes muestran poca o ninguna progresión después de su ataque inicial y no requieren una intervención terapéutica; sin embargo, no es posible diagnosticar esta forma de EM hasta 5 años después de la aparición de la EM.

(2) Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson está muy extendida por todo el hemisferio occidental y fue indicada por primera vez por el médico James Parkinson en 1817. La enfermedad de Parkinson se puede detectar por primera vez como un temblor en una extremidad y en última instancia puede progresar para incluir otras tres manifestaciones: (i) rigidez, que se caracteriza por movimiento de tipo "rueda dentada" y la rigidez de "tubo de plomo"; (ii) bradicinesia o lentitud en el movimiento e (iii) inestabilidad postural asociada con una postura encorvada y marcha reducida. Estos movimientos alterados son características de una disfunción motora, pero además también pueden ser un impedimento mental en hasta el 40% de todos los pacientes de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson puede estar causada por un estado carente de levodopamina en el cerebro. Más específicamente, la levodopamina puede inducir discinesia en pacientes con Parkinson y produce una desnervación de la sustancia negra. Hasta la fecha, la ciencia médica no ha encontrado un sustrato que permita una forma inyectable de levodopa que llegue hasta el cerebro y cruce con éxito la barrera hematoencefálica. La terapia de reemplazo de dopamina actual se dirige a una sustitución directa o imitación de la acción en los sitios de receptores de dopamina en el cerebro. Mientras que la terapia con levodopa puede crear inicialmente algunos cambios beneficiosos, estos

cambios pueden disminuir con el tiempo y producir otros problemas tales como una perturbación grave del sueño, discinesias y náusea constante. Los enfoques médicos a la enfermedad de Parkinson incluyen una destrucción quirúrgica del tejido del cerebro y la inserción de microelectrodos (estimulación eléctrica del cerebro profundo) en las porciones afectadas del cerebro. La inserción de electrodos tiene la ventaja de ser reversible. Estas intervenciones, sin embargo, son generalmente transitorias y no producen un cambio permanente en el estado parkinsoniano ni revierten los efectos de la enfermedad.

La enfermedad de Parkinson puede ser un trastorno multifactorial, neurodegenerativo, que evoluciona debido a una oxidación excesiva. La sustancia negra es susceptible al daño oxidativo, lo que apoya esta teoría de la formación de la enfermedad de Parkinson. Anomalías de la fosforilación oxidativa alteran las mitocondrias de la sustancia negra e intensifican la generación de radicales libres.

(3) Lesión causada por especies de oxígeno reactivas (radicales libres)

Las especies de oxígeno reactivas (EOR) pueden atacar varios tipos de tejidos y una exposición crónica a EOR puede atenuar diversas funciones biológicas y aumentar el riesgo de varios tipos de trastornos graves, incluyendo trastornos y enfermedades degenerativas de las neuritas. Las EOR pueden atacar las neuronas e inducir la muerte celular. Por ejemplo, el tratamiento de las neuronas con bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno puede inducir una lesión de las neuritas influyendo sobre cambios perjudiciales en la morfología de las neuritas, a veces denominados rosarios de neuritas. Los rosarios de neuritas pueden ser uno de los acontecimientos tempranos de la degeneración neuronal antes de la inducción de la muerte de las neuronas tratadas con peróxido de hidrógeno.(4)

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa principal de demencia en los ancianos. A pesar de que existen formas genéticas raras de EA, la mayoría de los pacientes se clasifican por tener EA esporádica, ya que no se identifican generalmente antecedentes familiares. Patológicamente, la EA se caracteriza por una degeneración neuronal y sináptica con un mayor número de placas seniles y ovillos neurofibrilares, en comparación con individuos no dementes de edad comparable.

Las placas seniles, características de la enfermedad de Alzheimer, se componen de un núcleo central de beta-amiloide agregada, un producto de la degradación de la proteína precursora amiloide (APP). Los ovillos neurofibrilares son estructuras similares a hilos intracelulares insolubles, compuestos por una forma hiperfosforilada de una proteína llamada tau, que se asocia con los microtúbulos.

Cortes post-mortem de tejido cerebral de víctimas de la enfermedad de Alzheimer muestran la presencia de amiloide en forma de núcleos extracelulares proteináceos de las placas neuríticas que son característicos de la EA. Los núcleos amiloides de estas placas neuríticas están compuestos de una proteína llamada β -amiloide, que está dispuesta en una configuración predominantemente de lámina beta plegada. Mori et al., *Journal of Biological Chemistry* 267: 17082 (1992); Kirschner et al., *PNAS* 83: 503 (1986). Las placas neuríticas son un aspecto temprano e invariable de la enfermedad. Mann et al., *J. Neurol. Sci.* 89: 169; Mann, *Mech. Ageing Dev.* 31: 213 (1985); Terry et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 46: 262 (1987).

Un depósito inicial de A β puede tener lugar antes de que se noten los síntomas clínicos. Los "criterios mínimos microscópicos" recomendados en la actualidad para el diagnóstico de la EA, se basan en el número de placas neuríticas que se encuentran en el cerebro. Khachaturian, *Arch. Neurol.*, supra (1985). Por desgracia, la evaluación de los recuentos de placas neuríticas debe retrasarse hasta después de la muerte.

Las placas neuríticas que contienen amiloide son una característica prominente de áreas selectivas del cerebro en la EA, así como en el síndrome de Down y en personas homocigóticas para el alelo E4 de la apolipoproteína que son muy propensas a desarrollar EA. Corder et al., *Science* 261: 921 (1993); Divry, P., *J. Neurol. Psych.* 27: 643-657 (1927); Wisniewski et al., in Zimmerman, H. M. (compilador): *PROGRESS IN NEUROPATHOLOGY* (Grune y Stratton, N.Y. 1973) pp. 1-26. El amiloide cerebral se demuestra fácilmente mediante una tinción de secciones de cerebro con tioflavina S o rojo Congo. Puchtler et al., *J. Histochem. Cytochem.* 10: 35 (1962). El amiloide teñido con rojo Congo se caracteriza por una apariencia dicroica, mostrando un color de polarización amarillo-verde. La unión dicroica es el resultado de la estructura de lámina beta plegada de las proteínas amiloides. Glenner, G. N. *Eng. J. Med.* 302: 1283 (1980). Una explicación detallada de la bioquímica e histoquímica del amiloide se puede encontrar en Glenner, N. *Eng. J. Med.*, 302: 1333 (1980).

(5) Lesión traumática del sistema nervioso central

La incidencia de un traumatismo craneoencefálico (TCE) en los Estados Unidos se estima de forma conservadora en más de 2 millones de personas al año, con aproximadamente 500.000 hospitalizaciones. De estas, aproximadamente 70.000 a 90.000 supervivientes de lesiones en el cráneo quedan permanentemente incapacitados.

Las vías neuronales en el sistema nervioso central de un sujeto tienen riesgo si las neuronas están sometidas a un traumatismo mecánico o químico o a una degeneración neuropática suficiente para que las neuronas tengan riesgo de morir. Una gran cantidad de neuropatías, algunas de las cuales afectan solo a una subpoblación o a un sistema

de neuronas en los sistemas nerviosos periférico o central, han sido identificadas hasta la fecha. Las neuropatías, que pueden afectar a las propias neuronas o a las células gliales asociadas, pueden ser el resultado de una disfunción celular metabólica, una infección, una exposición a agentes tóxicos, una disfunción por autoinmunidad, malnutrición o isquemia. En algunos casos la disfunción celular se cree que induce la muerte celular directamente. En otros casos, la neuropatía puede inducir una necrosis tisular suficiente para estimular al sistema inmune/inflamatorio corporal y a los mecanismos de la respuesta inmune del organismo para la lesión neuronal inicial que destruye después las neuronas y la ruta definida por esas neuronas.

b. Sujeto

El sujeto puede ser un mamífero, que puede ser un ser humano. El sujeto puede desarrollar o tener riesgo de desarrollar un trastorno o una enfermedad degenerativa de las neuritas. El sujeto puede estar ya en tratamiento contra un trastorno o una enfermedad degenerativa de las neuritas.

5. Método de diagnóstico

En este documento se proporciona un método para determinar si un sujeto tiene una enfermedad o un trastorno degenerativo de las neuritas. El nivel de RGMa asociada a la membrana se puede medir y comparar con un nivel de RGMa en una muestra de control. La muestra de control puede proceder de un tejido normal. Un nivel alterado de RGMa en comparación con el control puede indicar que el sujeto tiene una enfermedad o trastorno degenerativo de las neuritas. Por ejemplo, un nivel incrementado de RGMa, en comparación con un control normal, puede indicar que el sujeto tiene una enfermedad o trastorno degenerativo de las neuritas. El nivel de RGMa se puede medir usando los anticuerpos descritos en este documento.

a. Muestra

La muestra puede ser cualquier muestra de tejido del sujeto. La muestra puede comprender proteína del sujeto. La muestra puede ser suero sanguíneo, plasma o una biopsia de tejido. La muestra se puede utilizar directamente tal y como se obtiene del sujeto o después de un pretratamiento para modificar una característica de la muestra. El pretratamiento puede incluir una extracción, concentración, inactivación de componentes interferentes y/o una adición de reactivos.

Cualquier tipo de célula, tejido o fluido corporal se puede utilizar para obtener una muestra. Tales tipos de células, tejidos y fluidos pueden incluir secciones de tejidos tales como muestras de una biopsia y autopsia, secciones congeladas tomadas para fines histológicos, sangre, plasma, esputo, suero, heces, lágrimas, mucosidad, saliva, cabello y piel. Los tipos de células y tejidos pueden incluir también líquido linfático, líquido ascético, líquido ginecológico, orina, líquido peritoneal, líquido cefalorraquídeo, un líquido recogido de un aclarado vaginal o un líquido recogido por lavado vaginal. Un tipo de tejido o de célula se puede proporcionar mediante la toma de una muestra de células de un animal, pero también se puede lograr mediante el uso de células aisladas previamente (por ejemplo, aisladas por otra persona, en otro momento y/o para otro fin). También se pueden utilizar tejidos de archivo, tales como los que tienen historia de tratamiento o resultado. La purificación de proteínas puede no ser necesaria.

b. Detección de RGMa

La presencia o la cantidad de RGMa presente en una muestra corporal se puede determinar fácilmente, por ejemplo, mediante espectrometría de masas, inmunoensayos o inmunohistoquímica (por ejemplo, con secciones de biopsias de tejido) utilizando los anticuerpos descritos en este documento (monoclonales o policlonales) o fragmentos de los mismos contra RGMa. Los anticuerpos anti-RGMa y fragmentos de los mismos se pueden producir como se ha descrito anteriormente. Otros métodos de detección incluyen los descritos, por ejemplo, en los documentos de Patente de EE.UU. nº 6.143.576; 6.113.855; 6.019.944; 5.985.579; 5.947.124; 5.939.272; 5.922.615; 5.885.527; 5.851.776; 5.824.799; 5.679.526; 5.525.524; y 5.480.792.

(1) Inmunoensayo

La RGMa, y/o péptidos de la misma, se pueden analizar utilizando un inmunoensayo. La presencia o la cantidad de RGMa se puede determinar usando los anticuerpos descritos en este documento y detectar la unión específica a RGMa. Por ejemplo, el anticuerpo o un fragmento del mismo, se puede unir específicamente a un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 65 o un fragmento del mismo. El anticuerpo o un fragmento del mismo, se puede unir específicamente a un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 66 o un fragmento del mismo.

Se puede utilizar cualquier inmunoensayo. El inmunoensayo puede ser un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), un ensayo de inhibición competitiva, tal como ensayos de inhibición competitiva directos o inversos, un ensayo de polarización de fluorescencia o un ensayo de unión competitiva, por ejemplo. El ELISA puede ser un ELISA de tipo sándwich. La unión inmunológica específica del anticuerpo a la RGMa se puede detectar a través de marcadores directos, tales como marcadores, metales y radionúclidos fluorescentes o luminiscentes fijados al anticuerpo o a través de marcadores indirectos, tales como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante.

El uso de anticuerpos inmovilizados o fragmentos de los mismos se puede incorporar en el inmunoensayo. Los anti-

5 cuerpos se pueden inmovilizar sobre una variedad de soportes, tales como partículas de matrices magnéticas o cromatográficas, la superficie de una placa de ensayo (por ejemplo, pocillos de microtitulación), piezas de un material de sustrato sólido y similares. Una tira de ensayo se puede preparar mediante el recubrimiento del anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos en una matriz sobre un soporte sólido. Esta tira se puede sumergir entonces en la muestra biológica de la prueba y luego se procesa rápidamente a través de lavados y etapas de detección para generar una señal medible, tal como una mancha de color.

(a) ELISA tipo sándwich

10 El ELISA tipo sándwich mide la cantidad de antígeno entre dos capas de anticuerpos (es decir, el anticuerpo de captura y el de detección). La RGMa que se va a medir puede contener al menos dos sitios antigénicos capaces de unirse a un anticuerpo. Se puede emplear un anticuerpo monoclonal o policlonal como anticuerpos de captura y detección en el ELISA de tipo sándwich.

15 Generalmente, se emplean al menos dos anticuerpos para separar y cuantificar la RGMa o un fragmento de RGMa en una muestra del ensayo. Más específicamente, al menos los dos anticuerpos se unen a ciertos epítomos de RGMa o un fragmento de RGMa, formando un complejo inmune que se conoce como "sándwich". Uno o varios anticuerpos se pueden usar para capturar la RGMa o el fragmento de RGMa en la muestra del ensayo (estos anticuerpos se denominan con frecuencia anticuerpo de "captura" o anticuerpos de "captura") y se emplean uno o varios anticuerpos para unir un marcador detectable (es decir, cuantificable) al sándwich (esos anticuerpos se denominan con frecuencia anticuerpo de "detección" o anticuerpos de "detección"). En un ensayo de tipo sándwich, ambos anticuerpos que se unen a su epítomo pueden no ser disminuidos por la unión de cualquier otro anticuerpo en el ensayo a su epítomo respectivo. En otras palabras, los anticuerpos se pueden seleccionar de manera que uno o varios primeros anticuerpos puestos en contacto con una muestra del ensayo sospechosa de contener RGMa o un fragmento de RGMa, no se unen a la totalidad o a parte de un epítomo reconocido por los segundos anticuerpos o anticuerpos posteriores, interfiriendo de ese modo con la capacidad de uno o de varios segundos anticuerpos de detección para unirse a RGMa o al fragmento de RGMa.

25 Los anticuerpos se pueden emplear como un primer anticuerpo en dicho inmunoensayo. Preferiblemente, el anticuerpo se une inmunoespecíficamente a epítomos que comprenden al menos tres (3) aminoácidos contiguos de SEQ ID NOs: 65, 66 o 74. Además de los anticuerpos de la presente invención, dicho inmunoensayo puede comprender un segundo anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a epítomos que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende al menos tres (3) aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 65, 66 o 74, en donde los (3) aminoácidos contiguos a los que se une el segundo anticuerpo, son diferentes de los (3) aminoácidos contiguos a los que se unen el primer anticuerpo.

30 Preferiblemente, una muestra del ensayo sospechosa de contener RGMa o un fragmento de RGMa se puede poner en contacto con al menos un primer anticuerpo de captura (o anticuerpos) y al menos un segundo anticuerpo de detección, ya sea simultánea o secuencialmente. En el formato de ensayo de tipo sándwich, una muestra del ensayo sospechosa de contener RGMa o un fragmento RGMa se pone primero en contacto con al menos el primer anticuerpo de captura que se une específicamente a un epítomo particular en condiciones que permiten la formación de un primer complejo anticuerpo-RGMa. Si se utiliza más de un anticuerpo de captura, se forma un primer complejo múltiple de anticuerpo de captura-RGMa. En un ensayo de tipo sándwich, los anticuerpos, preferiblemente, al menos el anticuerpo de captura, se utilizan en cantidades en exceso molar de la cantidad máxima de RGMa o de fragmento de RGMa esperada en la muestra del ensayo. Por ejemplo, se puede utilizar desde aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 1 mg/ml de anticuerpo por ml de tampón de recubrimiento de partículas.

35 Opcionalmente, antes de poner en contacto la muestra del ensayo con al menos el primer anticuerpo de captura, al menos el primer anticuerpo de captura puede estar unido a un soporte sólido que facilita la separación del primer complejo anticuerpo-RGMa de la muestra del ensayo. Cualquier soporte sólido conocido en la técnica se puede utilizar, incluyendo pero no limitados a, soportes sólidos a base de materiales poliméricos en forma de pocillos, tubos o perlas. El anticuerpo (o anticuerpos) se puede unir al soporte sólido mediante adsorción, mediante unión covalente usando un agente de acoplamiento químico o por otros medios conocidos en la técnica, siempre que esa unión no interfiera con la capacidad del anticuerpo para unirse a RGMa o a un fragmento de RGMa. Por otra parte, si es necesario, el soporte sólido se puede derivatizar para permitir una reactividad con distintos grupos funcionales en el anticuerpo. Tal derivatización requiere el uso de ciertos agentes de acoplamiento tales como, pero no limitados a, anhídrido maleico, N-hidroxisuccinimida y ácido 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.

45 Después de que la muestra del ensayo sospechosa de contener RGMa o un fragmento de RGMa se pone en contacto con al menos el primer anticuerpo de captura, se incuba la muestra del ensayo con el fin de permitir la formación de un complejo de anticuerpo de captura primero (o anticuerpos múltiples)-RGMa. La incubación se puede llevar a cabo a un pH desde aproximadamente 4,5 a aproximadamente 10,0, a una temperatura desde aproximadamente 2°C a aproximadamente 45°C y durante un periodo desde al menos aproximadamente un (1) minuto a aproximadamente dieciocho (18) horas, de aproximadamente 2-6 minutos o de aproximadamente 3-4 minutos.

Después de formar el complejo de anticuerpo de captura primero/múltiple-RGMa, el complejo se pone en contacto con al menos un segundo anticuerpo de detección (en condiciones que permitan la formación de un complejo de

anticuerpo primero/múltiple-RGMA-segundo anticuerpo). Si el complejo de primer anticuerpo-RGMA se pone en contacto con más de un anticuerpo de detección, a continuación, se forma un complejo de anticuerpo de captura primero/múltiple-RGMA-anticuerpo de detección múltiple. Al igual que con el primer anticuerpo, cuando al menos el segundo (y posteriores) anticuerpo se pone en contacto con el complejo de primer anticuerpo-RGMA, se requiere un período de incubación en condiciones similares a las descritas anteriormente para la formación del complejo de anticuerpo primero/múltiple-RGMA-anticuerpo segundo/múltiple. Preferiblemente, al menos un segundo anticuerpo contiene un marcador detectable. El marcador detectable puede estar unido a al menos un segundo anticuerpo antes, simultáneamente o después de la formación del complejo de anticuerpo primero/múltiple-RGMA-anticuerpo segundo/múltiple. Se puede emplear cualquier marcador detectable conocido en la técnica.

10 (b) Inhibición competitiva directa

En un formato competitivo directo, una parte alícuota de RGMA, un fragmento de RGMA, o una variante de RGMA marcada de la misma con una concentración conocida, se utiliza para competir con RGMA o un fragmento de RGMA en una muestra del ensayo, para unirse a un anticuerpo de RGMA (tal como un anticuerpo de la presente invención).

15 En un ensayo de competición directa, un anticuerpo inmovilizado (tal como un anticuerpo de la presente invención) se puede poner en contacto de forma secuencial o simultánea con la muestra del ensayo y una RGMA, un fragmento de RGMA o una variante de RGMA marcada de la misma. El péptido RGMA, un fragmento de RGMA o una variante de RGMA se pueden marcar con cualquier marcador detectable, incluyendo los marcadores detectables descritos anteriormente en relación con los anticuerpos anti-RGMA. En este ensayo, el anticuerpo se puede inmovilizar sobre un soporte sólido. Alternativamente, el anticuerpo se puede acoplar a un anticuerpo, tal como un anticuerpo antiespecie, que ha sido inmovilizado sobre un soporte sólido, tal como una micropartícula.

20 El péptido RGMA, un fragmento de RGMA o una variante de RGMA marcada, la muestra del ensayo y el anticuerpo se incuban en condiciones similares a las descritas anteriormente en relación con el formato de ensayo de tipo sándwich. Dos especies diferentes de complejos anticuerpo-RGMA se pueden generar entonces. Específicamente, uno de los complejos anticuerpo-RGMA generado contiene un marcador detectable mientras que el otro complejo anticuerpo-RGMA no contiene un marcador detectable. El complejo anticuerpo-RGMA se puede separar, pero no tiene que ser así, del resto de la muestra del ensayo antes de la cuantificación del marcador detectable. Independientemente de si el complejo anticuerpo-RGMA se separa del resto de la muestra del ensayo, se cuantifica la cantidad de marcador detectable en el complejo anticuerpo-RGMA. La concentración de RGMA o de fragmento de RGMA en la muestra del ensayo se puede determinar después mediante una comparación de la cantidad de marcador detectable en el complejo anticuerpo-RGMA con una curva estándar. La curva estándar se puede generar utilizando diluciones seriadas de RGMA o un fragmento de RGMA de concentración conocida, mediante espectrometría de masas, gravimetría y otros métodos conocidos en la técnica.

