Organizacion y Digitalizacion CSA Ltda

PCT

Organizacion y Digitalizacion CSA Ltda

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA
Republica de Colombia
Ministerio de Comercio, Industria y Turismo

PROPIEDAD INDUSTRIAL

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nueva

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-117825- -00000-0000
Fecha: 2010-09-23 13:26:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: ~~288~~ 368

SOLICITU

PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. 10-117825

54. TITULO: **ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROTEINA RGM A Y SUS USOS**

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: **C07K 16/22, A61K 39/395**

71. SOLICITANTES: **ABBOTT GMBH & CO. KG**
ABBOTT LABORATORIES

DOMICILIO: **Max-Plack-Ring 2, 65205 Weisbaden – ALEMANIA**
100 Abbott Park Road, Abbott Park, Illinois 60064, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO: **Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.**

22. BOGOTA, D.C., 23 SET. 2010

29-09-2010
Poder Abbott Park

0001

PE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-117825- -00000-0000
Fecha: 2010-09-23 13:26:20 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 268

radicación

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTES
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

(1)

[X] **Patente de Invención.** [ ] **Patente de Modelo de Utilidad.**

[X] **Capítulo I** [ ] **Capítulo II**

(2) **SOLICITANTE (71)**

Nombre: **1. ABBOTT GMBH & CO. KG y 2. ABBOTT LABORATORIES**
Dirección: 1. **Max-Plack-Ring 2 65205 Weisbaden ALEMANIA y** 2. **100 Abbott Park Road Abbott Park, Illinois 60064 ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**
Domicilio: 1. **Weisbaden - ALEMANIA y** 2. **Abbottt Park, Illinois - ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**
Lugar de Constitución: **ALEMANIA y ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**
Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] NIT [ ]
C.E. [ ] Otro [ ]
Cual _____
Número _____

(3) **REPRESENTANTE O APODERADO**

Nombre: **MARGARITA CASTELLANOS A.**
Dirección: **CALLE 94A No. 7A-09**
Teléfono: **610 7420** Fax: **610 0706**
E-mail: info@castellanosyco.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [X] NIT [ ]
C.E. [ ] Otro [ ] Cual _____
Número **39'779.654** TPA **70.819**

(4) **INVENTOR (ES) (72)**

VER ANEXO # 1

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. **PCT/EP2009/001437** Fecha **27/02/2009**
Publicación Internacional No. **WO 2009/106356 A1** Fecha **03/09/2009**

(6) **Título (54)** **ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROTEINA RGM A Y SUS USOS**

(7) **Clasificación Internacional (51)** **C07K 16/22, A61K 39/395**

(8) **Prioridad** SI [X] NO [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	29/02/2008	61/032,707
US	21/08/2008	61/090,743

(9) **Comprobantes de pago Nos.** **10-78,895 y 10-78,898** **Fecha** **Septiembre 22 de 2010**

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

(10) Anexos

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [X] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [X] Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [X] Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [X] Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12x12
- [ ] De ser el caso, *información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo* titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [X] Otros: **Tarjeta Propietario, Extracto para la publicación**

(11) FIGURA CARACTERISTICA:

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

FIRMA:

C.C. No. 39'779.654 Usaquén - TPA 70.819 C.S.J.

23 SET. 2010

***Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.* - MCA/gcb - P2031**

CASTELLANOS & CO LTDA
ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. – COLOMBIA

ANEXO # 1
INVENTORES

1. **BERNHARD K. MÜLLER**
   Altbachstr. 10 A
   67435 Neustadt/Weinstrasse
   ALEMANIA

2. **MARTIN SCHMIDT**
   Mittelstrasse 49 b
   64625 Bensheim
   ALEMANIA

3. **EVE H. BARLOW**
   4 Jefferson Road
   Wellesley 02481
   ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

4. **MARY R. LEDDY**
   72 Peters Way
   North Attleborough 02760
   ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

5. **CHUNGMING HSIEH**
   22 Olde Field Road
   Newton 02459-2733
   ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

6. **PHILLIP D. BARDWELL**
   258 Shawmut Ave
   Boston 02118
   ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

000004

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 78,895
FECHA : SEPTIEMBRE 22 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-117825- -00000-0000

Fecha: 2010-09-23 13:26:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 268

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	383910026	22/09/2010	12,087,200.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL : $	554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

000005

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 78,898
FECHA : SEPTIEMBRE 22 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-117825- -00000-0000
Fecha: 2010-09-23 13:26:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 268

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	383910026	22/09/2010	12,087,200.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
81	50005-01-01 SOLICITUDES	*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL	2,106,000.00
		TOTAL : $	2,106,000.00

SON: DOS MILLONES CIENTO SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

000006 21667

COLOMBIA

PODER

El (los)

ABBOTT LABORATORIES

Domiciliados en

100 Abbott Park Road
Abbott Park
Illinois 60064
E.U.A.

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso –administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
b) Para la obtención de registros sanitarios;
c) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy 19 de Noviembre de 2008

en Abbott Park, Illinois,
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

por ABBOTT LABORATORIES
(firma ilegible) Paul D. Yasger

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)

(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned

ABBOTT LABORATORIES

Of

100 Abbott Park Road
Abbott Park
Illinois 60064
USA

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS a.** attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá- Colombia, to

and to obtain the protection of my (our Industrial Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

a) Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
b) For the obtainment of Sanitary registrations;
c) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters ~~they~~ may substitute this power of attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact, in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this 19 day of November, 2008

in Abbott Park, Illinois, USA 60064

by Paul D. Yasger, Assistant Secretary, DVP, Associate General Counsel
(Notary shall execute on the other side)

(Consular legalization or apostille is required)

CASTELLANOS & CO
ABOGADOS COLOMBIA
Calle 94A No. 7A-09- P.O.Box 6349 - Bogotá, Colombia
Tels.: (571) 610 74 20 / - Fax (571) 610 07 06 - e-mail info@castellanosyco.com

* Abbott at its sole discretion

Como Notario Veintiséis del Circulo de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con original que se ha presentado
Bogotá D.C. - Colombia.
21 SET 2010
GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

COLOMBIA

CERTIFICADO NOTARIAL (Sociedad)

Hoy 19de Nov. del año 2008
compareció (eron) personalmente
Paul D. Yasger

a quienes conozco como la(s) personas que firma(n) en representación de la Sociedad (Compañía) denominada **ABBOTT LABORATORIES**

Certifico :

a) Que **ABBOTT LABORATORIES**

es una sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Estados Unidos de América

b) Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es

100 Abbott Park Road
Abbott Park
Illinois 60064
EUA

c) Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad /Compañía.

d) Que el Sr. Paul D. Yasger

esta autorizado para otorgar el presente poder. Lo anterior esta probado por medio de los siguientes documentos, que certifico he visto*

(Ciudad) Abbott Park

(Estado) Illinois

Hoy 19del Noviembre de 2008

(Notario Público)

*Los documentos debe identificarse con fecha y origen.