25 El complejo anticuerpo-RGMA se puede separar de la muestra del ensayo uniendo el anticuerpo a un soporte sólido, tal como los soportes sólidos descritos anteriormente en relación con el formato de ensayo de tipo sándwich y después retirar el resto de la muestra del ensayo del contacto con el soporte sólido.

30 (c) Ensayo de competición inversa

En un ensayo de competición inversa, un péptido RGMA, un fragmento de RGMA, o una variante de RGMA inmovilizada de la misma se puede poner en contacto o bien de forma secuencial o simultánea con una muestra del ensayo y al menos un anticuerpo marcado. Preferiblemente, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos tres (3) aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 65 o 66. El péptido RGMA, un fragmento de RGMA o una variante de RGMA se puede unir a un soporte sólido, tal como los soportes sólidos descritos anteriormente en relación con el formato de ensayo de tipo sándwich. El fragmento de péptido RGMA puede tener una secuencia de aminoácidos que contiene SEQ ID NO: 65 o 66.

40 El péptido RGMA, un fragmento de péptido RGMA o una variante de RGMA inmovilizada de la misma, una muestra del ensayo y al menos un anticuerpo marcado se incuban en condiciones similares a las descritas anteriormente en relación con el formato de ensayo de tipo sándwich. A continuación se generan dos especies diferentes de complejos RGMA-anticuerpo. Específicamente, uno de los complejos RGMA-anticuerpo generado se inmoviliza y contiene un marcador detectable mientras que el otro complejo RGMA-anticuerpo no se inmoviliza y contiene un marcador detectable. El complejo RGMA-anticuerpo no inmovilizado y el resto de la muestra del ensayo se retiran de la presencia del complejo RGMA-anticuerpo inmovilizado a través de métodos conocidos en la técnica, tales como el lavado. Una vez que se retira el complejo RGMA-anticuerpo no inmovilizado, a continuación, se cuantifica la cantidad de marcador detectable en el complejo RGMA-anticuerpo inmovilizado. La concentración de RGMA o de fragmento de RGMA en la muestra del ensayo se puede determinar mediante una comparación de la cantidad de marcador detectable en el complejo de RGMA con una curva estándar. La curva estándar se puede generar utilizando diluciones seriadas de RGMA o de un fragmento de RGMA de concentración conocida, mediante espectrometría de masas, gravimetría y otros métodos conocidos en la técnica.

45 (d) Polarización de la fluorescencia

En un ensayo de polarización de fluorescencia, un anticuerpo o un fragmento funcionalmente activo del mismo se

puede poner en contacto primero con una muestra del ensayo no marcada que se sospecha que contiene RGMa o un fragmento de RGMa para formar un complejo RGMa-anticuerpo no marcado. El complejo RGMa-anticuerpo no marcado se pone en contacto después con RGMa, un fragmento de RGMa o una variante de RGMa marcada con fluorescencia de la misma. La RGMa, el fragmento de RGMa o la variante de RGMa marcada compete con cualquier RGMa o fragmento de RGMa no marcada en la muestra del ensayo, para unirse al anticuerpo o a un fragmento funcionalmente activo del mismo. La cantidad de complejo RGMa-anticuerpo marcado formado se determina y la cantidad de RGMa en la muestra del ensayo se determina mediante el uso de una curva estándar.

El anticuerpo utilizado en un ensayo de polarización de fluorescencia se une específicamente a un epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos tres (3) aminoácidos de SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 66 o SEQ ID NO: 74.

El anticuerpo, el péptido RGMa, un fragmento de péptido RGMa o una variante de RGMa marcada del mismo y una muestra del ensayo y al menos un anticuerpo marcado, se pueden incubar en condiciones similares a las descritas anteriormente en relación con el inmunoensayo de tipo sándwich.

Alternativamente, un anticuerpo o un fragmento funcionalmente activo del mismo se puede poner en contacto simultáneamente con una RGMa, un fragmento de RGMa o una variante de RGMa marcada con fluorescencia de la misma y una muestra del ensayo no marcada de la que se sospecha que contiene RGMa o un fragmento de RGMa de la misma, para formar complejos RGMa-anticuerpo marcados y complejos RGMa-anticuerpo no marcados. La cantidad de complejo RGMa-anticuerpo marcado formado se determina y la cantidad de RGMa en la muestra del ensayo se determina mediante el uso de una curva estándar.

Alternativamente, un anticuerpo o un fragmento funcionalmente activo del mismo se pone en contacto primero con una RGMa, un fragmento de RGMa o una variante de RGMa marcada con fluorescencia de la misma para formar un complejo RGMa-anticuerpo marcado. El complejo RGMa-anticuerpo marcado se pone en contacto entonces con una muestra del ensayo no marcada que se sospecha que contiene RGMa o un fragmento de RGMa de la misma. Cualquier RGMa o fragmento de RGMa no marcado en la muestra del ensayo compete con RGMa o un fragmento de RGMa o una variante de RGMa marcada para unirse al anticuerpo o a un fragmento funcionalmente activo del mismo. La cantidad de complejo RGMa-anticuerpo marcado formado se determina, la cantidad de RGMa en la muestra del ensayo se determina mediante el uso de una curva estándar. El anticuerpo usado en este inmunoensayo se une específicamente a un epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende por lo menos tres (3) aminoácidos contiguos de SEQ ID NOs: 65, 66 o 74.

(e) Espectrometría de masas

El análisis de espectrometría de masas (MS) se puede usar de forma aislada o en combinación con otros métodos. Otros métodos incluyen inmunoensayos y los descritos anteriormente para la detección de polinucleótidos específicos. El método de espectrometría de masas se puede utilizar para determinar la presencia y/o la cantidad de uno o varios biomarcadores. El análisis MS puede comprender análisis MS con láser de desorción/ionización asistido por matriz (MALDI) con tiempo de vuelo (TOF), tal como, por ejemplo, análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF dirigido a un punto o espectrometría de masas MALDI-TOF con cromatografía líquida. En algunas realizaciones, el análisis MS comprende MS con ionización por electrospray (ESI), tal como ESI-MS con cromatografía líquida (LC). El análisis de masas se puede realizar usando espectrómetros comercialmente disponibles. Se pueden emplear métodos para la utilización de análisis MS, incluyendo MS MALDI-TOF y ESI-MS, para detectar la presencia y la cantidad de péptidos biomarcadores en muestras biológicas. Véanse, por ejemplo, los documentos de patentes de EE.UU. n° 6.925.389; 6.989.100; y 6.890.763 como una guía.

c. Control

Puede ser deseable incluir una muestra de control. La muestra de control se puede analizar simultáneamente con la muestra del sujeto como se ha descrito anteriormente. Los resultados obtenidos a partir de la muestra del sujeto se pueden comparar con los resultados obtenidos a partir de la muestra de control. Se pueden proporcionar curvas estándar, con las que se pueden comparar los resultados del ensayo para la muestra biológica. Tales curvas estándar presentan niveles de marcador como una función de unidades de ensayo, es decir, la intensidad de la señal fluorescente, si se emplea un marcador fluorescente. Empleando muestras tomadas a partir de múltiples donantes, las curvas estándar se pueden proporcionar para los niveles de control de la RGMa en tejido normal, así como para los niveles "de riesgo" de la RGMa en un tejido tomado a partir de donantes que pueden tener una o varias de las características expuestas anteriormente.

6. Kit

En este documento se proporciona un kit que se puede utilizar para el tratamiento o el diagnóstico de un sujeto. El kit puede comprender el anticuerpo y un medio para administrar el anticuerpo. El kit puede comprender además instrucciones para el uso del kit y la realización del análisis, el seguimiento o el tratamiento.

El kit también puede comprender uno o varios recipientes, tales como viales o botellas, en donde cada recipiente contiene un reactivo distinto. El kit puede comprender además instrucciones escritas, que pueden describir cómo

realizar o interpretar un análisis, monitorización, tratamiento o método descrito en el presente documento.

La presente invención tiene múltiples aspectos, ilustrados por medio de los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Producción y aislamiento de anticuerpo monoclonal humano anti-RGMa

Con el uso de la tecnología de presentación en ARNm PROfusion, se seleccionaron bancos de anticuerpos de bazo, amígdalas, PBMC y ganglios linfáticos humanos agrupados, a través de ocho rondas contra antígenos RGMa: RGMa humana o de rata marcada con biotina 100 nM. La tecnología PROfusion se describe en el documento de Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. nº 20100099103 y 20100105569.

10 Fragmentos sc-Fv seleccionados se reformatearon en IgGs completamente humanas. Después de escrutar las IgGs en ELISAs basados en RGMa, se identificaron AE12-1 hasta AE12-8 como aglutinantes positivos para RGMa humana y de rata.

15 Los anticuerpos AE12-13, AE12-15, AE12-20, AE12-21, AE12-23 y AE12-24 son anticuerpos anti-RGMa totalmente humanos, identificados a partir de grandes bancos de levadura con scFv humanos no tratados previamente, seleccionados contra RGMa humana utilizando tecnologías de presentación en levadura convencionales. Se realizaron 2 rondas de clasificación de células activadas de forma magnética (MACS) y 4 rondas de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) en los bancos utilizando RGMa humana biotinilada 100 nM como el antígeno para la selección. Para la última ronda de clasificación, las células también se seleccionaron negativamente contra un antígeno RGMc-Fc humano. Los fragmentos sc-Fv seleccionados se reformatearon en IgGs completamente humanas. 20 Después del escrutinio de las IgGs en ELISA de RGMa humana, AE12-13, -15, -20, -21, -23 y -24 se identificaron como aglutinantes positivos para RGMa humana. AE12-13, AE12-15 y AE12-23 tenían también una reacción cruzada con RGMc humana, tal y como se evaluó con un ELISA.

Ejemplo 2

Caracterización de los anticuerpos

25 Los 8 mAbs de PROfusion (AE12-1, AE12-2, AE12-3, AE12-4, AE12-5, AE12-6, AE12-7 y AE12-8), se sometieron a ensayo mediante ELISAs de unión directa para examinar la unión a RGMa humana (hRGMa) y RGMa de rata y la reactividad cruzada con hRGMc. El ELISA de competencia con hRGMa se utilizó para analizar si cualquiera de estos mAbs podía competir con h5F9.23 para unirse a hRGMa. h5F9.23 es un mAb guía humanizado anti-RGMa obtenido a partir de un hibridoma de rata y conocido porque se une el dominio N-terminal de RGMa. H5F9.23 tiene las siguientes secuencias:

VH h5F9.23	151	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYDSSEKHYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKGTTPDYWGQGTMTVSS
VL h5F9.23	152	DVVLTSQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLEY SDGYTFLEWFQQRPGQSPRLLIYEVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CFQATHDPLTFGQGTKLEIKR
VH h5F9.23 CDR-H1	153	NYGMN
VH h5F9.23 CDR-H2	154	MIYDSSEKHYADSVKG
VH h5F9.23 CDR-H3	155	GTPDY
VL h5F9.23 CDR-L1	156	RSSQSLEYS DGYTFLE
VL h5F9.23 CDR-L2	157	EVSNRFS
VL h5F9.23 CDR-L3	158	FQATHDPLT

Se utilizó ELISA de competencia con neogenina o BMP-2/BMP-4 para determinar si esos mAbs bloquearían la unión de hRGMa a su receptor neogenina o BMP-2/BMP-4.

5 Basándose en los datos de ELISA, los 8 mAbs PROfusion se unían a RGMa humana y de rata (Tabla 3). Para la unión de RGMc en ELISA, 3 mAbs (AE12-6, -7 y -8) mostraron unión a hRGMc, AE12-4 mostró una unión débil a concentraciones elevadas y los otros 4 mAbs (AE12-1, -2, -3 y -5) no mostraron unión a hRGMc a concentraciones de hasta 100 nM. En el ELISA de competencia de hRGMa, AE12-1, AE12-3 y AE12-6 eran capaces de competir con h5F9.23 en la unión a hRGMa, lo que sugiere que los epítomos de unión de estos 3 mAbs están cerca o se solapan con el epítomo de h5F9.23. Un ensayo de transferencia de mancha con fragmentos de hRGMa mostró que AE12-1 y AE12-6 se unían al fragmento N-terminal, AE12-2 y AE12-4 se unían al fragmento C-terminal y los otros 4 Abs no mostraron ninguna señal de unión detectable. Para bloquear la unión de hRGMa a neogenina en el ELISA de competencia, solamente AE12-5 y AE12-6 mostraban una actividad de bloqueo comparativa o mejor que la de h5F9.23, AE12-1 y AE12-4 mostraban una inhibición débil y AE12-2, -3, -7 y -8 no mostraron inhibición a concentraciones de hasta 100 nM. En el ELISA de competencia de BMP-2/BMP-4, solamente AE12-1, AE12-4 y AE12-6 bloqueaban la unión de hRGMa a BMP-2/BMP-4.

Los mAbs PROfusion se sometieron a ensayo adicionalmente en ensayos de unión basados en células para estudiar su capacidad para bloquear la unión de hRGMa a las células neuronales. En un ensayo de unión celular basado en MSD en el que las células se incubaron con hRGMa-Fc biotinilada a temperatura ambiente y la unión de hRGMa se detectó con marcador estreptavidina-sulfo, solamente AE12-1 y AE12-6 bloqueaban la unión de hRGMa a células neuronales SH-SY5Y, de forma similar a h5F9.23 (Tabla 3).

Sin embargo, en un ensayo de escrutinio de alto contenido (HCS), en el que las células se incubaron con hRGMa-Fc a 37°C y la unión a hRGMa se detectó con un Ab anti-Fc marcado con Cy3 y se calculó con un análisis de imagen fluorescente de alto contenido, solamente AE12-6 entre los anticuerpos PROfusion mostraba una fuerte inhibición de la unión a RGMa en las células neuronales SH-SY5Y y neuronas primarias del hipocampo de rata (Tabla 3, Figura 13). También se muestra en la Figura 13, que AE12-15 y AE12-23, anticuerpos obtenidos a partir de bancos de levadura con scFv humanos sin tratamiento previo, inhibían la unión de hRGMa a las células.

El elemento de respuesta a BMP (BRE) se construyó usando oligos solapantes basándose en la secuencia descrita por Korchynskyi y ten Dijke (J. Biol. Chem. 2002, 277:4883), y se clonaron en un vector indicador de luciferasa básico pGL4.27 [luc2P/MINP/Hygro] (Promega) para generar una estructura artificial indicadora de luciferasa de BRE. Los miembros de la familia RGM (RGMa, RGMb y RGMc) son correceptores para la señalización de BMP. Ambos ensayos indicadores de BMP con RGMa y RGMc se establecieron mediante una cotransfección de células 293HEK con plásmido indicador de BMP y plásmido de expresión de RGMa o RGMc, y se utilizaron para escrutar mAbs en busca de actividad neutralizante hacia RGMa y RGMc. En un ensayo indicador de BMP con RGMa, AE12-1 y AE12-6 neutralizaban la actividad de RGMa, lo que es compatible con los datos del ensayo de unión celular a base de MSD (Tabla 3). En el ensayo indicador de BMP con RGMc, AE12-6 neutralizaba la actividad de RGMc, mientras que AE12-1 no lo hacía. Por lo tanto, AE12-1 es un mAb neutralizante específico de RGMa.

Los mAbs PROfusion se sometieron a ensayo adicionalmente para estudiar su capacidad para neutralizar RGMa en un ensayo de quimiotaxis con células neuronales SH-SY5Y. En ese ensayo, RGMa actúa como una molécula repulsiva para inhibir la quimiotaxis celular. AE12-1 mostró una fuerte actividad neutralizante hacia hRGMa (Tabla 3). AE12-4 y AE12-6 mostraron cierta actividad neutralizante.

AE12-1 se analizó en un ensayo de crecimiento de neuritas con células neuronales SH-SY5Y humanas. En ese ensayo, RGMa, de longitud completa o el fragmento N-terminal, inhibe el crecimiento de neuritas. De acuerdo con su actividad funcional en el ensayo indicador de BMP con RGMa y el ensayo de quimiotaxis, AE12-1 mostraba una actividad neutralizante fuerte hacia hRGMa de longitud completa o un fragmento N-terminal (Tabla 3).

45 Un análisis BIAcore de AE12-1 sobre hRGMc y RGMa humana, de macaco cangrejero (cyno) y de rata mostraba que AE12-1 no se unía a hRGMc pero mostraba una buena reactividad cruzada con RGMa humana, cyno y de rata, con una afinidad comparable. Véase la Tabla 4.

Tabla 3

Clon→	AE12-1	AE12-2	AE12-3	AE12-4	AE12-5	AE12-6	AE12-7	AE12-8	h5F9.23
Unión a hRGMa (ELISA)	++	++	++	+	+	++	+	+	++
Unión a RGMa de rata (ELISA)	++	++	++	+	+	++	+	+	++
ELISA de hRGMc-His	-	-	-	+/-	-	++	+	+	++
Compite con h5F9.23 para la unión a hRGMa	+	-	+	-	-	+	-	-	

Clon→	AE12-1	AE12-2	AE12-3	AE12-4	AE12-5	AE12-6	AE12-7	AE12-8	h5F9.23
(ELISA)									
Cartografiado de fragmentos de hRGMa	N	C	^a Neg	C	^a Neg	N	^a Neg	^a Neg	N
Compite con biot-hRGMa-Fc para la unión a neo-His (ELISA)	+/-	-	-	+/-	++	+++	-	-	++
^b Bloquea la unión de hRGMa-Fc a células SH-SY5Y (MSD)	++	-	-	-	-	++	-	-	++
^c Bloquea la unión de hRGMa-Fc a células SH-SY5Y (HCS)	^d (-)	-	-	-	+	+++	-	-	++
Compite con FL-RGMa-Fc para la unión a BMP-2 (ELISA)	++	-	-	++	-	++	-	-	++
Compite con FL-RGMa-Fc para la unión a BMP-4 (ELISA)	++	-	-	++	-	++	^e ?	-	++
Neutraliza hRGMa en el ensayo indicador de BMP con RGMa	++	-	-	-	-	++	-	-	++
Neutraliza hRGMc en el ensayo indicador de BMP con RGMc	-	-	-	-	-	++	-	-	++
Neutraliza hRGMa en la quimiotaxis con células SH-SY5Y	+++	-	-	^f +	-	+	-	-	++
Neutraliza hRGMa en el ensayo de crecimiento de neuritas	++								++

Con respecto a la Tabla 3, ^a"Neg" corresponde a una unión negativa con todos los fragmentos sometidos a ensayo en la transferencia de tipo manchas. ^b"MSD" corresponde a la utilización de hRGMa-Fc biotinilada que forma un complejo con el marcador estreptavidina-sulfo y la incubación con células a temperatura ambiente (TA). ^c"HCS" corresponde a la utilización de hRGMa-Fc que forma un complejo con Ab anti-Fc marcado con Cy3 y la incubación con las células a 37°C. ^d"AE12-1" corresponde a una unión muy mejorada de RGMa-Fc a las células, en contraste con la inhibición de la unión de biotina-RGMa-Fc a las células SH-SY5Y mediante MSD. ^e"?" corresponde a datos que no son concluyentes para AE12-7. ^f"AE12-4" - la concentración de AE12-4 en el ensayo de quimiotaxis se correlaciona inversamente con la actividad neutralizante.

5 En un ensayo indicador de respuesta a BMP en el que RGMa o RGMc incrementa la señalización de BMP mediante la interacción con BMPs, un anticuerpo que comprende SEQ ID NOs: 1 y 5 (AE12-1) bloqueaba la actividad de RGMa, pero no la actividad de RGMc, lo que es compatible con su antagonismo funcional y la especificidad de la unión hacia RGMa.

15 Las Figuras 13 y 14 ilustran los efectos neutralizantes de los anticuerpos especificados en la unión de RGMa a las células neuronales utilizando un ensayo de unión de células vivas sobre células SH-SY5Y y neuronas primarias del hipocampo de rata. RGMa marcada con Fc y anticuerpos anti-Fc marcados con Cy3 forman un complejo a 4°C durante 60 minutos, seguido por una incubación del complejo con un anticuerpo de bloqueo a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añade después el complejo de RGMa-Cy3 + anticuerpo a las células junto con Hoechst 33342 durante 30 minutos a 37°C para permitir la unión a las células. Las células se lavan después dos veces en medio de cultivo y se fijan con PFH. La formación de imágenes de células se lleva a cabo con BD Pathway y las imágenes se analizaron con el programa informático Definiens Architect.