NOTARIAL CERTIFICATION (Corporation)

On this 19 day of November of 2008
personally appeared Paul D. Yasger,
whom I know to be the person(s) who signed this document as representative(s) of the Corporation /Company named
ABBOTT LABORATORIES

I certify:

a) That **ABBOTT LABORATORIES**

is a corporation (Company legally constituted and in existence in accordance with the laws of United States of America

b) That the domicile of said Corporation/Company is

100 Abbott Park Road
Abbott Park
Illinois 60064
USA

c) That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the object set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

d) That Mr. Paul D. Yasger

is (are) authorized to grant the present Power of Attorney. The aforementioned was duly proven through the following documents and I duly certify having seen them*:Appointment of Corporate Officer dated March 6, 2008 and signed by Mile D. White, Chairman of the Board and Chief Executive Office of Abbott Laboratories

(City) Abbott Park

(State) Illinois

this 19th day of November of the year 2008

(Notary Public)

*Documents must be identified with date and origin

OFFICIAL SEAL
LINDA S LUTZ
NOTARY PUBLIC - STATE OF ILLINOIS
MY COMMISSION EXPIRES:07/23/11

CASTELLANOS & CO
ABOGADOS COLOMBIA
Calle 94A No. 7A-09- P.O.Box 6349 - Bogotá, Colombia
Tels.: (571) 610 74 20 / - Fax (571) 610 07 06 - e-mail info@castellanosyco.com

Como Notario Veintiséis del Circulo de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con original que se ha presentado
Bogotá D.C. Colombia.

21 SET 2010

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

000008

STATE OF ILLINOIS

SECRETARY OF STATE

SPRINGFIELD, ILLINOIS

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

   This public document

2. has been signed by LINDA S LUTZ

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC, MCHENRY COUNTY

4. bears the seal/stamp of STATE OF ILLINOIS

Certified

5. Springfield, Illinois

6. NOVEMBER 26, 2008

7. by the Secretary of State, State of Illinois

8. No. S08DL14032

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Jesse White

JESSE WHITE
SECRETARY OF STATE
STATE OF ILLINOIS

Como Notario Veintiséis del Circulo de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con original que se he presentado Bogotá D.C. - Colombia.

21 SET 2010

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

Printed on recycled paper. Printed by authority of the State of Illinois. May 2008 — 50M — I 168.2

----------TRADUCCION OFICIAL No. 081205----------

de un documento escrito en INGLES, el cual para su identificación lleva el sello de la Traductora e Intérprete Oficial, Res. 2755/68 y 01144/97 de Minjusticia, al igual que la presente.----------

(Adjunto a un documento de PODER de Abbott Laboratories)

(fdo) ilegible

Notario Público

SELLO OFICIAL

Notario Público – Estado de Illinois

LINDA S. LUTZ

Mi comisión vence 07/23/11

ESTADO DE ILLINOIS

Secretario de Estado

Springfield, Illinois

APOSTILLA

(Convención de La Haya de 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por LINDA S. LUTZ
3. actuando en su calidad de Notario Público, Condado de McHenry
4. lleva el sello del Estado de Illinois

Como Notario Veintiséis del Circulo de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con original que se he presentado Bogotá D.C. Colombia.

21 SET 2010

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

CERTIFICADO

5. en Springfield, Illinois
6. El día 26 de Noviembre de 2008
7. Por el Secretario de Estado, Estado de Illinois
8. No. S08DL14032
9. Sello
10. Firma: (fdo) Jesse White

JESSE WHITE

Secretario de Estado

Estado de Illinois (Sello en oblea dorada)

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, a la cual me remito,

Bogotá, D. C., Diciembre 17, 2008

Como Notario Veintiséis del Círculo de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con original que se ha presentado
Bogotá D.C. Colombia.
21 SET 2010
GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

EN BLANCO
NOTARIA VEINTISEIS

EN BLANCO
NOTARIA VEINTISEIS

EN BLANCO
NOTARIA VEINTISEIS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2009 DIC 17 P 12:14

DIRECCION DE
ASUNTOS CONSULARES

854400

Doc Pegue

1/4

1264950

Como Notario Veintiséis del Circulo de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con original que se ha presentado Bogotá D.C., Colombia.

21 SET 2010

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
3 September 2009 (03.09.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/106356 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/22 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2009/001437

(22) International Filing Date:
27 February 2009 (27.02.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/032,707 29 February 2008 (29.02.2008) US
61/090,743 21 August 2008 (21.08.2008) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **ABBOTT GMBH & CO. KG** [DE/DE]; Max-Planck-Ring 2, 65205 Wiesbaden (DE). **ABBOTT LABORATORIES** [US/US]; 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064-6050 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **MÜLLER, Bernhard, K.** [DE/DE]; Altbachstr. 10 A, 67435 Neustadt/Weinstrasse (DE). **SCHMIDT, Martin** [DE/DE]; Mittelstrasse 49 b, 64625 Bensheim (DE). **BARLOW, Eve, H.** [US/US]; 4 Jefferson Road, Wellesley 02481 (US). **LEDDY, Mary, R.** [US/US]; 72 Peters Way, North Attleborough 02760 (US). **HSIEH, Chungming** [US/US]; 22 Olde Field Road, Newton 02459-2733 (US). **BARDWELL, Phillip, D.** [US/US]; 258 Shawmut Ave, Boston 02118 (US).

(74) Agent: **SCHWEIGER, Georg**; Reitstötter, Kinzebach & Partner (GbR), Sternwartstrasse 4, 81679 München (DE).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

WO 2009/106356 A1

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST THE RGM A PROTEIN AND USES THEREOF

(57) Abstract: The subject invention relates to isolated proteins, particularly monoclonal antibodies, which bind and neutralize RGM A protein. Specifically, these antibodies have the ability to inhibit the binding of RGM A to its receptor and/or coreceptors. These antibodies or portions thereof of the invention are useful for detecting RGM A and for inhibiting RGM A activity, for example in a human suffering from a disorder including but not limited to multiple sclerosis, mammalian brain trauma, spinal cord injury, stroke, neurodegenerative diseases, and schizophrenia.

MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST THE RGM A PROTEIN AND USES THEREOF

TECHNICAL FIELD

The present application describes RGM A-binding proteins, particularly monoclonal antibodies, and in particular CDR grafted, humanized versions thereof, which have the ability to bind to RGM A and prevent binding of RGM proteins to RGM A receptor and other RGM A binding proteins, and therefore neutralize the function of RGM A. These antibodies may have utility in the treatment of several states including but not limited to multiple sclerosis, mammalian brain trauma, spinal cord injury, stroke, neurodegenerative diseases, and schizophrenia.

BACKGROUND INFORMATION

Axonal regeneration after injury or after inflammatory attacks or after neurodegenerative diseases within the mammalian central nervous system (CNS) is almost always impossible; the outcome depends on the balance between the intrinsic ability of the nerve fibers in the CNS to re-grow, and the inhibitory factors within the CNS, localized in the microenvironment of the lesion or damage site, which actively prevent the re-growth, and thus the regeneration of the injured fiber tracts.

It has been established that CNS myelin, generated by oligodendrocytes, and the lesional scar are the most relevant non-permissive structures for axonal growth in the early phase of an injury, by causing growth cone collapse and neurite growth inhibition in vitro as well as in vivo, thereby resulting in direct inhibition of axon regrowth. RGM proteins, major inhibitory factors on CNS myelin and scar tissue have been identified (Monnier et al.,Nature 419: 392 – 395, 2002; Schwab et al., Arch. Neurol.62: 1561-8, 2005a; Schwab et al. Eur. J. Neurosci. 21:1569-76, 2005 b; Hata et al. J. Cell Biol.173:47-58, 2006; for reviews see: Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006; Yamashita et al. Curr. Opin. Neurobiol. 17: 29-34, 2007). RGM proteins are up-regulated at damage or lesion sites in humans dying from brain trauma or ischemic insult, (Schwab et al., Arch. Neurol. 62: 1561-8, 2005a) and are up-regulated at lesion sites in rats with spinal cord injury (Schwab et al. Eur. J. Neurosci. 21:1569-76, 2005 b; Hata et al. J. Cell Biol.173:47-58, 2006 for review see: Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361:

1513-29, 2006; Yamashita et al. Curr. Opin. Neurobiol. 17: 29-34, 2007). In addition first data using clinical samples from Multiple sclerosis patients and healthy persons suggested that human RGM A is up-regulated in cerebrospinal fluid of patients suffering from MS (data not shown).

To evaluate the regeneration-promoting potential of a RGM A–specific polyclonal antibody, the antibodies were administered in a moderate-to-severe model of spinal cord injury, where approximately 60% of the spinal cord at thoracal level 9/10 was transected. The histological examination revealed that such a lesion severed all dorsal and lateral fibers of the corticospinal tract. The RGM A – specific polyclonal antibody given locally via pump for two weeks induced long-distance regeneration of injured nerve fibers (Hata et al., J. Cell Biol. 173:47-58, 2006).

Hundreds of nerve fibers extended past the lesion site and the longest fibers regenerated for more than 10 mm beyond the lesion, whereas no regenerating fibers were found distal to the lesion in control antibody-treated animals. The functional recovery of the anti-RGM A treated rats was significantly improved in comparison with control-antibody treated, spinally injured rats, thereby proving that RGM A is a potent neuroregeneration inhibitor and a valuable target for stimulating recovery in indications characterized by axon damage or nerve fiber injury (Hata et al., J. Cell Biol. 173:47-58, 2006; Kyoto et al. Brain Res. 1186: 74-86, 2007). In addition neutralising the RGM A protein with a function-blocking polyclonal antibody stimulated not only regrowth of damaged nerve fibers in the spinally injured rats but enhanced their synapse formation thereby enabling the reformation or restoration damaged neuronal circuits (Kyoto et al. Brain Res. 1186: 74-86, 2007).

The *rgm* gene family encompasses three different genes, two of them, *rgm a* and *b*, are expressed in the mammalian CNS originating RGM A and RGM B proteins, whereas the third member, *rgm c*, is expressed in the periphery (Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006), where RGM C plays an important role in iron metabolism. *In vitro*, RGM A inhibits neurite outgrowth by binding to Neogenin, which has been identified as an RGM receptor (Rajagopalan et al. Nat Cell Biol.: 6(8), 756-62, 2004). Neogenin had first been described as a netrin-binding protein (Keino-Masu et al. Cell, 87(2):175-85, 1996). This is an important finding because binding of Netrin-1 to Neogenin or to its closely related receptor DCC (deleted in colorectal cancer) has been reported to stimulate rather

than to inhibit neurite growth (Braisted et al. J. Neurosci. 20: 5792-801, 2000). Blocking RGM A therefore releases the RGM-mediated growth inhibition by enabling Neogenin to bind its neurite growth-stimulating ligand Netrin. Based on these observations, neutralizing RGM A can be assumed to be superior to neutralizing neogenin in models of human spinal cord injury. Besides binding of RGM A to Neogenin and inducing neurite growth inhibition, the binding of RGM A or B to the bone morphogenetic proteins BMP-2 and BMP-4 could represent another obstacle to successful neuroregeneration and functional recovery (Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006).

There is a need in the art for improved antibodies capable of binding RGM A, preferably a monoclonal antibody that blocks RGM A and prevents the interaction between RGM A and its receptor and/or binding proteins, i.e. Neogenin and BMP-2, BMP-4.

The present application provides (a) the generation of a neutralizing monoclonal antibody against RGM A, which selectively inhibits binding of RGM A to its receptor Neogenin and to bone morphogenetic proteins 2 and 4 (BMP-2, BMP-4), and (b) the generation of a neutralizing monoclonal antibody against RGM A, which selectively inhibits binding of RGM A to bone morphogenetic proteins 2 and 4 (BMP-2, BMP-4). The neutralizing monoclonal antibodies of the present invention are expected to stimulate regrowth of injured or damaged nerve fibers and formation of functional synapses of regenerating nerve fibers since one of the neutralizing monoclonal antibodies of the present invention appears to transform the inhibitory nature of RGM A in a condition in which neuronal cells prefer to migrate and grow on an RGM A substrate, and not on a permissive substrate like Collagen I. In addition this antibody is able to induce long-distance regeneration in an in vivo rat model of optic nerve injury and it also enhances remyelination of lesioned and regenerating nerve fibers.

Accordingly, the neutralizing monoclonal antibodies of the present invention are expected to promote neuronal regeneration and regrowth of damaged or broken neuronal connections in the injured and inflamed human CNS, for example in multiple sclerosis, after acute spinal cord injury, brain trauma, or in neurodegenerative diseases such as for example, Huntington's chorea, Parkinson's disease, Alzheimer's disease.

SUMMARY OF THE INVENTION

According to one aspect the present invention provides a binding protein that dissociates from human RGM A (hRGM A) with a K_D of 1 x 10^{-7} M or less and a k_{off} rate constant of 1 x 10^{-2} s^{-1} or less, both determined by surface plasmon resonance.

According to another aspect the invention relates to a binding protein, as for example a binding protein showing the above kinetic features, that binds to human RGM A and neutralizes the neurite outgrowth inhibitory activity of human RGM A as determined in a standard in vitro assay, as for example the Ntera neuronal outgrowth assay as exemplified in Example 3, below.

The invention also relates to binding protein as defined above, having at least one of the following additional functional characteristics:

binding to rat RGM A,

binding to human RGM C, and

binding to rat RGM C.

In particular, the binding protein as described herein modulates the ability of RGM to bind to at least one of its receptors.

Such binding protein, in particular, binds to a receptor binding domain of human RGM A. For RGM A a N- and a C-terminal receptor binding domains have been identified. Particular embodiments of the binding proteins of the invention bind to the N-terminal receptor binding domain of RGM A, as illustrated by the inhibition of binding between an N-terminal hRGM A fragment, as for example 47-168 and receptor molecules, like Neogenin and BMP-4. Said N-terminal hRGM A fragment may have a total length of about 30 to about 150 or about 30 to about 122 amino acid residues. As a non-limiting example Fragment 0 (corresponding to the N-terminal residues 47-168) of hRGM A as described herein or any shorter receptor binding fragment may be mentioned.

In particular said binding protein modulates, preferably inhibits, at least one of the following interactions:

binding of human RGM A to human BMP-4.

binding of hRGM A to human Neogenin,

binding of hRGM C to human Neogenin,

binding of human RGM A to human BMP-2.

According to a particular embodiment, the binding protein as herein defined is a humanized antibody.