25 Como se ha mencionado anteriormente, AE12-6, AE12-15 y AE12-23 bloqueaban la unión de RGMa a las células SH-SY5Y y a neuronas primarias. Véase la Figura 13. En el ensayo de HCS, AE12-1 no inhibía la unión de RGMa a las células SH-SY5Y. Véase la Figura 14. Las concentraciones más altas de AE12-1 potenciaban la unión de RGMa-Fc a las células, mientras que con las concentraciones más bajas, los niveles eran iguales a los niveles de unión de

RGMa de control. Esto contrastaba con la inhibición de la unión de biotina-RGMa-Fc a las células SH-SY5Y mediante MSD (MSD corresponde a la utilización de hRGMa-Fc biotinilada que forma un complejo con el marcador estrep-tavidina-sulfo y la incubación con células a temperatura ambiente). La diferencia entre el ensayo de MSD y el ensayo de HCS puede ser debida a diferentes condiciones de los ensayos.

- 5 La Figura 15 muestra los efectos neutralizantes sobre la repulsión de RGMa mediante r5F9 (control), AE12-1 y AE12-6 en un ensayo de crecimiento de neuritas. Se extendieron 6500 neuronas primarias del hipocampo de rata por pocillo, sobre placas para la formación de imágenes de 96 pocillos recubiertas con poli-1-lisina. Las células se trataron durante 24 horas con el fragmento 47-127 de RGMa de SEQ ID NO: 65 (SEQ ID NO: 139) en combinación con anticuerpos anti-RGMa. Las células se fijaron y se tiñeron con tubulina BIII usando un protocolo del kit de crecimiento de neuritas de Millipore. Las imágenes fueron adquiridas con un aparato BD Pathway y se analizaron con Definiens Architect para medir el crecimiento de neuritas por neurona.
- 10

Ejemplo 3

Variantes de anticuerpo y datos de la unión

- 15 La Tabla 4 muestra que sustituyendo el residuo Cys en VL CDR3 de AE12-1 (SEQ ID NO: 8), se pueden generar variantes que tienen una afinidad mejorada hacia hRGMa. Véanse las SEQ ID NOs: 67-73. Por ejemplo, véase la Tabla 4, en donde el clon del anticuerpo AE12-1-Y mostraba al menos una afinidad 10 veces mayor que la de hRGMa y AE12-1-F mostraba una afinidad 5 veces mayor que la de hRGMa. Otros mostraban una afinidad comparable a la de AE12-1 parental. Todas las variantes bloqueaban la unión de hRGMa a las células SH-SY5Y en un ensayo de unión celular basado en MSD, neutralizaban RGMa pero no la actividad de RGMc en ensayos indicadores de BMP y mostraban una estabilidad térmica elevada y una buena solubilidad en estudios de preformulación.
- 20

Tabla 4

Ab	AE12-1	AE12-1-F	AE12-1-H	AE12-1-L	AE12-1-V	AE12-1-I	AE12-1-K	AE12-1-Y
Unión de hRGMa (ELISA)	++	++	++	++	++	+++	+++	+++
Unión de RGMa cyno (ELISA)	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
hRGMa-His	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	2.7×10^4	3.2×10^4	3.8×10^4	2.5×10^5	3×10^4	3.4×10^4	2.2×10^4
	kd (s^{-1})	2.3×10^4	3.9×10^5	1.2×10^4	2.5×10^4	1.3×10^4	3.0×10^4	1.3×10^5
	Kd (nM)	7.3	1.4	3.8	6.6	5.9	8.8	0.6
RGMa-His cyno	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	1.9×10^5	4.4×10^4	4.7×10^4	6.2×10^4	1.1×10^5	5.1×10^4	4×10^4
	kd (s^{-1})	1.7×10^3	2.5×10^4	6.3×10^4	6.7×10^4	9.9×10^4	4.7×10^4	2×10^4
	Kd (nM)	8.8	5.4	13.4	10.1	9.2	9.3	4.9
RGMa-His rata	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	2.6×10^4	2.6×10^4	2.9×10^4	3.2×10^4	2.2×10^5	1.6×10^4	1.4×10^4
	kd (s^{-1})	4.8×10^4	1.4×10^4	2.5×10^4	3.9×10^4	3.2×10^4	2.8×10^4	6.9×10^5
	Kd (nM)	19	5.2	8.6	12	15	17	5
hRGMc-His	-	-	-	-	-	-	-	-
Bloquea la unión de hRGMa-Fc a las células SH-SY5Y (MSD)	++	++	++	++	++	++	++	++
Neutraliza RGMa en el ensayo BRE luc	++	++	++	++	++	++	++	++
Neutraliza RGMc en el ensayo BRE luc	-	-	-	-	-	-	-	-
Solubilidad/estabilidad Fila 1	++	++	++	++	++	++	++	++

Ejemplo 4

Crecimiento de las neuritas

5 Como se muestra en las Figuras 1, 2 y 15, AE12-1 neutralizaba completamente hRGMa de longitud completa y un fragmento de hRGMa, como se muestra sobre las células SH-SY5Y y neuronas primarias del hipocampo de rata. Este fragmento de hRGMa corresponde a los aminoácidos 47-127 de SEQ ID NO: 65 como se muestra aquí: PCKI LKCNSEFWSA TSGSHAPASD DTPEFCAALR SYALCTRRTA RTCRGDLAYH SAVHGIEDLM SQHNCSKDGP TSQPRLR (SEQ ID NO: 139).

10 Se realizaron otros experimentos de crecimiento de las neuritas para evaluar los efectos de AE12-1 así como las variantes de AE12-1, en donde el anticuerpo comprende SEQ ID NOs: 1 y 5 o 2-4 y 6-8, en donde el residuo Cys de SEQ ID NO: 8 se sustituye por otro aminoácido o en donde el residuo Cys en la posición 91 de SEQ ID NO: 5 se sustituye por otro aminoácido (es decir AE12-1-F, AE12-1-H, AE12-1-L, AE12-1-V, AE12-1-I, AE12-1-K y AE12-1-Y). Véanse las Figuras 9-12, en donde la inhibición con el anticuerpo descrito (24 horas de incubación) se muestra sobre el crecimiento de neuritas de células SH-SY5Y tratadas con FL hRGMa.

15 **Ejemplo 5**

Estudios *in vivo*

20 Como se muestra en las Figuras 3 y 4, AE12-1 mejoraba el crecimiento regenerativo de los axones de las células ganglionares de la retina de forma perilesional (0-500 µm) (n = 3-5 ratas/grupo). Véase la Figura 3. El anticuerpo AE12-1 también mejoraba el crecimiento regenerativo de los axones de las células ganglionares de la retina en zonas más alejadas de la lesión (500-1000 µm) (n = 3-5 ratas/grupo).

Ejemplo 6

Experimentos de aplastamiento del nervio óptico de rata

25 AE12-1 era activo en experimentos de aplastamiento del nervio óptico de rata. Véase la Figura 8. Una lesión por aplastamiento del nervio óptico unilateral se realizó en ratas Wistar machos, 2-4 mm detrás del ojo. Las ratas se controlaron durante 6 semanas (8 grupos, n = 6) y los anticuerpos se administraron una vez por semana por vía intravenosa a 10 mg/kg, 1 mg/kg o 0,1 mg/kg. El control de hlgG1 se administró por vía intravenosa, una vez por semana a 10 mg/kg (n = 6 ratas). En las ratas tratadas con AE12-1, las fibras que se regeneraban eran capaces de crecer más allá de la lesión por aplastamiento del nervio óptico, mientras que en las ratas tratadas con el anticuerpo de control hlgG1, las fibras que se regeneraban se acumulan en la lesión debido a su incapacidad para superar las lesiones. Véase la Figura 8.

30

Ejemplo 7

Cartografiado de epítomos de RGMa humana (hRGMa) con anticuerpo monoclonal AE12-1

35 Se llevaron a cabo estudios de cartografiado de epítomos para el anticuerpo monoclonal AE12-1. Los datos sugerían que el epítomo para AE12-1 está situado en la región N-terminal de RGMa. Se emplearon varias estructuras artificiales de hRGMa para intentar determinar el epítomo para AE12-1. Estas estructuras artificiales incluían:

40 pelB-M-[RGMA(47-168)]-6His ("6His" se da a conocer como SEQ ID NO: 148) (*E. coli*) producida de forma recombinante. El antígeno está a 0,41 mg/mL en ChemTag#16211, tampón S100, pH 8, Tris 25 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, 10% (v/v) de glicerol. La secuencia de esta primera estructura artificial de antígeno es: MKYLL PTAAA GLLLL AAQPA MAMPC KILKC NSEFV SATSG SHAPA SDDTP EFCAA LRSYA LCTRR TARTC RGDLA YHSAV HGIED LMSQH NCSKD GPTSQ PRLRT LPPAG DSQER SDSPE ICHYE KSFHK HSATP NYTHC GLFGD HHHHHH (SEQ ID NO:75).

45 [IgK-líder]-AttB1-[hRGMA(47-422)]-AttB2-MYC-6His ("6His" se da a conocer como SEQ ID NO: 148) producida de forma recombinante, 0,85 mg/ml en PBS. La secuencia de esta segunda estructura artificial de antígeno es: METDT LLLWV LLLWV PGSTG DAAQP ARRAR RTKLG TELGS TSPVW WNSAD ITSLY KKAGS PCKIL KCNSE FWSAT SGSHA PASDD TPEFC AALRS YALCT RRTAR TCRGD LAYHS AVHGI EDLMS QHNCS KDGPT SQPRL RTLPP AGDSQ ERSDS PEICH YEKSF HKHSA TPNYT HCGLF GDPHL RTFTD RFQTC KVQGA WPLID NNYLN VQVTN TPVLP GSAAT ATSKL TIIFK FNQEC VDQKV YQAEM DELPA AFVDG SKNGG DKHGA NSLKI TEKVS GQHVE IQAKY IGTTI VVRQV GRYLT FAVRM PEEVV NAVED WDSQG LYLCL RGCPL NQQID FQAFH TNAEG TGARR LAAAS PAPTA PETFP YETAV AKCKE KLPVE DLYYQ ACVFD LLTTG DVNFT LAAYY ALEDV KMLHS NKDKL HLYER TRDLP GNPFAF LYKVV ISSTV AAARG GPEQK LISEE DLNSA VDHHH HHH (SEQ ID NO:76).

50

- [IgK-líder]-AttB1-[hRGMA(47-168)]-Xa-[hlgG L Fc (257-481)] (estructura artificial de mamífero), producida de forma recombinante, 1,18 mg/mL, en PBS. La secuencia de esta tercera estructura artificial de antígeno es:
 METDT LLLWV LLLWV PGSTG DAAQP ARRAR RTKLP CKILK CNSEF WSATS GSHAP ASDDT PEFCA
 5 ALRSY ALCTR RTART CRGDL AYHSA VHGIE DLMSQ [0306] HNCSK DGPTS QPRLR TLPPA GDSQE
 RSDSP EICHY EKSFH KHSAT PNYTH CGLFG DLNSA DIEGR MDPPC PAPEL LGGPS VFLFP PKPKD
 TLMIS RTPEV TCVVV DVSHE DPEVK FNWYV DGVEV HNAKT KPREE QYNST YRVVS VLTVL HQDWL
 NGKEY KCKVS NKALP APIEK TISKA KGQPR EPQVY TLPPS REEMT KNQVS LTCLV KGFYP SDIAV
 EWESN GQPEN NYKTT PPVLD SDGSF FLYSK LTVDK SRWQQ GNVFS CSVMH EALHN HYTQK SLSLS
 PGK (SEQ ID NO:77).
- 10 Todos los antígenos empleados contienen la secuencia de aminoácidos de RGMa (47-168), en la que la numeración usada para identificar posiciones en la secuencia se corresponde con la numeración de la proteína parental. La secuencia de hRGMa (47-168) es: PCKI LKCNS EFWSA TSGSH APASD DTPEF CAALR SYALC TRRTA RTCRG DLAYH SAVHG IEDLM SQHNC SKDGP TSQPR LRTL P PAGDS QERSD SPEIC HYEKS FHKHS ATPNY THCGL FGD (SEQ ID NO:78).
- 15 Los tampones utilizados para la escisión de los epítopos eran como sigue:
- Tampón A: NaHCO₃ 100 mM, NaCl 500 mM, pH 8;
 Tampón B: NaHCO₃ 100 mM, NaCl 100 mM, pH 8;
 Tampón C: NaOAc 100 mM, NaCl 500 mM, pH 4; y
 Tampón D: Tris-HCl 100 mM, NaCl 500 mM, pH 8.
- 20 El anticuerpo monoclonal se inmovilizó del modo siguiente. Veinte miligramos de perlas de Sefarosa activadas con CNBr (GE Healthcare, Uppsala Suecia) se pesaron en una columna de reacción compacta (USB Corp., Cleveland, OH) con una frita de 35 µm y se lavaron 3 veces con 200 µl de HCl 1 mM, seguido por lavado 3 veces con 200 µl de tampón A.
- 25 Aproximadamente 5-6 nmol de la solución de mAb AE12-1 se dializó frente a PBS usando una unidad de minidiálisis de 10.000 MWCO Slide-A-Lyzer (Pierce, Rockford, IL) durante aproximadamente 40 minutos para eliminar el tampón de histidina que podía interferir con la unión del anticuerpo a Sefarosa. La solución de mAb dializada se añadió a la resina activada y se dejó mezclando en un rotador (Mix-All Laboratory Tube Mixer, Torrey Pines Scientific, San Marcos, CA) durante 4 horas a temperatura ambiente. Después de la unión, se recogió el flujo a través de la resina y la resina se lavó tres veces con 200 µl de Tampón A. La resina se suspendió en 200 µl de Tampón D y se hizo girar a temperatura ambiente durante 1 hora para bloquear los sitios de unión en exceso en la resina. La solución de Tampón D se recogió y la resina se lavó alternativamente con 200 µl de Tampón C y Tampón D (pH de lavado bajo/alto), con un total de tres veces cada uno. La resina se lavó tres veces con 200 µl de Tampón B, para dejarla lista para el acoplamiento con el antígeno.
- 30 El anticuerpo monoclonal AE12-1 inmovilizado se acopló a hRGMa. Las columnas de reacción compactas (CRC) se prepararon para el acoplamiento del antígeno lavando la frita de 35 µm de la CRC tres veces con 200 µl de Tampón B. La resina con el anticuerpo unido se mezcló suavemente para resuspender la resina de forma homogénea y 50 µl de la resina se colocaron en cada CRC preparada. La resina se lavó tres veces con 200 µl de Tampón B. Aproximadamente 1,5 nmol de antígeno hRGMa se añadió a la resina con suficiente Tampón B para preparar un volumen total de al menos 200 µl. Antes del acoplamiento del antígeno, el antígeno producido en *E. coli* se sometió a diálisis frente a tampón PBS durante aproximadamente 30 minutos, utilizando una unidad de minidiálisis de 10.000 MWCO Slide-A-Lyzer para eliminar el DTT del tampón del antígeno. La mezcla de antígeno/resina se dejó mezclando en un rotador durante 4 horas a temperatura ambiente. Se recogió el flujo a través (FT) y la resina se lavó tres veces con 200 µl de Tampón B.
- 35 Los epítopos se escindieron usando tripsina y endoproteinasa Asp-N. La resina que contenía el complejo de anticuerpo/antígeno inmovilizado se suspendió en 200 µl de Tampón B. Un vial con 20 µg de tripsina (Promega, Madison, WI) se disolvió en 100 µl de tampón de resuspensión (HOAc 50 mM), para una concentración de 0,2 µg/µl y un vial de 2 µg de endoproteinasa Asp-N (Roche) se disolvió en 50 µl de agua (0,04 µg/µl). Las escisiones del antígeno se realizaron con proporciones 1:100 (p/p) de enzima:antígeno. La reacción procedió durante 4-6 horas con rotación a temperatura ambiente.
- 45 Después de la digestión, el FT se recogió y la resina se lavó dos veces con 200 µl de Tampón B, recogiendo cada lavado por separado (Lavado 1 y 2), 200 µl de Tampón A (Lavado 3) y luego 200 µl de Tampón B (Lavado 4). Los péptidos antigénicos que se unían al anticuerpo eluyeron de la resina con tres partes alícuotas de 200 µl de ácido fórmico al 2% y cada elución se recogió por separado (Elución 1, 2 y 3). La fracción de la Elución 1 se analizó por espectrometría de masas (LC-MS/MS) para determinar la región del epítopo.
- 50 Las fracciones de la Elución 1 que se recogieron después de la digestión, se analizaron por LC-ESI- MS/MS (ion positivo) usando una bomba de carga de HPLC de forma capilar Agilent 1100 (Santa Clara, CA) y una bomba de
- 55

gradiente de nano-HPLC 1200, con un Chip Cube (columna de enriquecimiento de 40 nL, columna analítica 75 µm x 43 mm, chip de C8 ZORBAX) interconectada a un MS QTOF 6510 de Agilent. Se emplearon inyecciones de hasta 7 µl y MS/MS se realizó sobre los 3 iones superiores que satisfacen los criterios especificados de señal MS.

5 El análisis inicial de MS de las fracciones de escisión del epítipo (Elución 1) indicaba la presencia de especies de péptidos grandes que no podían coincidir con los péptidos proteolíticos esperados debido a la probable presencia de péptidos ligados por disulfuro. Para reducir los enlaces disulfuro, partes alícuotas de 10 µl se ajustaron a pH ~8 usando NaOH diluido y se redujeron en ditioneitol 5 mM (DTT) a 37°C durante 30 minutos antes de volver a analizar mediante MS. Algunas fracciones requerían una desnaturalización para lograr la reducción, en cuyo caso la parte alícuota se diluía en un volumen igual de clorhidrato de guanidina 8 M, Tris 100 mM (pH 8) antes de la adición del DTT.

10 El análisis LC-ESI- MS/MS de todas las fracciones de la Elución 1 de la digestión enzimática del mAb AE12-1 acoplado con las diversas estructuras artificiales de hRGMa, indicaba la presencia de varias especies de péptidos grandes con pesos moleculares en el intervalo de 8,5 - 12 kDa. Las masas y la fragmentación de las especies de gran tamaño no eran suficientes para identificar los péptidos. Con el fin de identificar los péptidos de los epítipos, era necesaria una reducción de los enlaces disulfuro. En todos los casos, la intensidad de la señal MS de los péptidos disminuía significativamente después de la reducción, en algunos casos siendo indetectable a menos que se redujera en presencia de un agente desnaturalizante.

15 Después de la reducción de la fracción de la Elución 1 con DTT, las fracciones se volvieron a analizar por LC-MS/MS. En el experimento de escisión utilizando hRGMa producida en *E. coli*, la mayoría de los picos observados en el cromatograma de iones eran especies cargadas aisladas, muchas relacionadas con polímeros u otros aditivos. Dos péptidos fueron identificados por estar relacionados con la estructura artificial hRGMa utilizada. Véase la Figura 5. El primero era un péptido con un peso molecular monoisotópico de 2420,2 Da. El peso molecular del péptido y las masas de unos pocos fragmentos observados en los espectros de MS/MS (no mostrados) son consistentes con la secuencia PCKILKCNSEFWSATSGSHAPAS (hRGMa 47-69) (SEQ ID NO: 79), aunque la asignación era incompatible con la especificidad de la enzima. El segundo péptido de epítipo potencial con un peso molecular monoisotópico de 2551,2 Da mostraba solo 2-3 fragmentos MS/MS identificables que eran consistentes con la secuencia MPCKILKCNSEFWSATSGSHAPAS (SEQ ID NO: 80). La especificidad de la enzima no era compatible; sin embargo, puesto que el peso molecular del antígeno de partida no coincidía con la masa calculada de la secuencia completa, es posible que el antígeno tenga heterogeneidad N-terminal, lo que explicaría la aparente especificidad enzimática inconsistente.