The binding protein as described above may have an antigen binding domain, said binding protein capable of binding an epitope of an RGM molecule, said antigen binding domain comprising at least one CDR comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of

GTTPDY	(SEQ ID NO: 59),
FQATHDPLT	(SEQ ID NO: 62),
ARRNEYYGSSFFDY	(SEQ ID NO: 65),
LQGYIPPRT	(SEQ ID NO: 68), and

modified CDR amino acid sequences having a sequence identity of at least 50% to one of said sequences. In another embodiment the present invention relates to a binding protein, comprising an antigen binding domain, said binding protein being capable of binding an epitope of an RGM molecule, said antigen binding domain comprising at least one CDR comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

GTTPDY	(SEQ ID NO: 59),
FQATHDPLT	(SEQ ID NO: 62),
ARRNEYYGSSFFDY	(SEQ ID NO: 65),
LQGYIPPRT	(SEQ ID NO: 68), and

modified CDR amino acid sequences having a sequence identity of at least 50%, as for example at least 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 % identity to one of said sequences.

For example, said binding protein may comprise two of said CDRs, as for example SEQ ID NO: 59 and 62; or SEQ ID NO: 65 and 68; wherein at least one of said CDRs may be modified, having a sequence identity of at least 50%, as for example at least 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 % identity to one of said sequences.

Said binding protein may further comprise at least one CDR comprise an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 57, 58, 60, 61, 63, 64, 66, 67 and modified CDR amino acid sequences having a sequence identity of at least 50%, as for example at least 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 % identity, to one of said sequences.

In another embodiment, a binding protein is provided, wherein said at least one CDR comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of:

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

In a particular embodiment, said binding protein comprises at least 3 CDRs which are selected from a variable domain CDR set consisting of:

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

or a variable domain set wherein at least one of said 3 CDRs is a modified CDR amino acid sequence having a sequence identity of at least 50%, as for example at least 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 % identity, to the parent sequence.

In particular, each of said above mentioned modifications may be generated by single or multiple amino acid addition, deletion, or, in particular, substitution, or combinations thereof.

In another embodiment, the binding protein comprises at least two variable domain CDR sets.

In particular, said at least two variable domain CDR sets are selected from a group consisting of:

VH 5F9 set& VL 5F9 set; and

VH 8D1 set & VL 8D1 set

The binding protein according to the invention further comprising a human acceptor framework.

Said human acceptor framework may comprise at least one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 and 33.

The binding protein of the invention may, in particular, comprise at least one set of framework sequences selected from the group consisting of the sets:

(1) VH3-48 set (Seq ID NO: 15, 16 and 17)

VH3-33 set (SEQ ID NO: 21, 22 and 23)

VH3-23 set (SEQ ID NO: 24, 25 and 26)

each of which sets being combined with a further framework sequence, selected from

JH3 (SEQ ID NO:18),

JH4 (SEQ ID NO:19),

JH6 (SEQ ID NO:20);

or

(2) selected from the group consisting of the sets

A18 set: (SEQ ID NO: 27, 28 and 29)

A17 set: (SEQ ID NO: 31, 32 and 33)

each of which sets being combined with a further framework sequence, selected from JK2 (SEQ ID NO:2)

According to particular embodiments, the binding protein of any one of the preceding claims comprising at least one CDR- grafted heavy chain variable domain

selected from SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, and 43; and/or at least one CDR-grafted light chain variable domain selected from SEQ ID NO: 44, 45, and 46.

More particular, the binding protein of the invention comprises a combination of two variable domains, wherein said two variable domains have amino acid sequences selected from :

SEQ ID NOs: 35 & 44 ; 36 & 44 ; 37 & 44 ; 38 & 44 ; 39 & 44 ; 40 & 44 ; 41 & 44 ; 42 & 44 ; 43 & 44 ;

SEQ ID NOs: 35 & 45 ; 36 & 45 ; 37 & 45 ; 38 & 45 ; 39 & 45 ; 40 & 45 ; 41 & 45 ; 42 & 45 ; 43 & 45 ;

SEQ ID NOs: 35 & 46 ; 36 & 46 ; 37 & 46 ; 38 & 46 ; 39 & 46 ; 40 & 46 ; 41 & 46 ; 42 & 46 ; 43 & 46 ;

In another embodiment of the invention, said human acceptor framework of the binding protein comprises at least one framework region amino acid substitution at a key residue, said key residue selected from the group consisting of:

a residue adjacent to a CDR;

a glycosylation site residue;

a rare residue;

a residue capable of interacting with a RGM epitope;

a residue capable of interacting with a CDR;

a canonical residue;

a contact residue between heavy chain variable region and light chain variable region;

a residue within a Vernier zone;

an N-terminal residue capable of paraglutamate formation and

a residue in a region that overlaps between a Chothia-defined variable heavy chain CDR1 and a Kabat-defined first heavy chain framework.

In particular, said key residues are selected from the group consisting

(heavy chain sequence position): 1, 5, 37, 48, 49, 88, 98

(light chain sequence position): 2, 4, 41, 51

In a particular embodiment, the binding protein of the invention is or comprises a consensus human variable domain.

According to another embodiment of the binding protein of the invention, said human acceptor framework comprises at least one framework region amino acid substitution, wherein the amino acid sequence of the framework is at least 65%, as for example at least 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, or 99 %, identical to the sequence of said human acceptor framework and comprises at least 70 amino acid residues, as for example at least 75, 80, or 85 residues, identical to said human acceptor framework.

According to particular embodiment, the binding protein of the invention comprises at least one framework mutated variable domain having an amino acid sequence selected from the group consisting of:

SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50; (VH domain), and /or

selected from the group consisting of:

SEQ ID NO: 51, 52, 53, and 54 (VL domain)

In particular, said binding protein comprises two optionally framework mutated variable domains, wherein said two variable domains have amino acid sequences selected from the groups consisting of:

SEQ ID NOs: 47 & 44 ; 47 & 45 ; 47 & 46 ; 47 & 51 ; 47 & 52 ; 47 & 53 ; 47 & 54 ;
SEQ ID NOs: 48 & 44 ; 48 & 45 ; 48 & 46 ; 48 & 51 ; 48 & 52 ; 48 & 53 ; 48 & 54 ;
SEQ ID NOs: 49 & 44 ; 49 & 45 ; 49 & 46 ; 49 & 51 ; 49 & 52 ; 49 & 53 ; 49 & 54 ;
SEQ ID NOs: 50 & 44 ; 50 & 45 ; 50 & 46 ; 50 & 51 ; 50 & 52 ; 50 & 53 ; 50 & 54 ;

The binding proteins of the invention as described herein are capable of binding at least one target, selected from RGM molecules.

In particular, they are capable of binding to human RGM A, and optionally at least one further RGM molecule of human origin or originating from cynomolgus monkeys, rat, chick, frog, and fish.

For example they may additionally bind to rat RGM A, human RGM C, and /or rat RGM C.

In particular, the binding protein of the invention is capable of modulating, in particular, capable of neutralizing or inhibiting a biological function of a target, selected from RGM molecules as defined above.

In particular, the binding protein of the invention modulates, in particular inhibits, the ability of RGM to bind to at least one of its receptors, as for example Neogenin, and BMP, like BMP-2 and BMP-4.

For example said binding protein modulates , in particular diminishes and preferably inhibits at least one of the following interactions:

binding of human RGM A to human BMP-4.

binding of hRGM A to human Neogenin,

binding of hRGM C to human Neogenin,

binding of human RGM A to human BMP-2.

Binding proteins with different combinations of functional features, and consequently showing different functional profiles, as disclosed herein, are also within the scope of the invention. Non-limiting examples of such profiles are listed below:

	Profiles																					
Feature	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**
Binding to human RGM A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Binding to rat RGM A	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		+
Binding to human RGM C	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Binding to rat RGM C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Inhibition of binding of hRGM A to human Neogenin	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inhibition of binding of hRGM C to human Neogenin	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Inhibition of binding of human RGM A to human BMP-2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inhibition of binding of human RGM A to human BMP-4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

For example, profile 1 is met by antibody 5F9 as provided by the present invention and its derivatives described herein.

For example, profile 2 is met by antibody 8D1 as provided by the present invention and its derivatives as disclosed herein.

In particular, a binding protein of the invention is capable of inhibiting at least one biological activity of RGM, in particular RGM A, wherein said RGM A is selected from human, cynomolgus monkeys, rat, chick, frog, and fish.

According to another embodiment the binding protein of the invention has one or more of the following kinetic features:

(a) an on rate constant (k_{on}) to said target selected from the group consisting of: at least about $10^2M^{-1}s^{-1}$; at least about $10^3M^{-1}s^{-1}$; at least about $10^4M^{-1}s^{-1}$; at least about $10^5M^{-1}s^{-1}$; at least about $10^6M^{-1}s^{-1}$, and at least about $10^7M^{-1}s^{-1}$, as measured by surface plasmon resonance;

(b) an off rate constant (k_{off}) to said target selected from the group consisting of: at most about $10^{-2}s^{-1}$, at most about $10^{-3}s^{-1}$; at most about $10^{-4}s^{-1}$; at most about $10^{-5}s^{-1}$; and at most about $10^{-6}s^{-1}$, as measured by surface plasmon resonance; or

(c) a dissociation constant (K_D) to said target selected from the group consisting of: at most about 10^{-7} M; at most about 10^{-8} M; at most about 10^{-9} M; at most about 10^{-10} M; at most about 10^{-11} M; at most about 10^{-12} M; and at most 10^{-13} M.

According to a further aspect, the present invention provides an antibody construct comprising a binding protein described above, said antibody construct further comprising a linker polypeptide or an immunoglobulin constant domain.

Said antibody construct or binding protein of the invention may be selected from the group consisting of: an immunoglobulin molecule, a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a CDR-grafted antibody, a humanized antibody, a Fab, a Fab', a F(ab')2, a Fv, a disulfide linked Fv, a scFv, a single domain antibody, a diabody, a multispecific antibody, a dual specific antibody, a dual variable domain immunoglobulin, and a bispecific antibody.

In an antibody construct according to the invention said binding protein comprises a heavy chain immunoglobulin constant domain selected from the group consisting of;

a human IgM constant domain,

a human IgG1 constant domain,
a human IgG2 constant domain,
a human IgG3 constant domain,
a human IgG4 constant domain,
a human IgE constant domain,
a human IgD constant domain,
a human IgA1 constant domain
a human IgA2 constant domain
a human IgY constant domain and and
corresponding mutated constant domains

In particular, an antibody construct according to the invention comprises an immunoglobulin constant domain having an amino acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO: 11, 12, 13 and 14

According to another aspect, the present invention provides an antibody conjugate comprising an antibody construct described herein, said antibody conjugate further comprising an agent selected from the group consisting of; an immunoadhesion molecule, an imaging agent, a therapeutic agent, and a cytotoxic agent, each of which agent being conjugated, of example covalently bound to said binding protein.

For example, said agent is an imaging agent selected from the group consisting of a radiolabel, an enzyme, a fluorescent label, a luminescent label, a bioluminescent label, a magnetic label, and biotin. In particular, said imaging agent is a radiolabel selected from the group consisting of: ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, and ^{153}Sm.

For example, said agent is a therapeutic or cytotoxic agent selected from the group consisting of; an anti-metabolite, an alkylating agent, an antibiotic, a growth factor, a cytokine, an anti-angiogenic agent, an anti-mitotic agent, an anthracycline, toxin, and an apoptotic agent.

According to another embodiment, said binding protein of the invention as described herein possesses a human glycosylation pattern.

Furthermore, the binding proteins, antibody constructs and antibody conjugate according to the invention may exist as a crystal (in crystalline form), preferably retaining biological activity.

In particular, said crystal is a carrier-free pharmaceutical controlled release crystal. In view of said crystalline form the binding protein, antibody construct or antibody conjugate may have a greater half life in vivo than the corresponding soluble counterpart

In another aspect of the present invention provides an isolated nucleic acid encoding a binding protein amino acid sequence, antibody construct amino acid sequence, and antibody conjugate amino acid sequence as described herein.

The invention also relates to a vector comprising an isolated nucleic acid as described herein. In particular, the vector is selected from the group consisting of pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, and pBJ.

The invention also relates to a host cell comprising such a vector. In particular, said host cell is a prokaryotic cell, as for example E.coli; or is a eukaryotic cell, and may be selected from the group consisting of protist cell, animal cell, plant cell and fungal cell. In particular, said eukaryotic cell is an animal cell selected from the group consisting of; a mammalian cell, an avian cell, and an insect cell. Preferably said host cell is selected from HEK cells, CHO cells, COS cells and yeast cells. The yeast cell may be *Saccharomyces cerevisiae* and said insect cell ay be a Sf9 cell.

The invention also provides a method of producing a protein capable of binding RGM, comprising culturing a host cell as defined herein in culture medium under conditions sufficient to produce a binding protein capable of binding RGM.

The invention also relates to a protein produced according to said method.

The invention also provides a composition for the release of a binding protein said composition comprising

(a) a formulation, wherein said formulation comprises a crystallized product protein as defined herein, and an ingredient; and

(b) at least one polymeric carrier.

Said polymeric carrier may be a polymer selected from one or more of the group consisting of: poly (acrylic acid), poly (cyanoacrylates), poly (amino acids), poly (anhydrides), poly (depsipeptide), poly (esters), poly (lactic acid), poly (lactic-co-glycolic acid) or PLGA, poly (b-hydroxybutryate), poly (caprolactone), poly (dioxanone); poly (ethylene glycol), poly ((hydroxypropyl) methacrylamide, poly [(organo) phosphazene], poly (ortho esters), poly (vinyl alcohol), poly (vinylpyrrolidone), maleic anhydride- alkyl vinyl ether copolymers, pluronic polyols,

albumin, alginate, cellulose and cellulose derivatives, collagen, fibrin, gelatin, hyaluronic acid, oligosaccharides, glycaminoglycans, sulfated polyeaccharides, blends and copolymers thereof.

Said ingredient may be selected from the group consisting of albumin, sucrose, trehalose, lactitol, gelatin, hydroxypropyl-ß- cyclodextrin, methoxypolyethylene glycol and polyethylene glycol.

According to another aspect the present invention provides a method for treating a mammal comprising the step of administering to the mammal an effective amount of the composition as defined herein.