20 Con el uso de la segunda estructura artificial de antígeno no se pudieron observar péptidos en el espectro de MS después de una reducción con DTT. El análisis de MS después de la reducción en condiciones desnaturalizantes reveló péptidos entre los iones de fondo de una sola carga. Cuatro péptidos procedentes del antígeno se identificaron en la fracción E1 desnaturalizada y reducida. El primer péptido relacionado con el antígeno tenía un peso molecular monoisotópico de 2763,3 Da, el cual, junto con la fragmentación MS/MS, era consistente con la secuencia KAGSPCKILKCNSEFWSATSGSHAPAS (SEQ ID NO: 81) (hRGMa 47-69 con 4 residuos N-terminales adicionales). Los espectros asociados con este péptido se muestran en la Figura 6. Una señal peptídica de intensidad muy baja en el mismo espectro (PM 2878,4 Da; +4 a m/z 720,84, marcada con un asterisco en la Figura 6) era consistente con la secuencia KAGSPCKILKCNSEFWSATSGSHAPPASD (SEQ ID NO: 82). Un péptido de PM 2635,2, que se muestra en la Figura 7, era consistente con la secuencia AGSPCKILKCNSEFWSATSGSHAPPAS (SEQ ID NO: 90). Un péptido adicional a m/z 688,82 (isótopo más abundante, +4 de estado de carga), marcado con un asterisco en la Figura 7, coeluyó con el péptido de PM 2635,2. Los datos limitados de MS/MS obtenidos sobre este componente de baja intensidad eran consistentes con la secuencia AGSPCKILKCNSEFWSATSGSHAPPASD (SEQ ID NO: 83) (PM 2750,3 Da).

25 La tercera estructura artificial de hRGMa se utilizó para tratar de confirmar el epítipo con AE12-1. En la fracción de Elución 1 que se había reducido con DTT, se observó una reducción muy escasa, pero se pudo identificar un péptido por estar relacionado con el antígeno hRGMa y era consistente con los resultados de las otras estructuras artificiales del antígeno. El péptido se observó a m/z 691,60 (+4 de estado de carga), proporcionando un peso molecular monoisotópico de 2762,4 Da. Los datos limitados de MS/MS obtenidos para este péptido (no se muestran) sugieren la secuencia TKLPCKILKCNSEFWSATSGSHAPAS (SEQ ID NO: 84). Otros péptidos que se observaron en el espectro de MS que se podían asignar por estar relacionados con la región de hRGMa (47-168) incluyen DSPEICHYEK (SEQ ID NO: 85); GDLAYHSAVHGIE (SEQ ID NO: 86); DLAYHSAVHGIE (SEQ ID NO: 87); y DDTPEFCAALR (SEQ ID NO: 88).

30 En las fracciones de Elución 1 (digestión con tripsina/Asp-N) procedentes del experimento de escisión del epítipo de hRGMa unido a AE12-1, el péptido hRGMa (47-69) se identificó a partir de tres estructuras artificiales de antígeno. El péptido identificado como el epítipo para hRGMa con AE12-1 es: PCKILKCNSEFWSATSGSHAPAS (hRGMa 47-69) (SEQ ID NO: 79).

Ejemplo 8

ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS

Como la acumulación de hierro en los hepatocitos y la disminución del hierro en el bazo se pueden producir por una neutralización de RGMc, se estudió la toxicocinética y la tolerancia de los anticuerpos monoclonales selectivos de RGMa descritos en esta memoria. Se espera que los estudios muestren que la acumulación de hierro en los hepatocitos y el agotamiento del hierro en el bazo no se produzcan cuando los anticuerpos monoclonales selectivos de RGMa se administran a ratas Sprague-Dawley.

Ejemplo 9

Anticuerpos monoclonales selectivos de RGMa, AE12-1 y AE12-1Y, igual que el anticuerpo monoclonal humanizado 5F9, inducen la regeneración de axones de nervio óptico aplastado, dañado en un modelo de rata de lesión del nervio óptico

El modelo de aplastamiento del nervio óptico (también denominado "lesión del nervio óptico") proporciona un modelo animal para someter a ensayo diversas sustancias que estimulan la regeneración de las fibras del nervio óptico y reducen la muerte celular masiva de células ganglionares de la retina.

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas Wistar machos adultas, obtenidas de los laboratorios Charles River (D) (Alemania). Los animales se mantienen en jaulas individuales con un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas con comida y agua *ad libitum*. El aplastamiento del nervio óptico siempre se realiza solo en el ojo izquierdo mediante cirugía anterior mínima como se describe en P. Monnier et al., J. Neurosci., 31: 10494-10505 (2011), y siguiendo métodos quirúrgicos de la visión anterior humana. Antes y durante la operación, los animales del procedimiento son anestesiados por inhalación de anestesia utilizando Sevoflurano (Abbott GmbH Co. & KG, Delkenheim, Alemania) y se fijan sobre la mesa de operaciones mediante el uso de una atadura de sujeción y cinta adhesiva para las extremidades. Una caída de la temperatura corporal se impide colocando a los animales sobre una almohadilla térmica. Para la cirugía de aplastamiento anterior del nervio óptico de la rata, el ojo izquierdo se libera cuidadosamente del ligamento y tejido conectivo. Como primer paso, se realiza un corte microquirúrgico (2-3 mm) del tejido adyacente en la esquina exterior del ojo. Como paso siguiente, el nervio óptico se expone mediante el uso de un par de fórceps para mover a un lado los músculos del ojo y la glándula lagrimal, preservándolos de ese modo. Como un paso adicional, las meninges se abren longitudinalmente mediante el uso de microtijeras para exponer el nervio óptico. Esto produce una mayor movilidad del ojo y permite la rotación lateral del ojo y el acceso a su nervio óptico izquierdo. El nervio óptico se lesiona aproximadamente 1-3 mm detrás del ojo, utilizando un par de fórceps dispuestos para proporcionar una presión máxima fijada durante 10-20 segundos. Se tiene especial cuidado de no dañar el suministro vascular al ojo.

Después de la cirugía mínimamente invasiva, los animales se colocan sobre toallas de papel en la jaula limpia colocada sobre el calentador para controlar la temperatura corporal hasta que empiezan a moverse. Un ungüento que contiene antibiótico (Gentamytrex, Dr. Mann Pharma) se aplica sobre el ojo para evitar una infección bacteriana y la desecación de la esclerótica.

Se aplica Carprofeno (Rimadyl, 5 mg/kg) por vía intraperitoneal para la terapia del dolor postoperatorio, directamente después de la cirugía y después dos veces al día durante un período de 3 días. Los animales son observados y controlados regularmente durante varias horas, directamente después de la cirugía y los 2-4 días siguientes para asegurarse de que todos los animales sobreviven y se recuperan de la anestesia y la cirugía.

El enfoque modificado de aplastamiento del nervio óptico descrito anteriormente tiene ventajas significativas en comparación con el procedimiento convencional de aplastamiento del nervio óptico que se origina desde la parte posterior del ojo. En concreto, en el procedimiento descrito en el presente documento, no se generan grandes heridas abiertas que requieren una sutura y el riesgo de infección de las heridas muy pequeñas se reduce significativamente. Además, como resultado del menor tiempo necesario para el aplastamiento (el método posterior descrito previamente es aproximadamente 3 veces más rápido que el método posterior conocido en la técnica), los animales sufren menos y por tanto están menos estresados. Por otra parte, la cantidad de dolor que padecen los animales se reduce significativamente y los animales se recuperan con un índice mayor y mucho más rápido.

Administración sistémica de anticuerpos

Para la entrega sistémica de anticuerpos, las ratas Wistar machos fueron tratadas sistémicamente por vía intravenosa, (iv) con un anticuerpo humanizado que bloqueaba RGMa y RGMc, 5F9 (h5F9) (n = 8 animales) (el anticuerpo humanizado 5F9 se describe en el documento de Publicación de Patente de EE.UU. nº 2010/0028340) con un anticuerpo humano selectivo de RGMa, AE12-1, que se describe en este documento y con un mAb de RGMa estrechamente relacionado, AE12-1Y, también descrito en este documento y con un anticuerpo humano de control de isótopo (hIgG) (n = 8 animales). A las ratas se les inyectó una vez por semana por vía intravenosa 10 mg/kg de anticuerpo dado y las inyecciones se iniciaron inmediatamente después del aplastamiento del nervio óptico. Todas las ratas recibieron 5 inyecciones y los animales se sacrificaron 6 semanas después de la lesión por aplastamiento. Los experimentadores estaban cegados y el aislamiento de tejido, el procedimiento, la preparación de secciones y el análisis cuantitativo se realizó como se describe en P. Monnier et al., J. Neurosci., 31: 10494-10505 (2011) y Koeberle et al., Neuroscience, 169: 495-504 (2010).

Se prepararon imágenes compuestas de nervios ópticos de rata, se identificó el sitio de aplastamiento y se contaron

las fibras positivas para GAP-43 que se extendían más allá del sitio de aplastamiento de 500 µm. Como se muestra en la Figura 16, los tres anticuerpos de RGMA - h5F9, AE12-1 y AE12-1Y inducían un crecimiento regenerativo significativo más allá del sitio de aplastamiento, en contraste con los animales de control tratados con hlgG.

Ejemplo 10

5 Anticuerpos monoclonales selectivos para RGMA, AE12-1 y AE12-1Y, igual que el anticuerpo humanizado 5F9, protegen la capa de fibras nerviosas de la retina (RNLF) de una degeneración

Con el fin de observar la protección frente a una degeneración de RNLF, se utilizó un nuevo método de ensayo de laboratorio. Este método se basa en la explantación y el análisis de retinas de rata adulta procedentes de los ojos de ratas con aplastamiento del nervio óptico y tratadas sistémicamente con anticuerpo 5F9, AE12-1, AE2-1Y y anticuerpo de control, IgG humana. Este método es una adaptación de los métodos descritos por P. Monnier et al., J. Neurosci., 31:10494-10505 (2011) y Koeberle et al., Neuroscience, 169:495-504 (2010). P. Monnier et al., J. Neurosci., 31:10494-10505 (2011) y Koeberle et al., Neuroscience, 169:495-504 (2010). A las ratas Wistar machos adultas obtenidas de Charles River Laboratories (Alemania) se les inyectó una vez por semana por vía intravenosa 10 mg/kg de anticuerpo dado y las inyecciones se iniciaron inmediatamente después del aplastamiento del nervio óptico. Todas las ratas recibieron 5 inyecciones y los animales se sacrificaron 6 semanas después de la lesión por aplastamiento.

Preparación de la retina y tinción inmunofluorescente:

Los animales se anestesiaron profundamente con Sevoflurano (8%; Abbott GmbH Co. & KG, Delkenheim, Alemania), a continuación, se sacrificaron inmediatamente mediante la apertura de la caja torácica y se perfundieron con solución de paraformaldehído al 4% (PFA) a través del ventrículo izquierdo del corazón. Los ojos se diseccionaron y el tejido conectivo se ajustó y se colocó en PFA al 4% hasta que se llevó a cabo la preparación de la retina.

La preparación de la retina se realizó en solución salina equilibrada de Hank (HBSS, exenta de magnesio y de calcio; Invitrogen, nº 14170070). El ojo se fijó en el tejido conectivo con las pinzas y se realizó un corte redondo en la esclerótica alrededor de la córnea.

La media esfera de retina se cortó en cuatro puntos, se abrió y se extendió sobre una membrana de nitrocelulosa gris (Sartorius, nº 13006-50-N). Si era necesario, la membrana con la retina sobre ella, se dejó secar al aire durante 5-10 segundos. Después, la retina sobre la membrana se colocó en solución de formaldehído neutra tamponada con fosfato al 10% (pH 7,3; Fisher Scientific, nº F/1520/21) a +4°C hasta que se realizó la tinción inmunofluorescente. La tinción se realizó de acuerdo con el protocolo descrito a continuación.

La preparación de la retina se lavó con TBS, seguido por bloqueo y permeabilización con 5% de BSA, 1% de Triton X-100 en TBS durante 30 minutos y después se lavó de nuevo con TBS. Los anticuerpos primarios, es decir, el Ab monoclonal TUJ-1, un Ab anti-tubulina β III de ratón, AbCam, nº ab14545; dilución 1:500, en TBS, BSA al 5%, se añadieron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad seguido de lavado con TBS, 0,1% de Tween 20. A continuación, un anticuerpo secundario, a saber, de burro anti-Cy3 de ratón; Jackson ImmunoResearch (Dianova) 715-165-151, dilución 1:1000 y Bisbenzimidaz (50 µg/ml de dilución 1:100 en TBS, BSA al 5%) se añadieron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad, seguido de lavado con TBS, 0,1% de Tween 20 y un lavado posterior con H₂O desalada. La preparación se montó después con Fluoromount G y se almacenó a +4°C en la oscuridad.

Análisis cuantitativo del efecto protector de anticuerpos de RGMA sobre la capa de fibras nerviosas de la retina en el ojo (la RNLF)

Usando el programa informático Axiovision se seleccionaron imágenes elegidas al azar (n = 12) de cada retina y el número de fibras nerviosas se determinó para cada imagen. Para estos experimentos, 5 - 8 retinas con los nervios ópticos aplastados, se usaron para cada grupo: el grupo de MAb h5F9, el grupo de MAb e hlgG de control y los grupos de MAb AE12.1 y AE12-1Y. El análisis de los datos y el análisis estadístico se realizaron utilizando el programa GraphPad prism.

Los resultados se ilustran en la Figura 17. Específicamente, se observa un número significativamente mayor de haces de fibras nerviosas en las retinas de animales tratados sistémicamente con anticuerpos de RGMA de la presente invención, en comparación con los animales tratados con el anticuerpo hlgG de control.

Ejemplo 11

50 Anticuerpos de RGMA aceleran la recuperación funcional en un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) focal espinal

Kerschensteiner et al. (Am. J. Pathol. 164: 1455 - 69, 2004) desarrollaron un modelo de EAE focal, localizada en donde las lesiones inflamatorias grandes no se extienden de forma aleatoria en la médula espinal, el cerebro y el nervio óptico, pero se pueden inducir selectivamente en la médula espinal o en otras áreas del cerebro. Empleando este modelo de EAE focal o dirigida, se inducen lesiones inflamatorias grandes, muy similares a las lesiones de la

- médula espinal de la EM, en las columnas dorsales de la médula espinal, que afectan al tracto corticoespinal. En este modelo, las ratas se inmunizaron primero con la proteína de mielina MOG. Dos a tres semanas después de la inmunización, se determinaron los títulos de anticuerpos de MOG y a los animales con una respuesta inmune positiva se les inyectó una mezcla de citocinas (250 ng de TNF α , 150 U de IFN γ) de forma local a nivel torácico 8 (T8).
- 5 Una semana después de la inyección de citocinas, las ratas desarrollaron defectos motores de las extremidades posteriores, parálisis de la cola y alteraciones de la marcha que alcanzaban una puntuación de EAE de 2,5. Cuatro semanas después de la inyección de citocinas, esta puntuación mejoró a una puntuación de EAE de 1 (Kerschens-
teiner et al., Am. J. Pathol. 164: 1455-1469, 2004).
- 10 A ratas Lewis hembras se les inyectó subcutáneamente 75 μ l de MOG (75 μ g, 1-125 aa, BlueSky Biotech, Worcester, MA) disuelta en solución salina y luego se emulsionó con 75 μ l de adyuvante incompleto de Freund (IFA, Sigma, n $^{\circ}$ F5506). Justo antes de la inyección y luego cada 7-8 días, se tomaron muestras de sangre de los animales para analizar las muestras en busca de anticuerpos de MOG.
- 15 Dos o tres semanas después de la inmunización con MOG, se recogió sangre de las ratas inmunizadas y se realizó un ELISA para detectar anticuerpos específicos de MOG. La inmunización dio como resultado una inducción de anticuerpos de MOG en más del 90% de las ratas inmunizadas. En esta cepa, sin embargo, la inducción de anti-
cuerpos de MOG no dio lugar a ningún síntoma de la enfermedad. Las ratas Lewis solamente desarrollaron déficits
motores después de la inyección local de 2 citocinas inflamatorias (TNF α , IFN γ) en la médula espinal torácica a nivel
torácico 8 (T8).
- 20 Para la inyección de citocinas, las ratas se sometieron a una inhalación de anestesia con Sevoflurano (8%; Abbott
GmbH Co. & KG, Delkenheim, Alemania) y se realizó una laminectomía por un procedimiento convencional. Especí-
ficamente, la piel en la parte posterior de la rata se afeitó y se desinfectó con 70% de etanol, después el área afeita-
da se limpió con la prodina y se realizó un corte de 2-3 cm con un escalpelo, partiendo aprox. de T3-4 hasta T11-12.
La grasa superficial se separó de los músculos con unas tijeras finas y los músculos se cortaron por la línea media a
lo largo de la columna vertebral desde un costado. El hueco entre T8 y T9 se localizó y T8 se eliminó del tejido ad-
yacente. Se empleó un microtaladro para hacer un agujero redondo de aproximadamente 1-2 mm de diámetro en T8
y unos fórceps con punta pequeña se utilizaron para eliminar el periostio y cualquier fragmento de hueso. A conti-
nuación, se retiró la duramadre con unas microtijeras y se realizó una inyección estereotáctica con un capilar de
vidrio muy delgado, conectado a una jeringa de Hamilton de 10 μ l con Luer Tip (LT), y se llenó con aceite mineral
(Sigma Aldrich).
- 25 Mediante el uso de un inyector automático, el capilar se llenó con 3 μ l de mezcla de citocinas en PBS o solo PBS
con trazas de azul de Evans. Se utilizó una dosis cuatro veces (4x) mayor de TNF α (1000 ng) y la misma dosis de
IFN γ (150 U) como había descrito Kerschens-teiner et al. (2004). La dosis cuatro veces mayor dio lugar a una exten-
sión significativa del proceso de recuperación en las ratas tratadas con vehículo o de control.
- 30 En la siguiente etapa, se insertó un capilar de vidrio a una profundidad de 0,7 mm y se inyectaron 2 μ l de la mezcla
de citocinas en el medio de la médula espinal en (T8) durante un período de 5 minutos usando un inyector automáti-
co. Después de aplicar lidocaína y de cerrar la herida, las ratas fueron tratadas con el fármaco analgésico Rimadyl
(directamente después de la cirugía y diariamente durante otros 3-4 días). Después las ratas se colocaron en una
jaula limpia sobre toallas de papel y se mantuvieron con calor hasta que se despertaron.
- 35 Las ratas desarrollaron los primeros síntomas en el transcurso de una semana después de la inyección de las citoci-
nas. El tratamiento con anticuerpos se inició el día 7 u 8 después de la aplicación de las citocinas. Se empleó un
anticuerpo de control hIgG y varios anticuerpos de RGMa diferentes (a saber, AE12-1, AE12-1Y y 5F9.23 humaniza-
do (h5f9.23 que se describe en el documento de Publicación de Patente de EE.UU. n $^{\circ}$ 2010/0028340)) y las ratas se
trataron una vez por semana a través de la vía intravenosa. La puntuación de EAE se realizó diariamente y se do-
cumentaron las puntuaciones. Las personas que llevaban a cabo los experimentos estaban cegadas para los dife-
rentes grupos de tratamiento. Después de un período de 27 - 29 días de la administración de las citocinas, se sacri-
ficaron los animales, las médulas espinales se aislaron y se analizaron en busca de expresión de las siguientes
proteínas: GAP-43 (marcador de la regeneración), CD68 (marcador inflamatorio para células de microglía y macró-
fagos activados) y MPB (proteína básica de mielina, un marcador de la remielinización o de conductos de mielina
conservados). Se midió el área de estos marcadores, se analizó y se evaluó estadísticamente usando ANOVA de
una vía y una prueba de significación de Bonferroni. Como se muestra en la Figura 18, los tres anticuerpos de
RGMa aceleraban la recuperación funcional en el modelo de tEAE espinal.
- 40 En el modelo de tEAE espinal, todos los anticuerpos de RGMa mostraban una actividad estimulante de la regenera-
ción y neuroprotección muy similar. Los anticuerpos selectivos de RGMa AE12-1 y AE12-1Y mostraban una activi-
dad similar en comparación con h5F9.23, que neutraliza tanto RGMa como RGMc. Una neutralización de RGMc no
parece ser necesaria para la eficacia. Por lo tanto, para entender mejor el mecanismo de acción de los tres mAbs de
RGMa en el modelo de EAE espinal focal, se evaluaron varios marcadores en secciones seriadas de médulas espina-
les de ratas tratadas con los anticuerpos, AE12-1Y, AE12-1 y h5F9.23 aumentaban el área de regeneración
(GAP-43), el área de remielinización (proteína básica de la mielina (MBP)) y disminuían el área inflamatoria de CD68
(CD68-positiva) alrededor del sitio de la lesión espinal (Véase, Figura 19).
- 45
50
55

5 El anticuerpo selectivo de RGMA AE12-1Y-QL se sometió a ensayo para determinar qué dosis de este anticuerpo son activas en este modelo de tEAE espinal. Específicamente, se administraron 4 dosis de anticuerpo diferentes (a saber, 0,01, 0,1, 1, 10 mg/kg) por vía iv, sistémicamente una vez por semana a las ratas. AE12-1Y-QL mostraba actividad significativa a 0,1, 1 y 10 mg/kg (Figura 20). Sin embargo, una dosis de 0,01 mg/kg no mostraba eficacia.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal anti-Molécula de Orientación Repulsiva a (RGMa) aislado que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una región determinante de la complementariedad (CDR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 73.
- 10 2. El anticuerpo monoclonal anti-RGMa aislado según la reivindicación 1, en el que la CDR3 de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73.
3. El anticuerpo monoclonal anti-RGMa aislado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es humano.
- 15 4. El anticuerpo monoclonal anti-RGMa aislado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada de un isotipo IgG.
5. El anticuerpo monoclonal anti-RGMa aislado según la reivindicación 4, en el que el isotipo de IgG es isotipo IgG1 humano.
6. El anticuerpo monoclonal anti-RGMa aislado según la reivindicación 5, en el que el dominio constante de IgG1 humana comprende SEQ ID NO: 140, 141, 142 o 143.
- 20 7. El anticuerpo monoclonal anti-RGMa aislado según la reivindicación 5, en el que el dominio constante de IgG1 humana comprende SEQ ID NO: 143.
8. El anticuerpo monoclonal anti-RGMa aislado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera lambda.
- 25 9. El anticuerpo monoclonal anti-RGMa aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el anticuerpo comprende una secuencia de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO: 146 y una secuencia de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO: 147.
10. El anticuerpo anti-RGMa según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el anticuerpo comprende adicionalmente un agente seleccionado a partir del grupo que consiste en: una molécula de inmunoadhesión, un agente de formación de imágenes y un agente terapéutico,
- 30 en donde el agente de formación de imágenes se selecciona a partir del grupo que consiste en un radiomarcador, una enzima, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador bioluminiscente, un marcador magnético y biotina, y
en donde el radiomarcador se selecciona a partir del grupo que consiste en 3H, 14C, 35S, 90Y, 99Tc, 111In, 125I, 131I, 177Lu, 166Ho y 153Sm.
- 35 11. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-RGMa según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

FIGURA 1

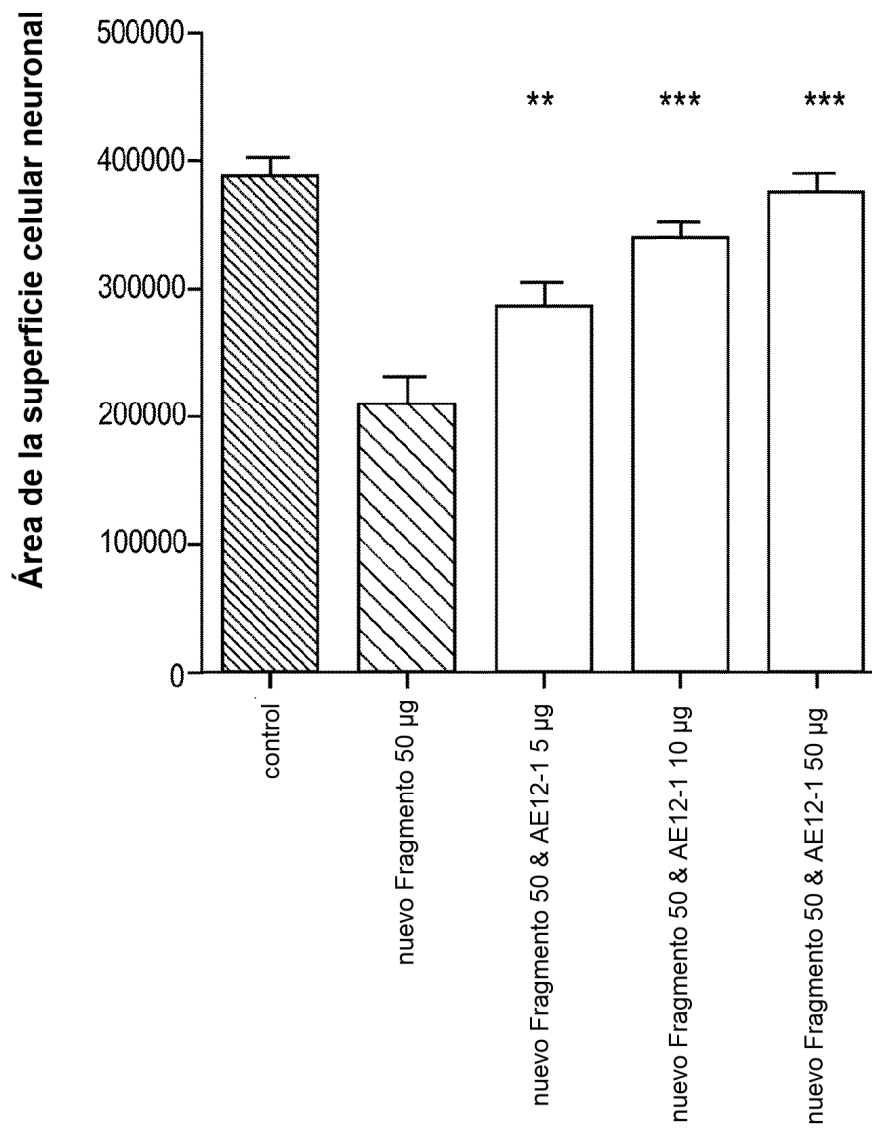


FIGURA 2

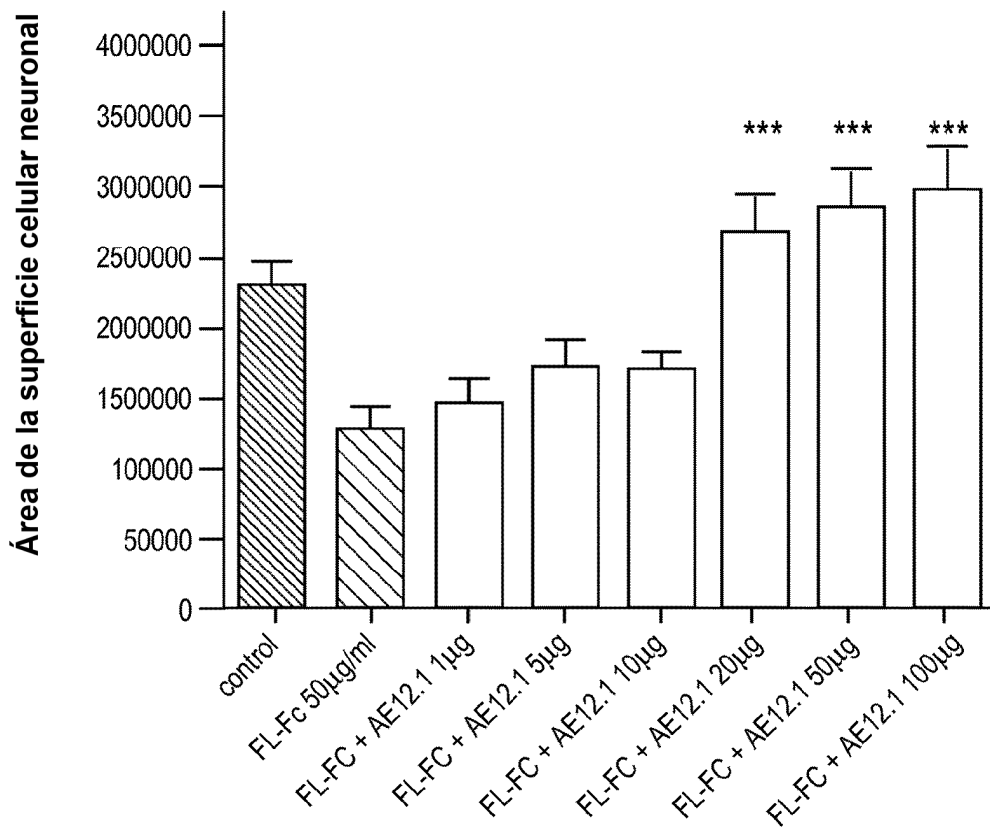


FIGURA 3

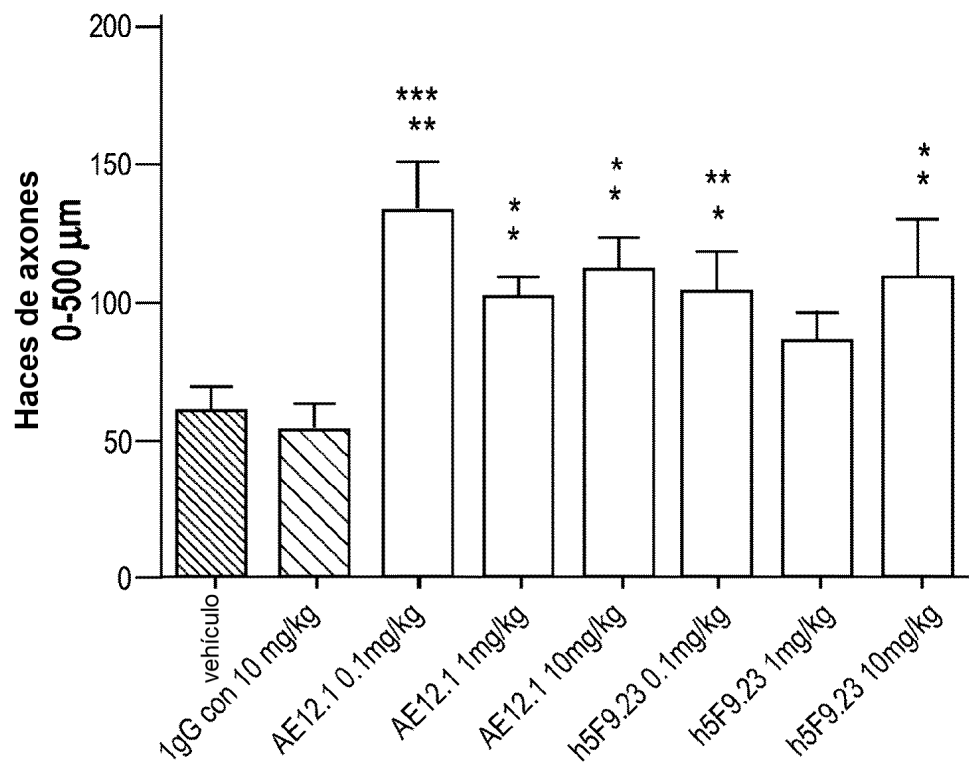


FIGURA 4

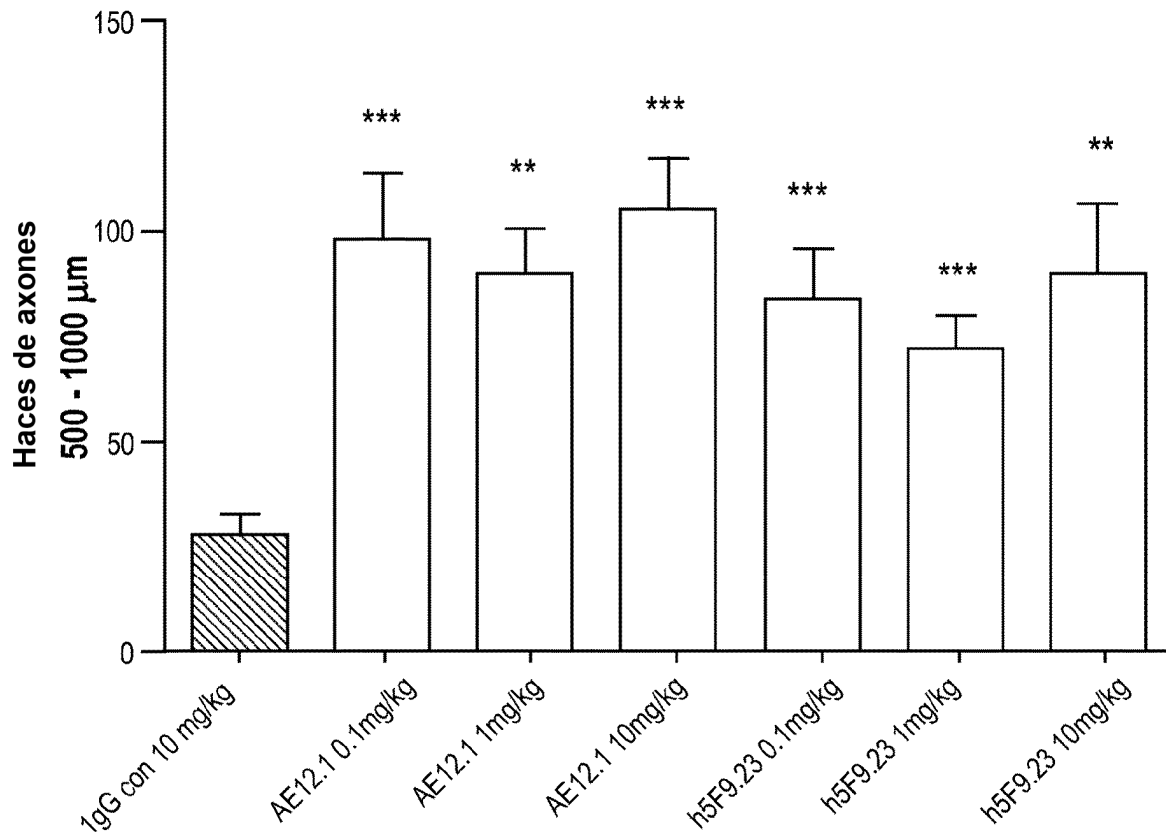


FIGURA 5

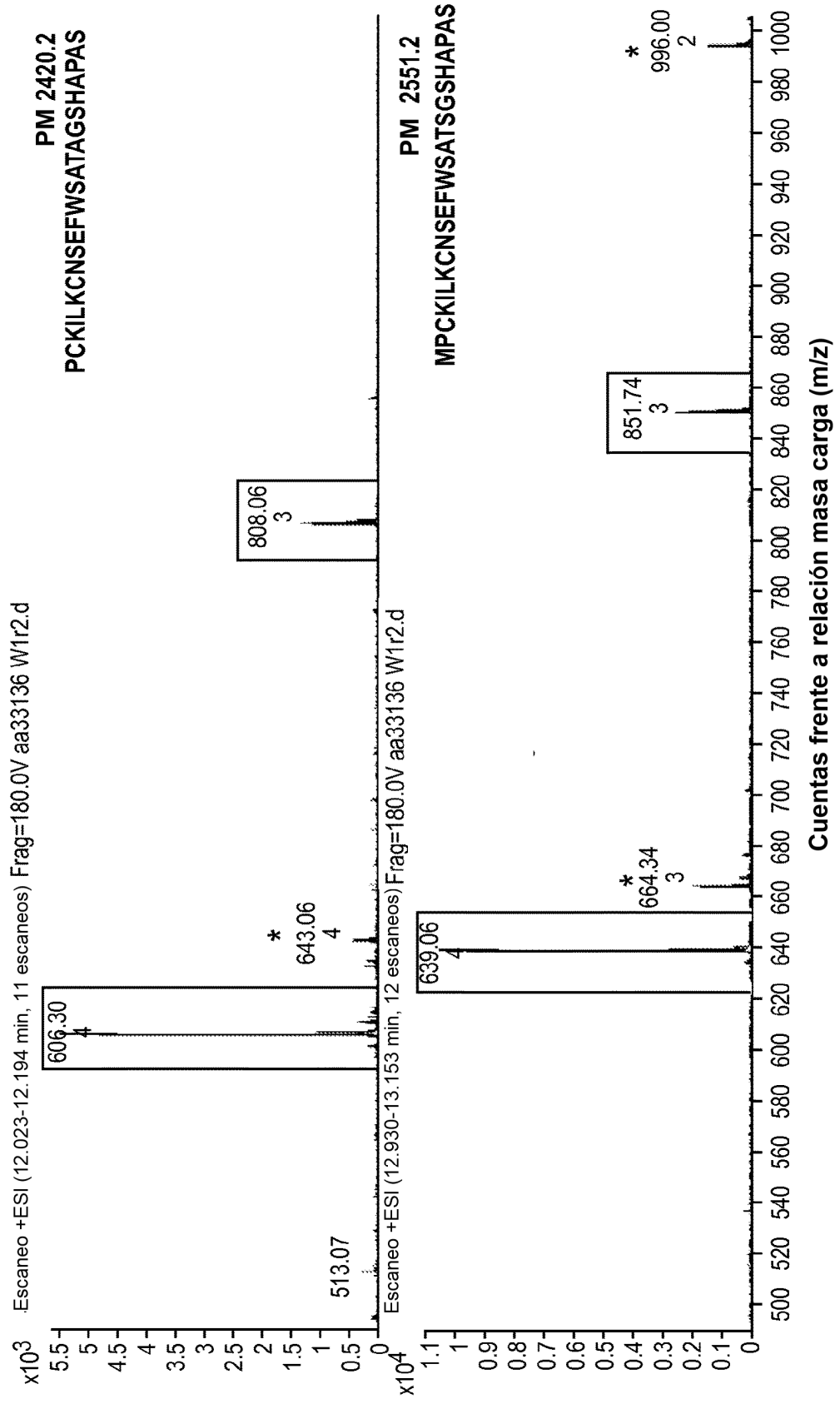


FIGURA 6

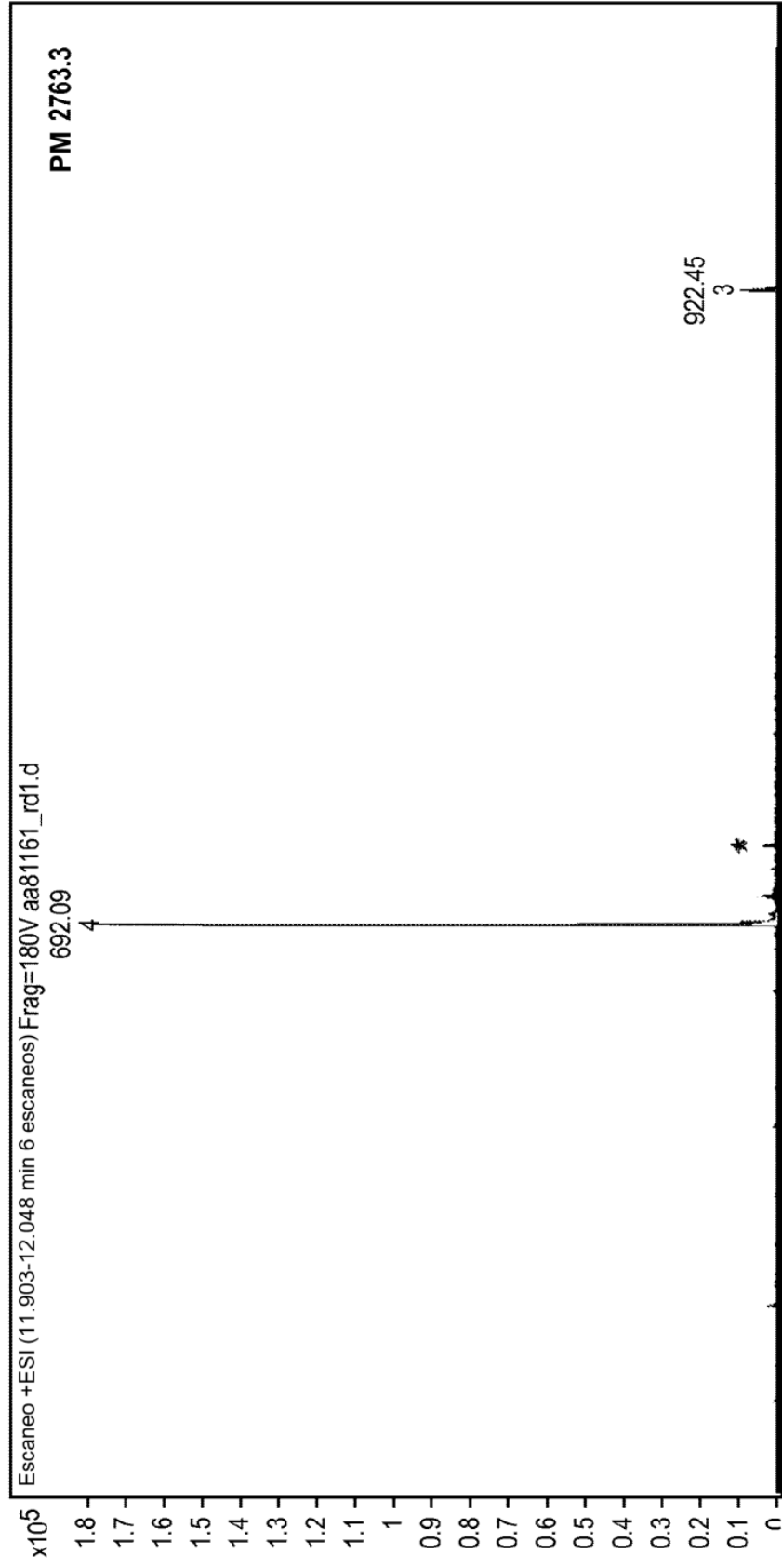


FIGURA 6 (continuación)