According to another aspect the present invention provides a pharmaceutical composition comprising the product (in particular, a binding protein, construct or conjugate as scribed herein above), and a pharmaceutically acceptable carrier.

Said pharmaceutically acceptable carrier may function as adjuvant useful to increase the absorption, or dispersion of said binding protein.

For example said adjuvant is hyaluronidase.

According to another embodiment said pharmaceutical further comprises at least one additional therapeutic agent for treating a disorder in which RGM activity is detrimental. For example said agent is selected from the group consisting of: therapeutic agent, imaging agent, cytotoxic agent, angiogenesis inhibitors; kinase inhibitors; co-stimulation molecule blockers; adhesion molecule blockers; anti-cytokine antibody or functional fragment thereof; methotrexate; cyclosporin; rapamycin; FK506; detectable label or reporter; a TNF antagonist; an antirheumatic; a muscle relaxant, a narcotic, a non-steroid anti-inflammatory drug (NSAID), an analgesic, an anesthetic, a sedative, a local anesthetic, a neuromuscular blocker, an antimicrobial, an antipsoriatic, a corticosteriod, an anabolic steroid, an erythropoietin, an immunization, an immunoglobulin, an immunosuppressive, a growth hormone, a hormone replacement drug, a radiopharmaceutical, an antidepressant, an antipsychotic, a stimulant, an asthma medication, a beta agonist, an inhaled steroid, an epinephrine or analog, a cytokine, and a cytokine antagonist.

The present invention also relates to a method for reducing human RGM A activity comprising contacting human RGM A with at least one product (in particular, a binding protein, construct or conjugate as scribed herein above), such that at least one human RGM A activity is reduced.

The present invention also relates to a method for decreasing hRGM A binding to Neogenin receptor in a subject in need thereof, comprising the step of administering to the subject a product of the invention (in particular, a binding protein, construct or conjugate as scribed herein above).

The present invention also relates to a method for decreasing hRGM A binding to bone morphogenetic protein-2 and/or bone morphogenetic protein-4 (BMP-2 and BMP-4) in a subject in need thereof, comprising the step of administering to the subject a product of the invention (in particular, a binding protein, construct or conjugate as scribed herein above).

The present invention also relates to a method for treating a subject for a disorder associated with RGM A activity comprising the step of administering alone or in combination with other therapeutic agents a product of the invention (in particular, a binding protein, construct or conjugate as described herein above).

The present invention also relates to a method for reducing RGM A activity in a subject suffering from a disorder in which RGM A activity is detrimental, comprising administering to the subject a product of the invention (in particular, a binding protein, construct or conjugate as scribed herein above), alone or in combination with other therapeutic agents.

Said disorder preferably comprises neurological diseases selected from the group comprising Amyotrophic Lateral Sclerosis, Brachial Plexus Injury, Brain Injury, including traumatic brain injury, Cerebral Palsy, Guillain Barre, Leukodystrophies, Multiple Sclerosis, Post Polio, Spina Bifida, Spinal Cord Injury, Spinal Muscle Atrophy, Spinal Tumors, Stroke, Transverse Myelitis; dementia, senile dementia, mild cognitive impairment, Alzheimer-related dementia, Huntington's chorea, tardive dyskinesia, hyperkinesias, manias, Morbus Parkinson, steel-Richard syndrome, Down's syndrome, myasthenia gravis, nerve trauma, vascular amyloidosis, cerebral hemorrhage I with amyloidosis, brain inflammation, acute confusion disorder, amyotrophic lateral sclerosis, glaucoma and Alzheimer's disease.

Further particular aspects of the invention are described below:

An isolated binding protein that specifically interacts with at least one epitope of a hRGM A protein;

said isolated protein being a monoclonal neutralizing antibody or antigen binding fragment thereof;

said antigen binding fragment comprising a VH and a VL domain;

said neutralizing antibody diminishing the ability of hRGM A to bind to its receptor;

said neutralizing antibody being capable of inhibiting hRGM A biological activity;

said antibody recognizing a RGM A receptor selected from human, cynomolgus monkeys, rat, chick, frog, and fish;

said antibody recognizing a RGM A protein sharing 90% homology to the amino acid sequence SEQ ID NO:2;

said antibody wherein the RGM A protein is encoded by a nucleic acid that shares 90% homology to the nucleic acid sequence SEQ ID NO:1;

said antibody having at least 90% amino acid sequence identity with a sequence comprising a heavy chain variable region (VH region) comprising the sequence of SEQ ID NO:9 or 34 or a humanized, optionally further mutated version of said VH region;

said antibody having at least 90% amino acid sequence identity with a sequence comprising a light chain variable region (VL region) comprising the sequence of SEQ ID NO:10 or a humanized, optionally further mutated version of said VL region.said antibody that binds to hRGM A wherein the antibody is glycosylated;

said antibody or antigen-binding fragment, wherein said antibody or antigen-binding fragment is a mouse antibody, a humanized antibody, a fully human, a chimeric antibody, an antigen-binding fragment of a humanized antibody, or an antigen-binding fragment of a chimeric antibody;

said antibody or antigen-binding fragment, wherein said antibody or antigen-binding fragment is an antigen-binding fragment selected from the group consisting of a Fab fragment, a Fab' fragment, a $F(ab')_2$ fragment and a Fv fragment;

said monoclonal antibody that specifically binds to at least one epitope of hRGM A, wherein said monoclonal antibody is the monoclonal antibody secreted by hybridoma cell line as described herein;

said monoclonal antibody, wherein the binding results in inactivation of the interaction of hRGM A with its receptor;

said hybridoma cell line that produces a monoclonal antibody, which specifically binds to at least one epitope of hRGM A;

said hybridoma cell line, wherein the hybridoma is selected from the group consisting of human, mouse, rat, sheep, pig, cattle, goat, and horse hybridoma;

said monoclonal antibody, wherein the binding results in inactivation of hRGM A;

said hybridoma cell line that produces a monoclonal antibody, which specifically binds to at least one epitope of hRGM A;

said hybridoma cell line, wherein the hybridoma is selected from the group consisting of human, mouse, rat, sheep, pig, cattle, goat, and horse hybridoma;

said monoclonal neutralizing antibody or antigen-binding fragment thereof, having at least one characteristic selected from the group consisting of:

a) binding to mammalian RGM A with affinity in the nM range or less;

b) functionally antagonizing *in vitro* RGM A activity in neurite outgrowth assay with µM, nM or less efficacy;

c) *in vivo* inducing sprouting in the optic nerve crush model;

d) *in vivo* inducing sprouting in a spinal cord injury model;

e) relieving *in vivo* experimental spinal cord injury by enhancing regenerative growth of injured nerve fibers; or

f) relieving *in vivo* experimental spinal cord injury by promoting synapse formation;

an isolated nucleic acid encoding said monoclonal neutralizing antibody or antigen-binding fragment;

a vector comprising said isolated nucleic acid;

said vector selected from the group consisting of pcDNA; pTT; pTT3; pEFBOS; pBV; pJV; pHybE and pBJ;

a host cell transformed with said vector according wherein the host cell is selected form the group consisting of protist cell, animal cell, plant cell and fungal cell;

said host cell, wherein the animal cell is a mammalian cell selected form the group comprising HEK293, CHO and COS;