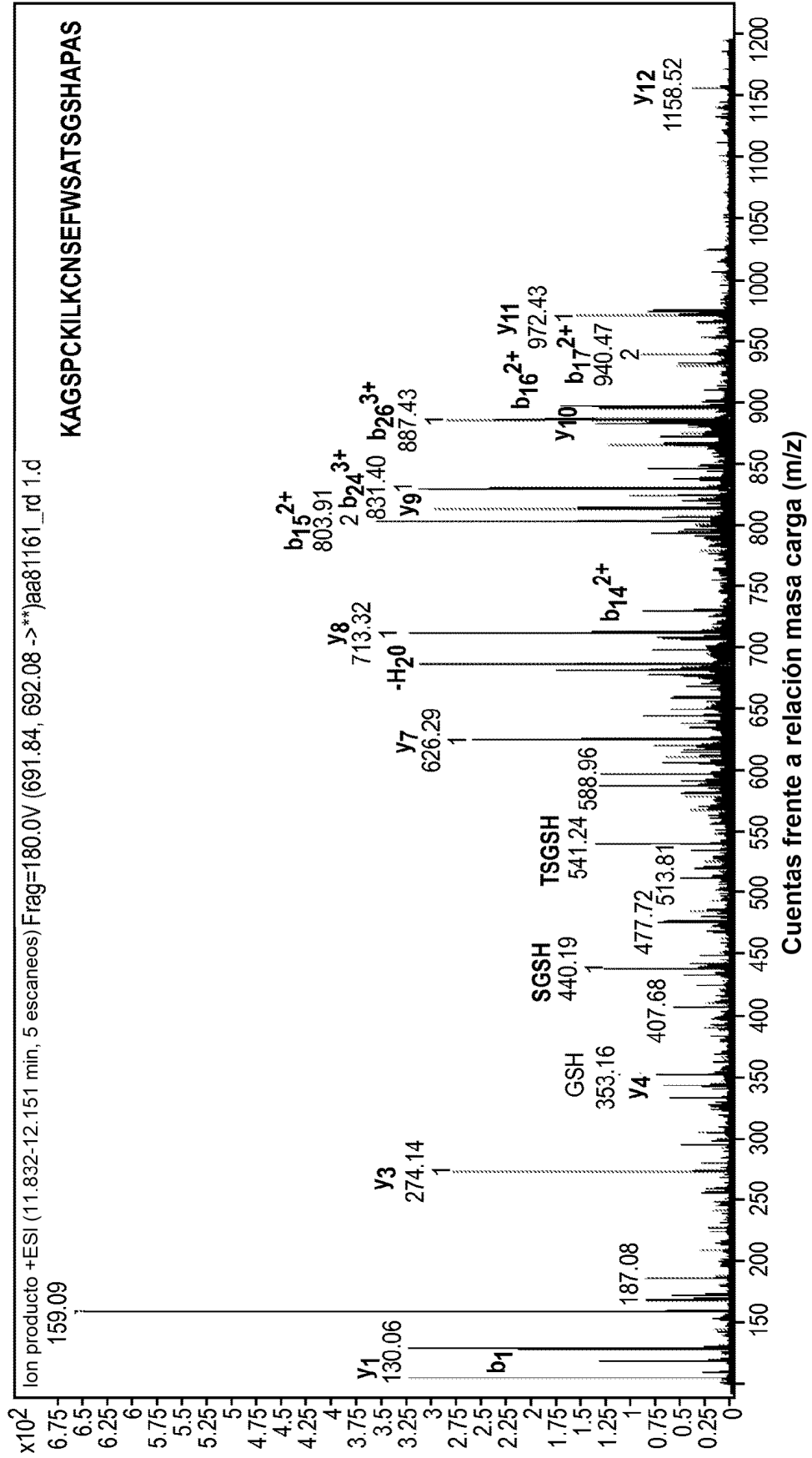


FIGURA 7

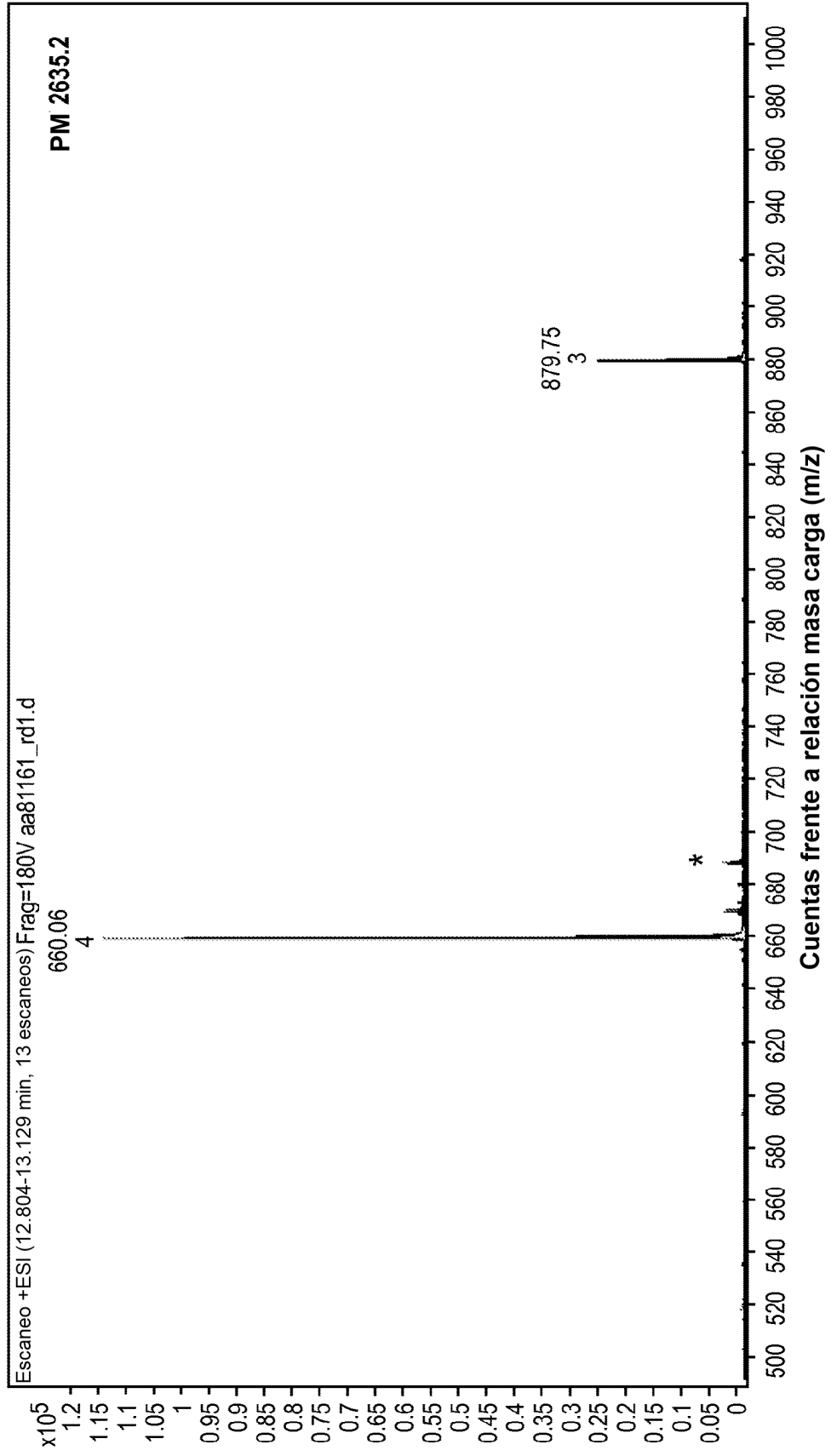


FIGURA 7 (continuación)

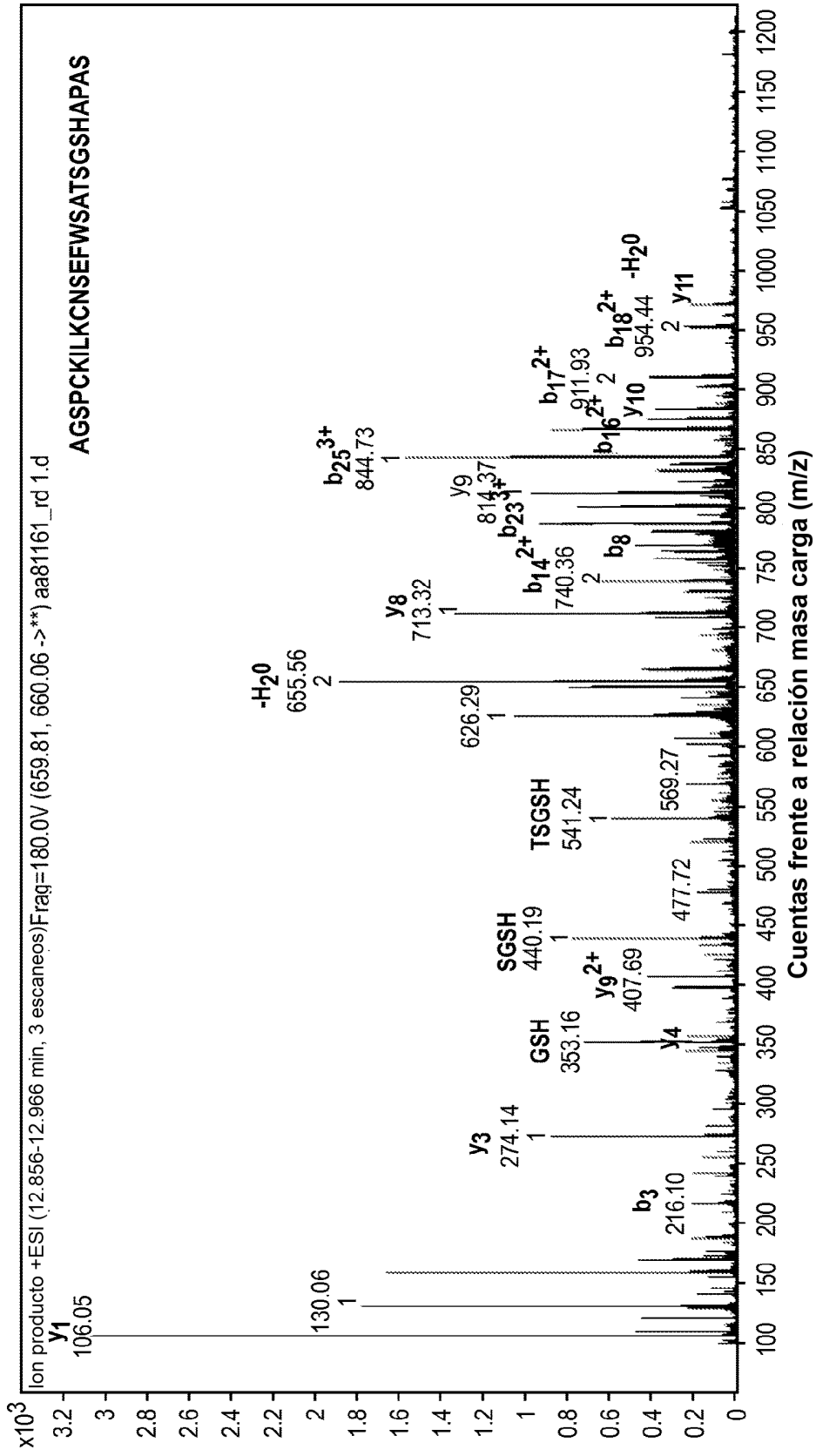
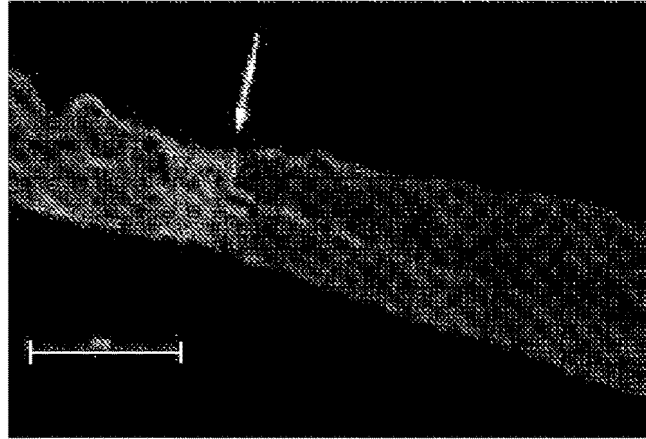
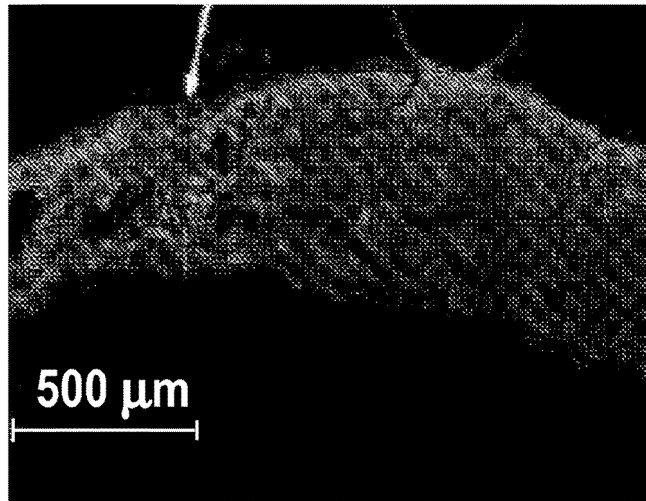


FIGURA 8

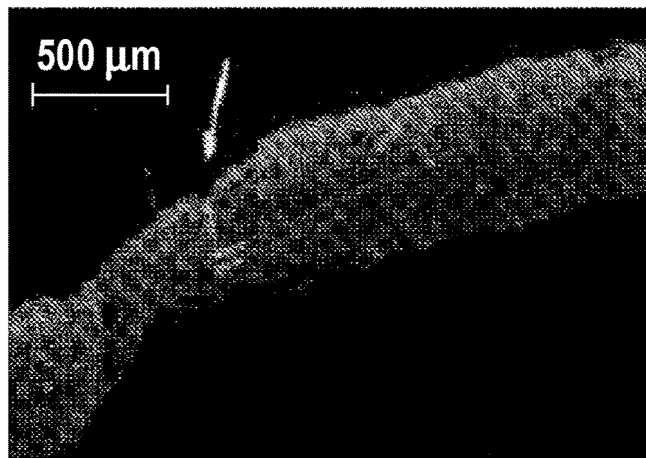
hlgG 10 mg/kg



AE12-11 mg/kg



h5F9.23 1 mg/kg



cerebro →

FIGURA 9

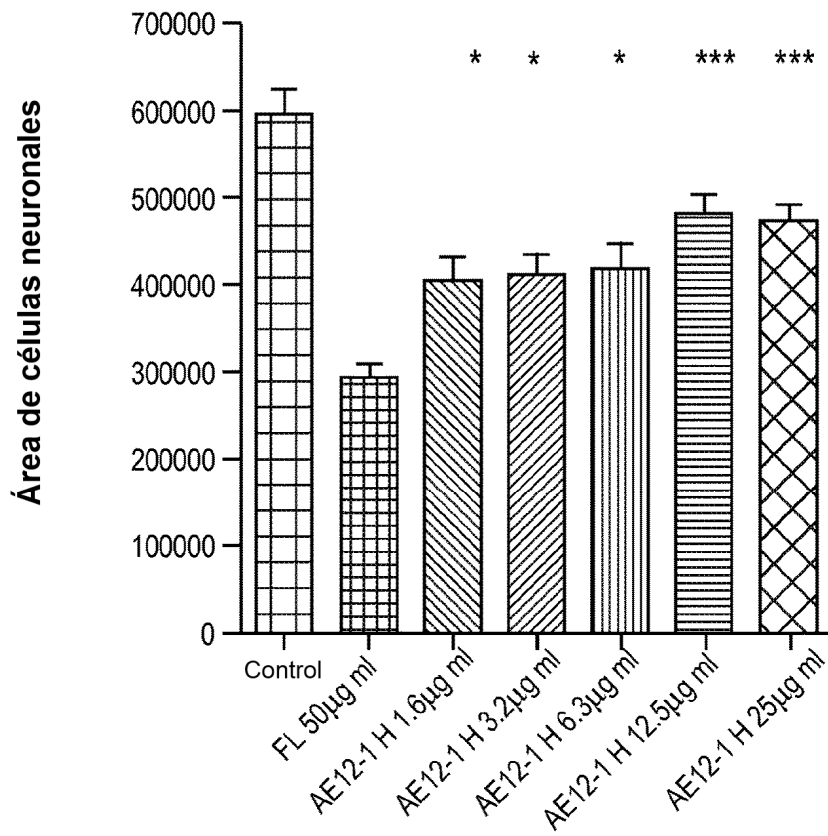
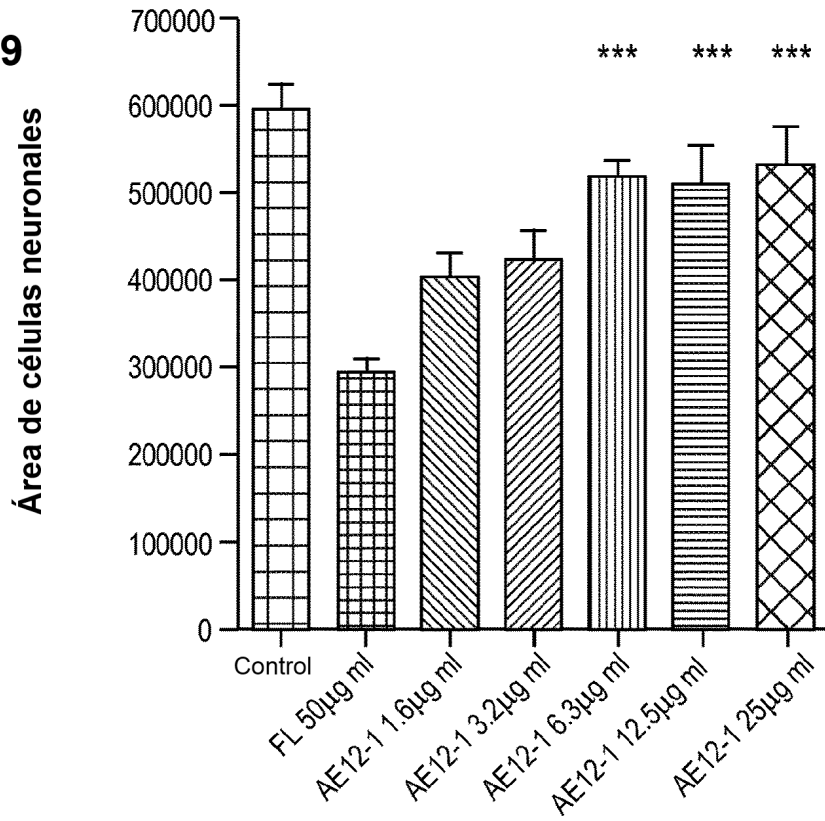


FIGURA 10

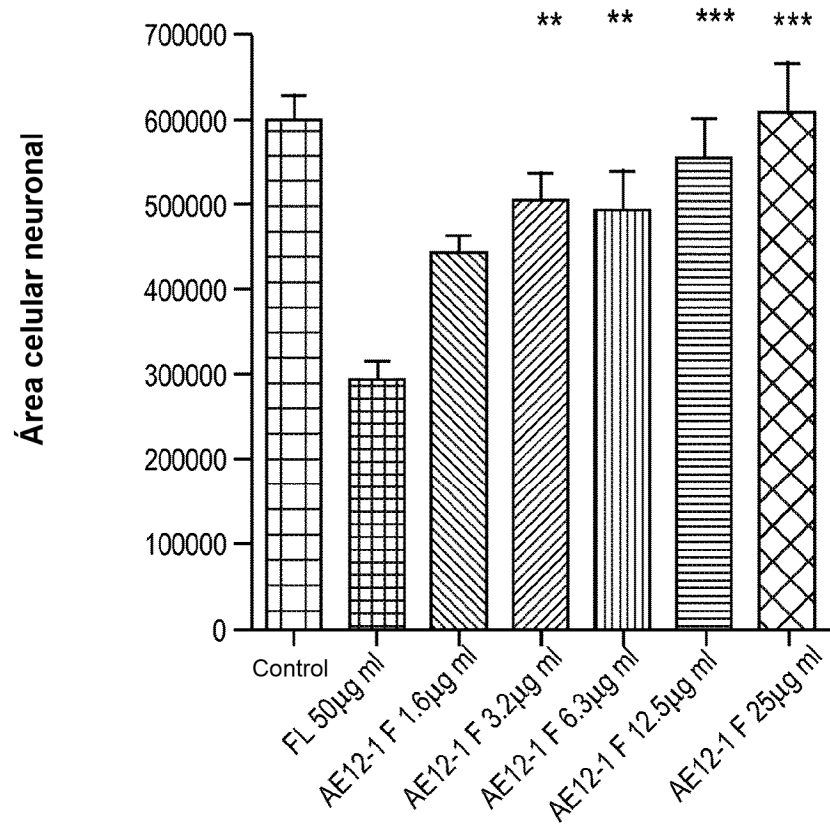
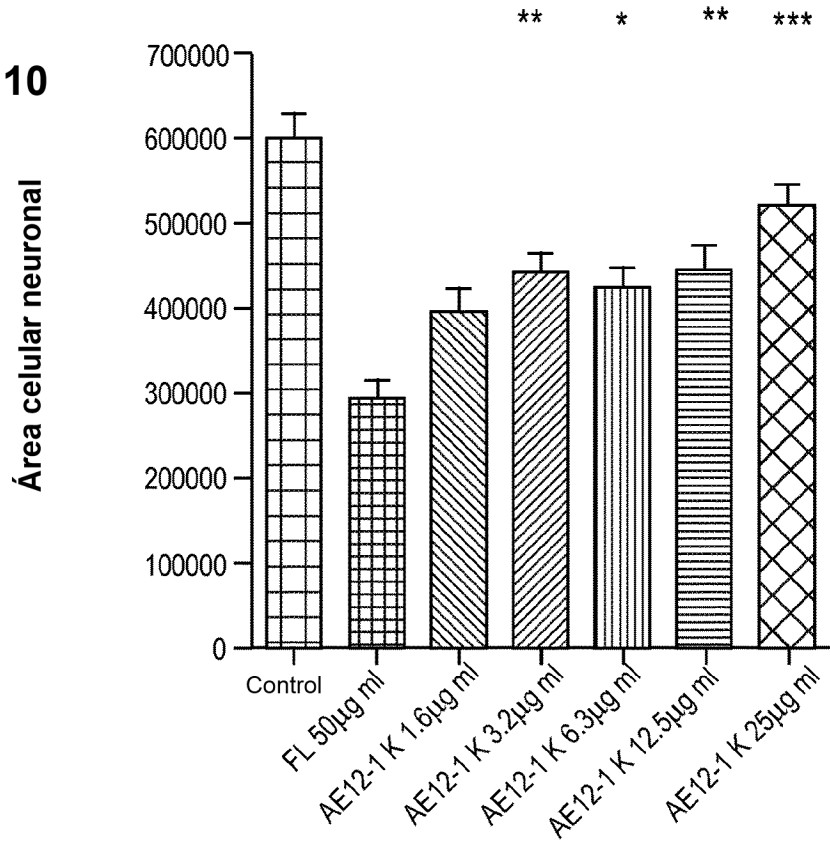


FIGURA 11

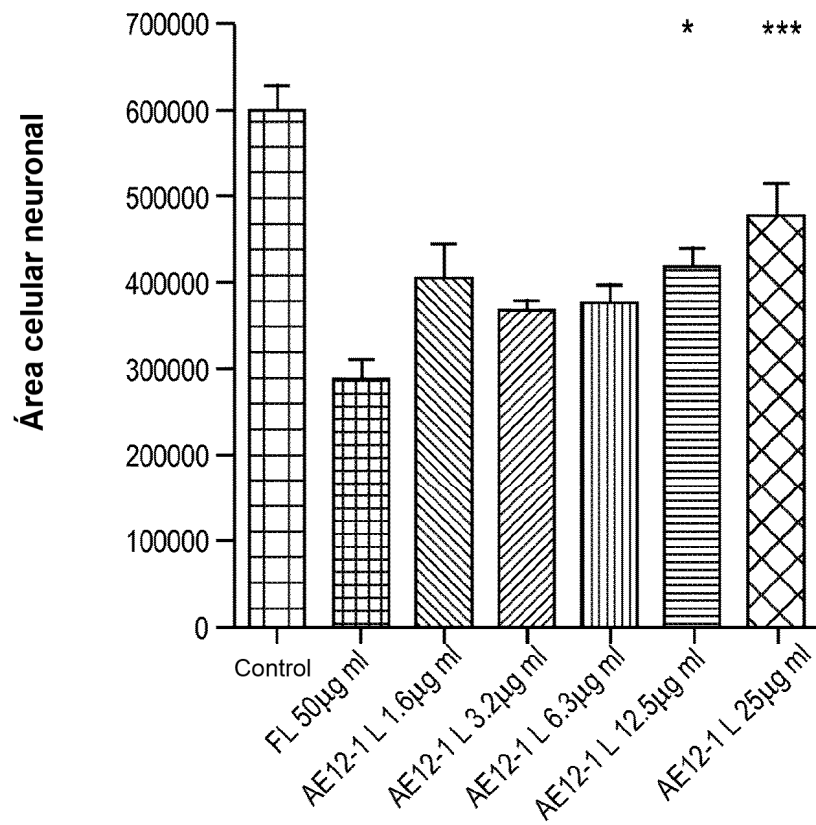
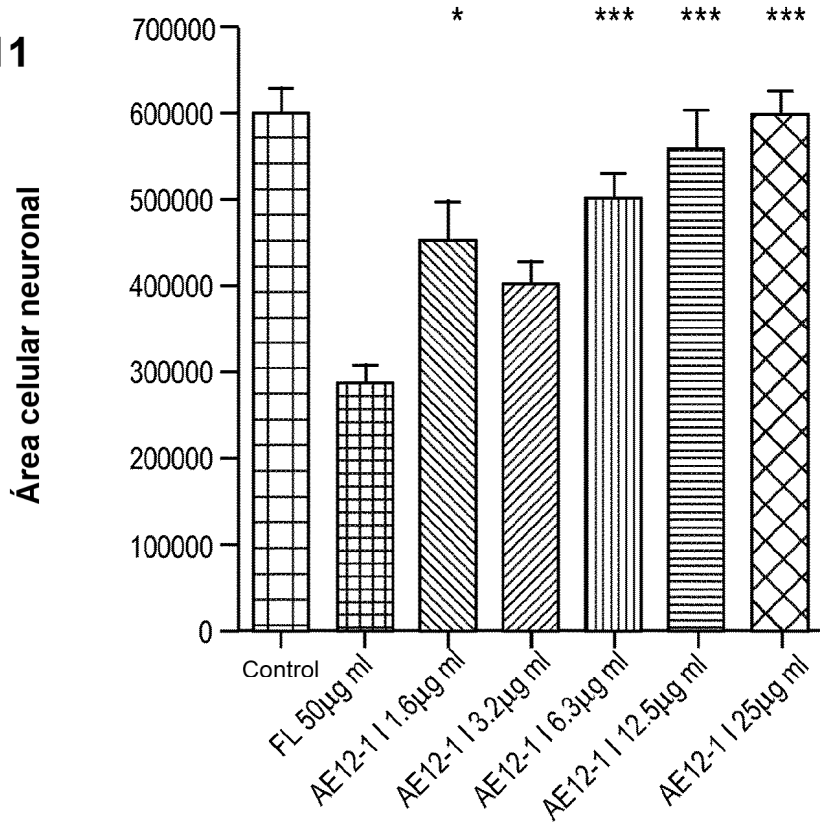


FIGURA 12

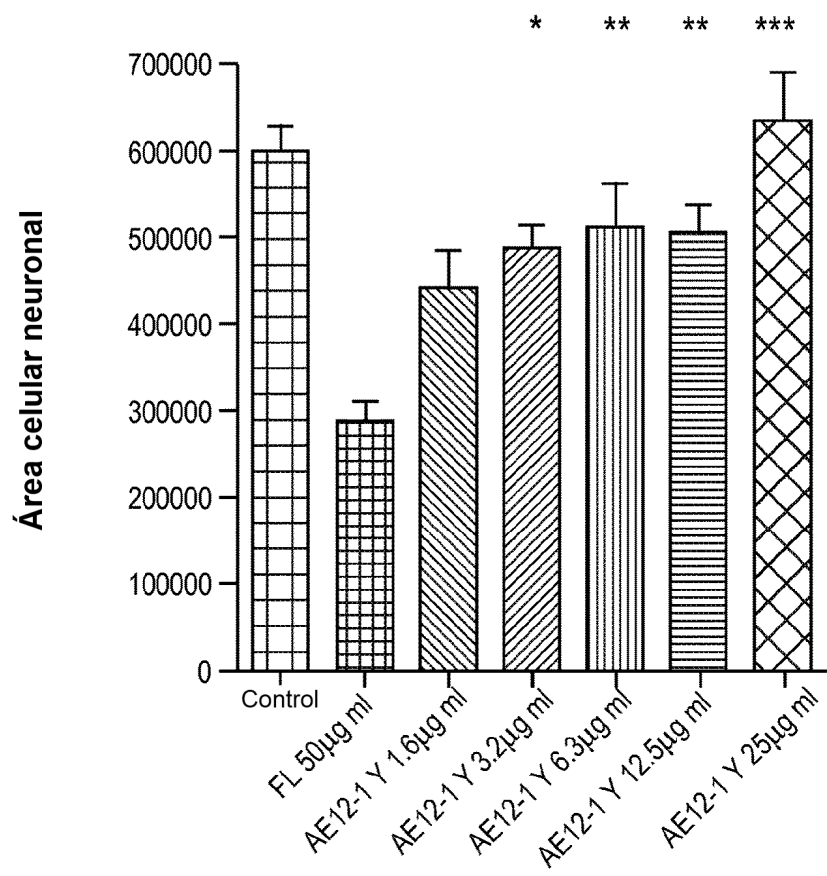
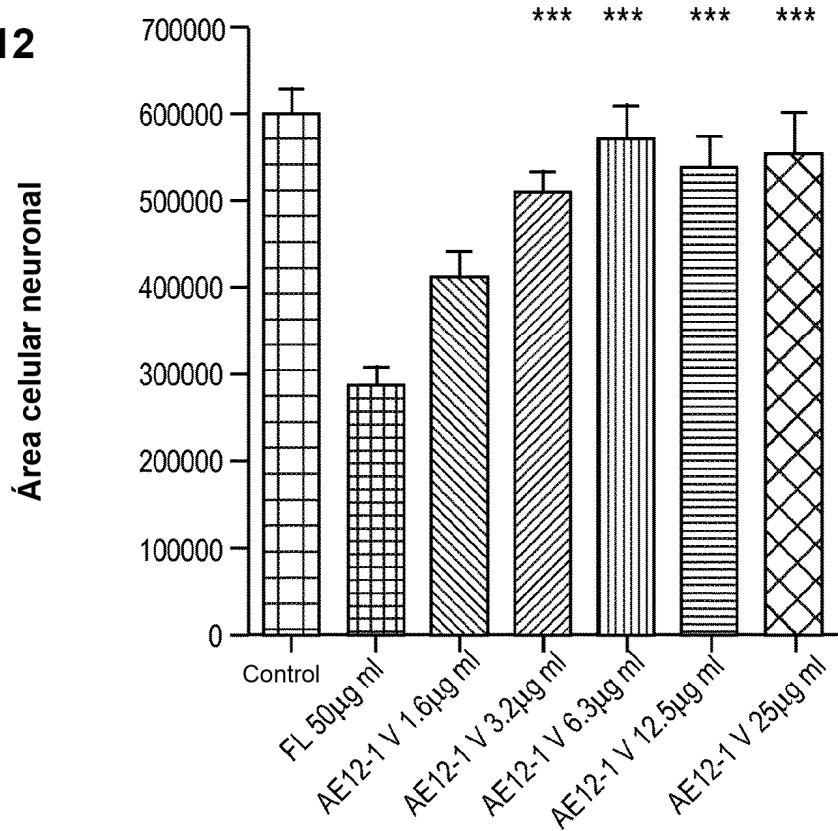


FIGURA 13

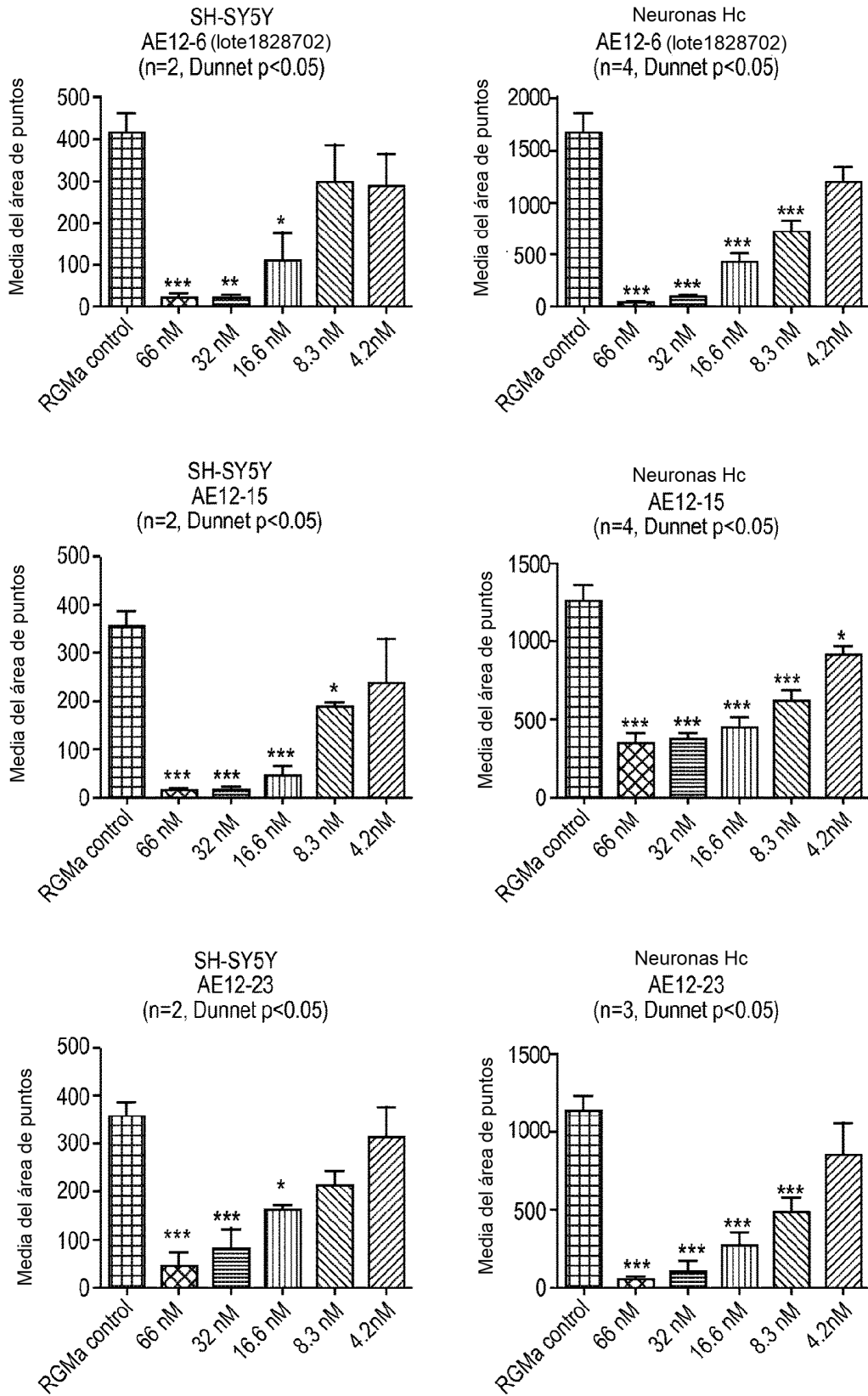
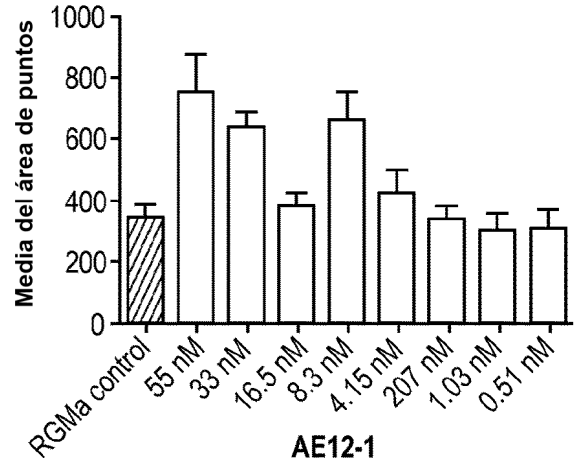


FIGURA 14

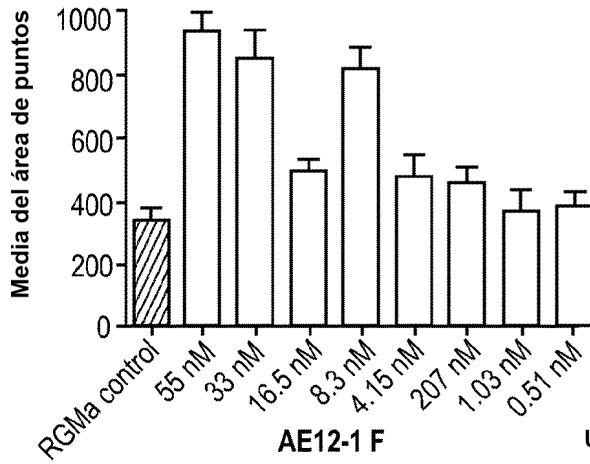
Unión de RGMa-Fc sobre células SH-SY5Y

AE 12-1
2011-12-21



Unión de RGMa-Fc sobre células SH-SY5Y

AE 12-1 F
2011-12-21



Unión de RGMa-Fc sobre células SH-SY5Y

AE 12-1 H
2011-12-21

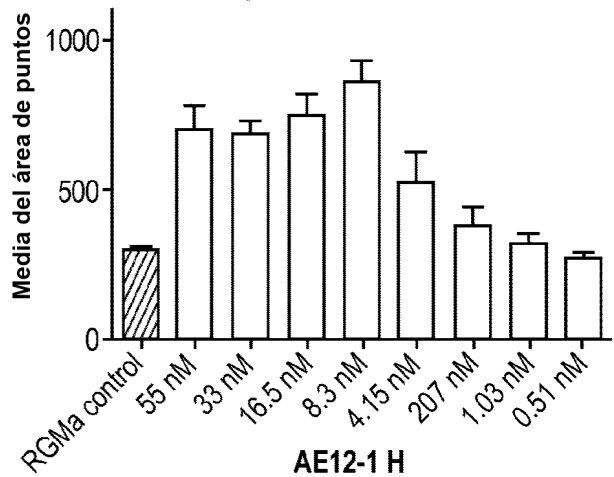
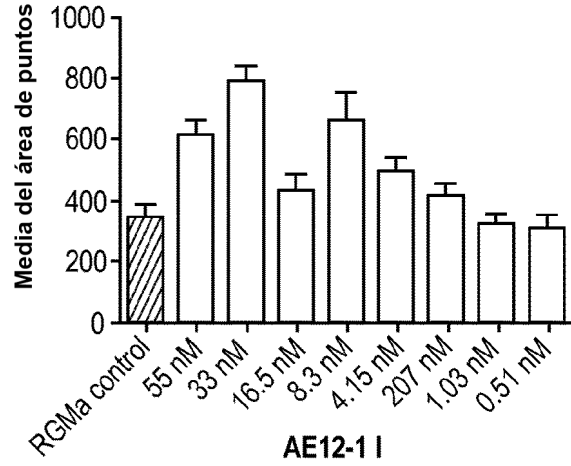


FIGURA 14 (continuación)

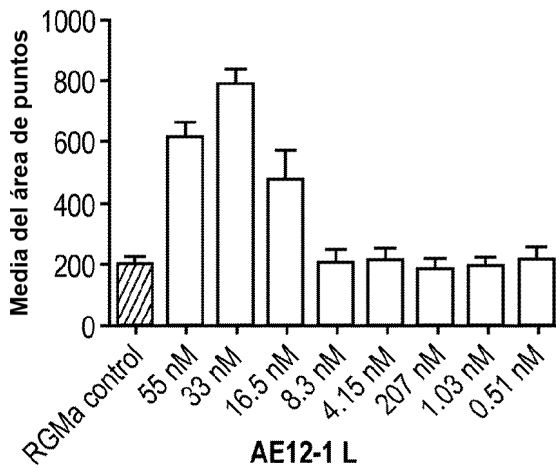
Unión de RGMa-Fc sobre células SH-SY5Y

AE 12-1 I
2011-12-21



Unión de RGMa-Fc sobre células SH-SY5Y

AE 12-1 L
2011-12-21



Unión de RGMa-Fc sobre células SH-SY5Y

AE 12-1 K
2011-12-21

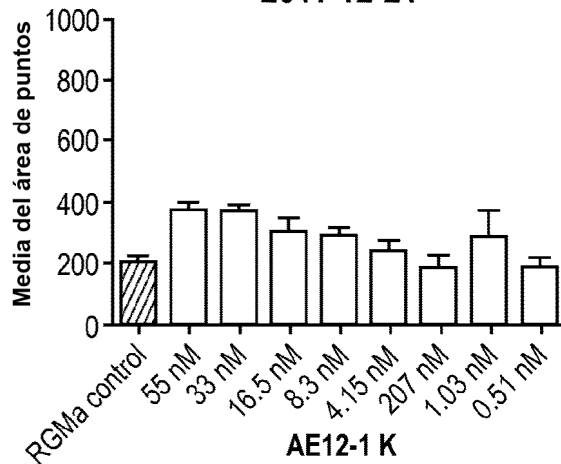


FIGURA 14 (continuación)