A host cell transformed with the vector according to claim 24, wherein the host cell is a eukaryotic cell;

a method of producing the binding protein according that binds hRGM A, comprising culturing a host cell in a culture medium under conditions sufficient to produce a binding protein that binds hRGM A;

a pharmaceutical composition comprising said monoclonal antibody or antigen-binding portion and a pharmaceutically acceptable carrier;

a method for decreasing hRGM A binding to Neogenin receptor in a subject in need thereof, comprising the step of administering to the subject said antibody;

a method for decreasing hRGM A binding to bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 (BMP-2 and BMP-4) in a subject in need thereof, comprising the step of administering to the subject sad antibody;

a method of treating a subject for a disorder associated with RGM A activity comprising the step of administering alone or in combination with other therapeutic agents said antibody;

a method for reducing RGM A activity in a subject suffering from a disorder in which RGM A activity is detrimental, comprising administering to the subject said antibody alone or in combination with other therapeutic agents;

said antibody, comprising at least one VH region comprising an amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 and 43;

said antibody, comprising at least one VL region comprising an amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 44, 45 and 46;

said antibody, additionally modified by 1 to 5 mutations in an VH or VL sequence;

said antibody, wherein the mutations are selected from framework back mutations and mutations of Vernier and VH/VL interfacing residues;

Any teaching or reference to SEQ ID NO: 34 as disclosed herein in analogy applies to SEQ ID NO:9.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1A shows the monoclonal antibodies binding to hRGM A in ELISA assay.

Figure 1B depict the monoclonal antibodies binding to hRGM A expressed in HEK 293 cells.

Figure 1C depict the monoclonal antibodies binding to rat RGM A expressed in HEK 293 cells.

Figure 2 shows the full length RGM A binding to Neogenin. MAB 5F9 inhibits binding of full length, fc-coupled hRGM A to Neogenin .

Figure 3 depicts the full length RGM A binding to BMP-4. MAB 5F9 inhibits binding of fc-coupled full length hRGM A fragment (47- 422) to BMP-4.

Figure 4 depicts RGM A fragment 0 binding to BMP-4. MAB 5F9 inhibits binding of fc-coupled hRGM A fragment 0 (47-168) to BMP-4.

Figure 5 shows full length RGM A binding to BMP-2. MAB 5F9 inhibits binding of fc-coupled full length hRGM A fragment (47- 422) to BMP-2.

Figure 6 is a combination of microphotographs showing mAb5F9 neutralization of RGM A fragment in NTera cell neurite outgrowth assay. MAB 5F9 neutralizes the outgrowth inhibitory activity of an fc-conjugated, potent hRGM A inhibitor fragment in neurite growth assays with human Ntera aggregates. A. Control culture, growth of Ntera neurons on laminin, B. on a laminin-hRGM A fragment (47 – 168) substrate, C. - E. on a laminin-hRGM A fragment (47 – 168) substrate in the presence of 0.1 µg/ml MAB 5F9 (C.), 1 µg/ml MAB 5F9 (D.), 10 µg/ml MAB 5F9 (E.).

Figure 7 shows the quantitative analysis of NTera 2 assay results. MAB 5F9 neutralizes dose-dependently the outgrowth inhibitory activity of an fc-conjugated, potent hRGM A inhibitor fragment (fragment 0, 47 – 168) in neurite growth assays with human Ntera aggregates.

Figure 8 shows the quantitative analysis of SH-SY5Y stripe assay. MAB 5F9 neutralizes repulsion, induced by stripes consisting of full length human RGM A of human SH-SY5Y neuronal cells in stripe membrane carpets. In the absence of MAB 5F9 (A) or in the presence of low MAB concentrations SH-SY5Y neurons prefer to avoid the RGM A stripes. This behaviour is reversed by increasing concentrations of the MAB 5F9. (B to D) At the highest MAB concentration (10 µg/ml) (E) , SH-SY5Y

neurons show a strong preference for the RGM A stripes in comparison with the Collagen I stripes.

Figure 9 summarizes the quantitative analysis of mABs 5F9 and 8D1 binding characteristics. MABs 5F9 and 8D1are evaluated in hRGM A – neogenin, hRGM A – BMP-2 and hRGM A – BMP-4 binding assays at different concentrations.

Figure 10 shows neutralizing activity for hRGM A's chemorepulsive activity of humanized 5F9 antibodies (h5F9.21, h5F9.23, h5F9.25) in an SH-SY5Y chemotaxis assay.

Figure 11 shows the in vivo neuroregenerative activity of local 5F9 application in an animal model of optic nerve injury. Local application of MAB 5F9 neutralizes RGM A and stimulates regenerative growth of damaged optic nerve axons in a rat animal model of optic nerve crush. In the 5F9 treated animals (A), many GAP-43 positive fibers are extending beyond the crush site in contrast to the control MAB 8D1 (B), which does not bind to rat RGM A.

Figures 12 A and **Figures 12 B** show the quantitative analysis of local 5F9 application in an animal model of optic nerve injury. (A) 5F9 but not the control MAB 8D1 significantly increased the number of regenerating GAP-43 positive fibers. Significantly more fibers ($p < 0.05$) were observed in animals treated with 5F9 at distances 200 µm, 400 µm and 600 µm and at 1200 µm fibers are only found in 5F9-treated animals but not in control animals (B) 5F9 significantly increased the GAP-43 positive area at the optic nerve lesion site in comparison with the control antibody 8D1 and the vehicle control PBS. The area of regenerative growth (GAP-43 positive area) was measured using the Axiovision software (Zeiss).

Figure 13 shows the in vivo neuroregenerative activity of systemic 5F9 application in an animal model of optic nerve injury. Animals were treated with 5F9 at day 0 and day 21 with 2 mg/kg and 10 mg/kg, respectively. Antibody or vehicle were given intraperitoneally or intravenously. Composite images of rat optic nerves. In the 5F9 treated animals (A), many GAP-43 positive fibers are extending beyond the crush site in contrast to control animals treated with PBS (B). The crush site is located at the left margin and regenerating fibers are stained with an antibody to GAP-43. Many fibers are observed at the upper and lower rim of the optic nerve in 5F9-treated animals but not in PBS animals.

Figure 14 A and **Figure 14 B** shows the quantitative analysis of systemic 5F9 application in an animal model of optic nerve injury.

Figure 15 shows the in vivo remyelinating activity of systemic 5F9 application in an animal model of optic nerve injury. Animals were treated with 5F9 at day 0 and d21 with 2 mg/kg and 10 mg/kg, respectively. Antibody or vehicle were given intraperitoneally or intravenously. Composite images of rat optic nerves. Myelination is visualized using an antibody directed against the myelin marker myelin basic protein MBP. Crush sites ate located in the middle of the composite nerves and the area is free in vehicle treated control animals (A and B). In the 5F9 treated animals (C and D), many MBP-positive structures are observed in the middle area (crush center) of the optic nerves.

Figure 16 shows the quantitative effect on remyelination of systemic 5F9 application in an animal model of optic nerve injury.