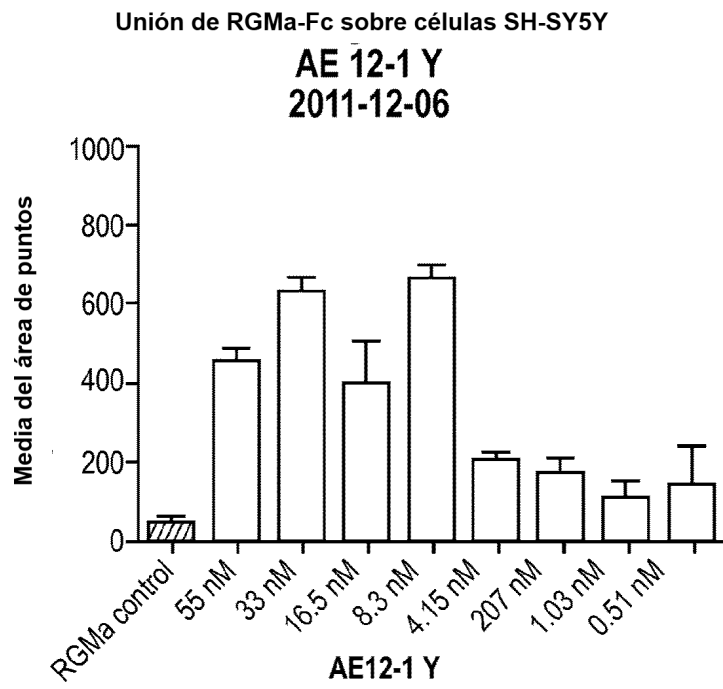
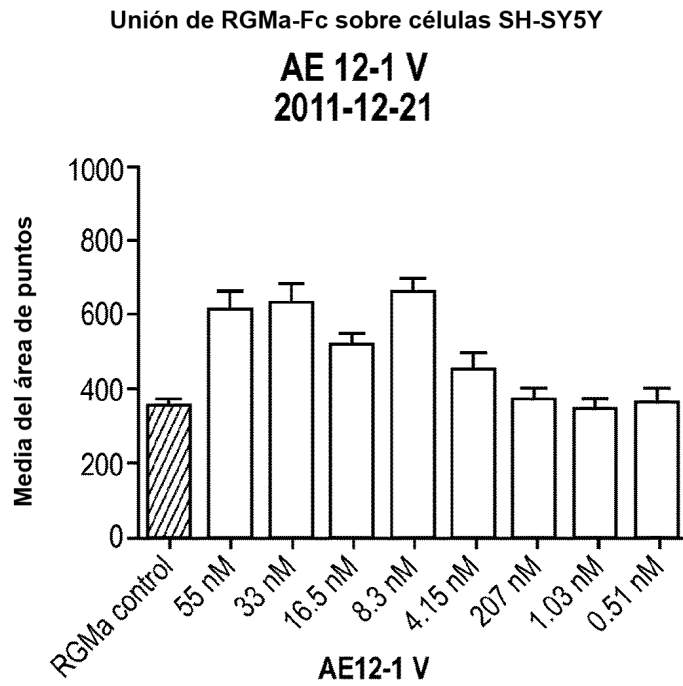
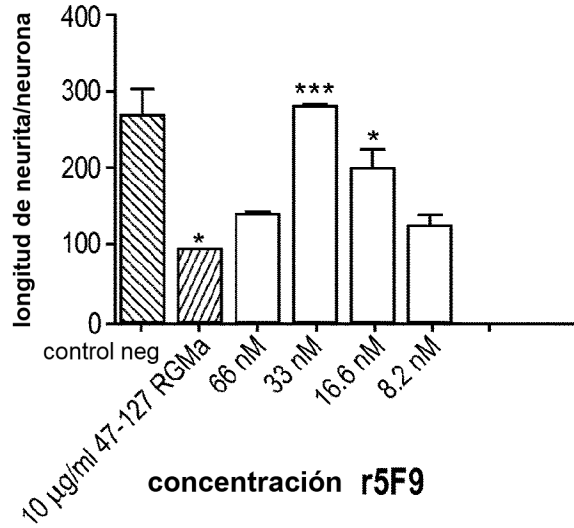
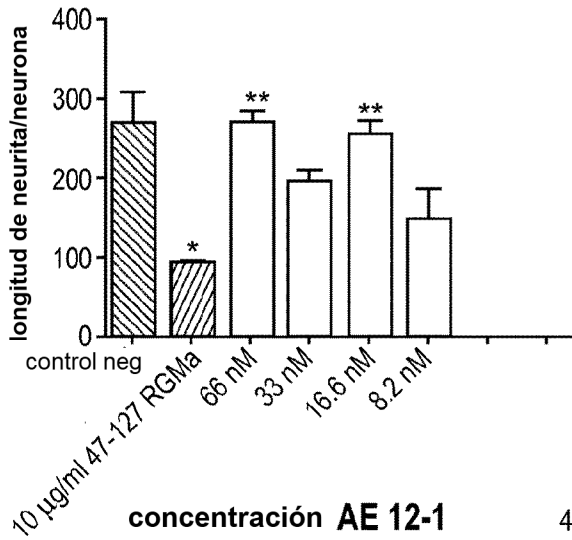


FIGURA 15

RGMA-(47-127)
neuronas Hc de rata 3DIV
(2011-09-23)
r5F9



RGMA-(47-127)
neuronas Hc de rata 3DIV
(2011-09-23)
AE 12-1



RGMA-(47-127)
neuronas Hc de rata 3DIV
(2011-09-23)
AE 12-6

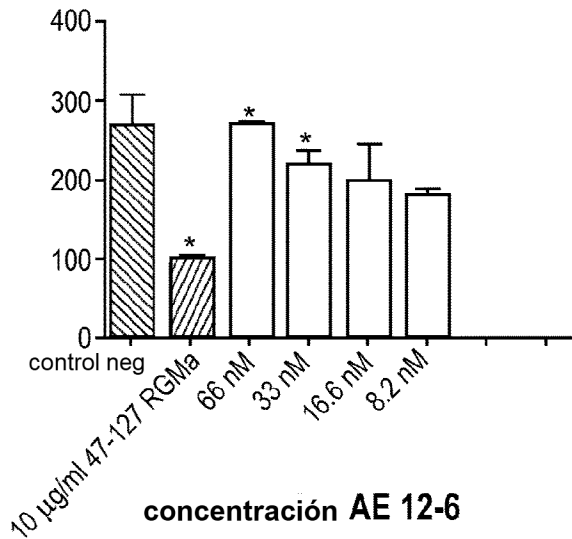


FIGURA 16

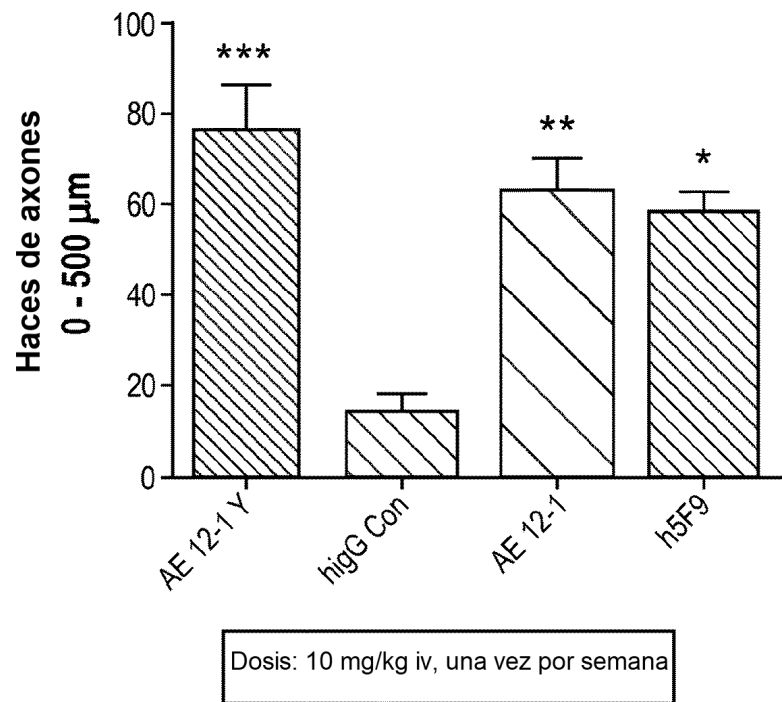


FIGURA 17

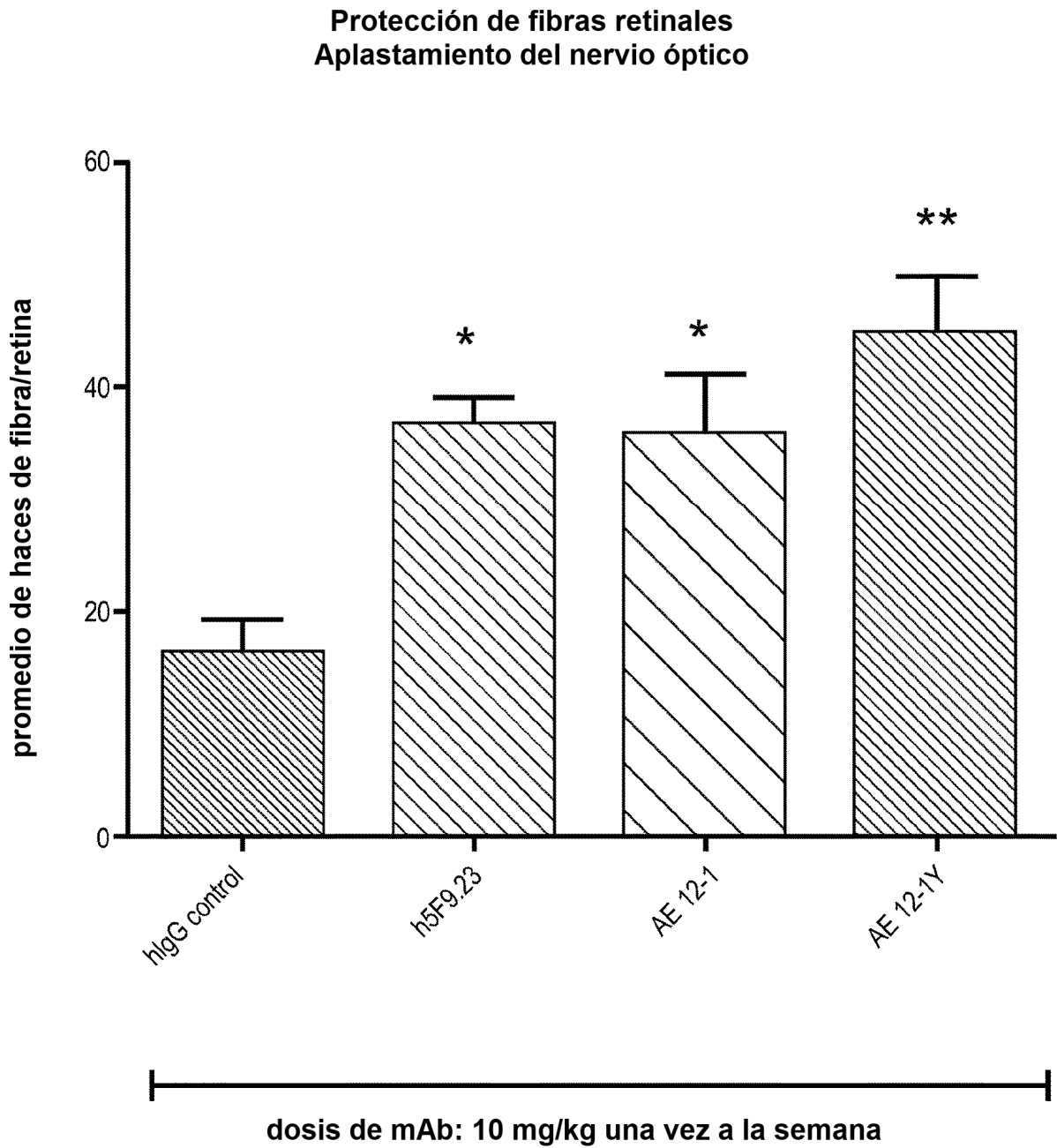


FIGURA 18

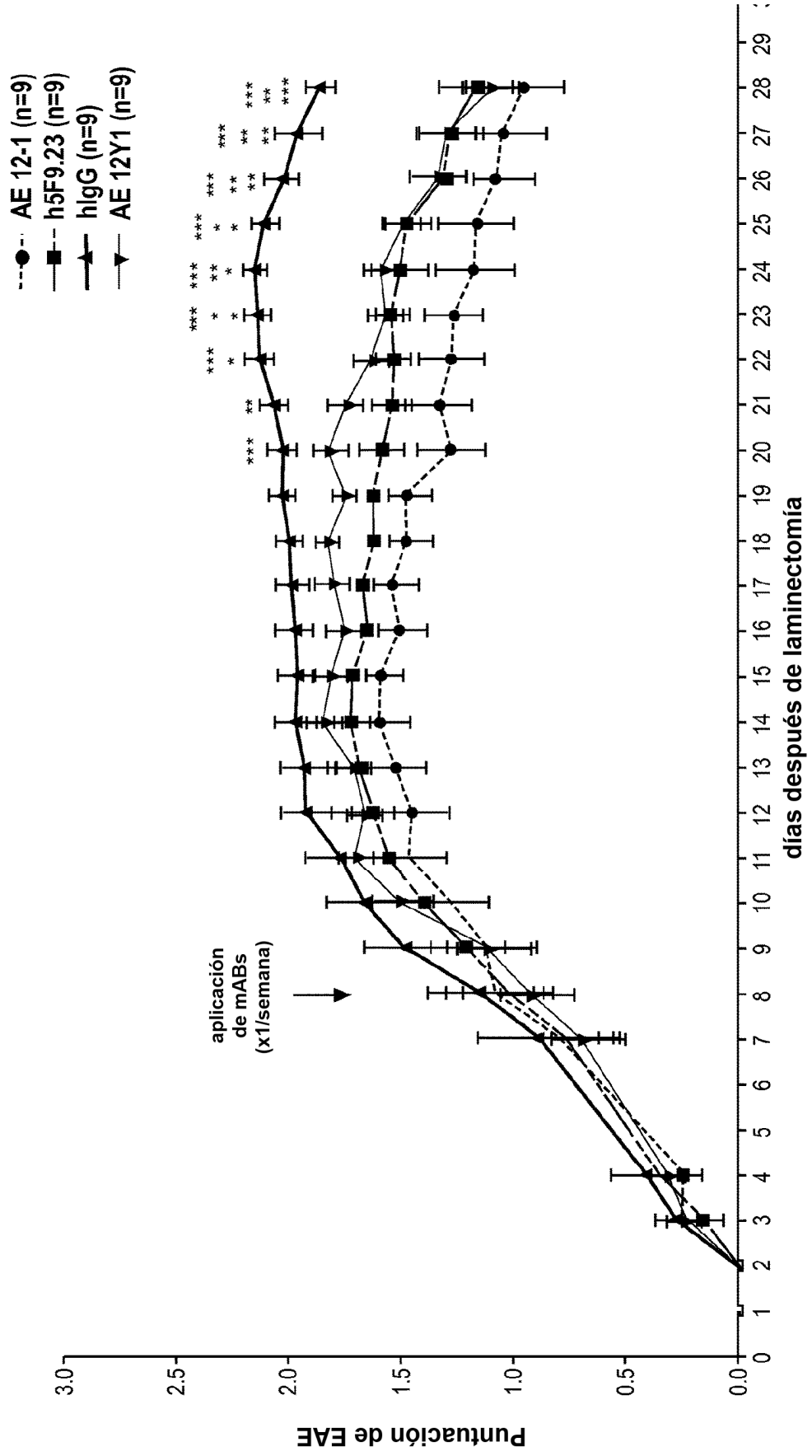


FIGURA 19

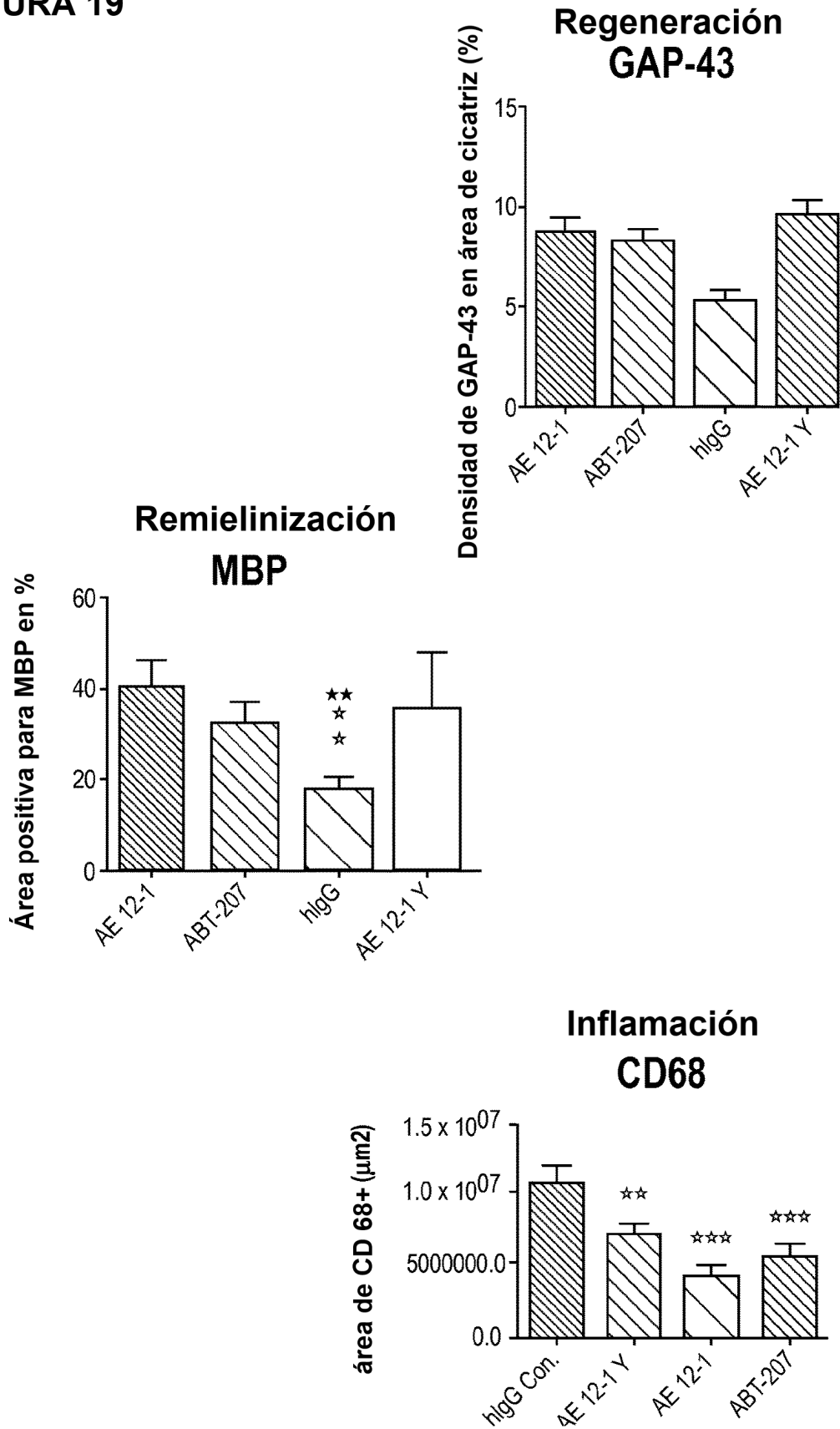


FIGURA 20

5 M1 215
EAE espinal dirigida en ratas Lewis