DETAILED DESCRIPTION

This invention describes RGM A binding proteins, more specifically monoclonal RGM A antibodies, especially humanized monoclonal RGM A antibodies, or antigen-binding portions thereof, that bind RGM A. Various aspects of this application relate to antibodies and antibody fragments, and pharmaceutical compositions thereof, as well as nucleic acids, recombinant expression vectors and host cells for making such antibodies and fragments. Methods of using the antibodies of this application to detect human RGM A; to neutralize human RGM and/or human RGM A activity, either *in vivo* or *in vitro*, and to regulate gene expression are also encompassed by the invention.

1. General definitions

Unless otherwise defined herein, scientific and technical terms used in connection with the present invention shall have the meanings that are commonly understood by those of ordinary skill in the art. The meaning and scope of the terms should be clear, however, in the event of any latent ambiguity, definitions provided herein take precedent over any dictionary or extrinsic definition. Further, unless otherwise required by context, singular terms shall include pluralities and plural terms shall include the singular. In this application, the use of "or" means "and/or" unless stated otherwise. Furthermore, the use of the term "including", as well as

other forms, such as "includes" and "included", is not limiting. Also, terms such as "element" or "component" encompass both elements and components comprising one unit and elements and components that comprise more than one subunit unless specifically stated otherwise.

Generally, nomenclatures used in connection with, and techniques of, cell and tissue culture, molecular biology, immunology, microbiology, genetics and protein and nucleic acid chemistry and hybridization described herein are those well known and commonly used in the art. The methods and techniques of the present invention are generally performed according to conventional methods well known in the art and as described in various general and more specific references that are cited and discussed throughout the present specification unless otherwise indicated. Enzymatic reactions and purification techniques are performed according to manufacturer's specifications, as commonly accomplished in the art or as described herein. The nomenclatures used in connection with, and the laboratory procedures and techniques of, analytical chemistry, synthetic organic chemistry, and medicinal and pharmaceutical chemistry described herein are those well known and commonly used in the art. Standard techniques are used for chemical syntheses, chemical analyses, pharmaceutical preparation, formulation, and delivery, and treatment of patients.

That the present invention may be more readily understood, selected terms are defined below.

The term "polypeptide" as used herein, refers to any polymeric chain of amino acids. The terms "peptide" and "protein" are used interchangeably with the term polypeptide and also refer to a polymeric chain of amino acids. The term "polypeptide" encompasses native or artificial proteins, protein fragments and polypeptide analogs of a protein sequence. A polypeptide may be monomeric or polymeric.

The term "isolated protein" or "isolated polypeptide" is a protein or polypeptide that by virtue of its origin or source of derivation is not associated with naturally associated components that accompany it in its native state; is substantially free of other proteins from the same species; is expressed by a cell from a different species; or does not occur in nature. Thus, a polypeptide that is chemically synthesized or synthesized in a cellular system different from the cell from which it naturally originates will be "isolated" from its naturally associated components. A protein may

also be rendered substantially free of naturally associated components by isolation, using protein purification techniques well known in the art.

The term "recovering" as used herein, refers to the process of rendering a chemical species such as a polypeptide substantially free of naturally associated components by isolation, e.g., using protein purification techniques well known in the art.

The term "human RGM A" (abbreviated herein as hRGM A), as used herein refers to a glycosylphosphatidyl-inositol (gpi)-anchored glycoprotein with 450 amino acids, was first described as a neurite growth repellent or neurite growth inhibitor during development of topographic projections (Stahl et al. Neuron 5: 735-43, 1990; Mueller, in Molecular Basis of Axon Growth and Nerve Pattern Formation, Edited by H. Fujisawa, Japan Scientific Societies Press, 215 - 229, 1997). The *rgm* gene family encompasses three different genes, two of them, *rgm a* and *b*, are expressed in the mammalian CNS, whereas the third member, *rgm c*, is expressed in the periphery (Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006), where it plays an important role in iron metabolism. Human RGM proteins have a sequence identity of 43% – 50%; the amino acid homology of human and rat RGM A is 89%. Human RGM proteins share no significant sequence homology with any other known protein. They are proline-rich proteins containing an RGDregion and have structural homology to the Von-Willebrand Factor domain and are cleaved at the N-terminal amino acid 168 by an unknown protease to yield the functionally active protein (Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006).

In vitro, RGM A inhibits neurite outgrowth at picomolar concentrations by binding to Neogenin, which has been identified as an RGM receptor (Rajagopalan et al. Nat Cell Biol.: 6(8),756-62,2004). Neogenin had first been described as a netrin-binding protein (Keino-Masu et al. Cell, 87(2):175-85, 1996), but its affinity for Netrin (K_d 2nM) is an order of magnitude lower than that for RGM (K_d 0.2nM) (Rajagopalan et al. Nat Cell Biol.: 6(8),756-62,2004). This is an important finding because binding of Netrin-1 to Neogenin or to its closely related receptor DCC (deleted in colorectal cancer) has been reported to stimulate rather than to inhibit neurite growth (Braisted et al. J. Neurosci. 20: 5792-801, 2000).

Besides binding of RGM A to Neogenin and inducing neurite growth inhibition, the binding of RGM A or B to the bone morphogenetic proteins BMP-2 and BMP-4 could represent another obstacle to successful neuroregeneration and functional

recovery (Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006). Both classes of proteins (Neogenin and the BMPs) have been reported to transduce the neurite growth inhibitory signal of RGM A via two completely different and independent signal transduction pathways. Usually, expression of these BMP proteins is relatively low in most regions of the adult CNS, but rapid increases in expression and accumulation of some BMPs (e.g. BMP-2, BMP-6, BMP-7) have been reported in response to injury and insult (Lai et al., Neuroreport 8: 2691 – 94, 1997; Martinez et al. Brain Res. 894: 1 – 11, 2001; Hall and Miller, J. Neurosci. Res. 76 : 1-8, 2004; Setoguchi et al., Exp. Neurol. 189: 33-44, 2004). In addition, in a model of multiple sclerosis, the experimental autoimmune encephalomyeltis (EAE) model, BMP-4, BMP-6 and BMP-7 were upregulated in mouse spinal cord (Ara et al., J. Neurosci.Res. 86: 125-35, 2008). BMP-2 has been reported to inhibit neurite growth by binding to cell surface RGM A, BMP-receptors I and II and by directly activating LIM-kinase (Matsuura et al. Biochem Biophys Res Commun., 360: 868-73, 2007) and it is therefore expected that blocking the RGM A-BMP-2 interaction will further increase functional recovery after CNS injury.

As mentioned above, spinally injured rats and humans with brain injury, show massive accumulations of cellular RGM at the injury site and the staining pattern of RGM A in rats at the spinal lesion site is very similar to the pan RGM antibody staining in humans, suggesting that most of the pan RGM staining in humans is related to RGM A localization but not to RGM B localization (Schwab et al., Arch. Neurol.62: 1561-8, 2005a; Schwab et al. Eur. J. Neurosci. 21:1569-76, 2005 b; Hata et al. J. Cell Biol.173:47-58, 2006). In healthy human brain, pan RGM staining (RGM A & B immunoreactivity) was detected on white matter fibers, oligodendrocytes, perikarya of few neurons, some vascular smooth muscle and few endothelial cells. No staining of astrocytes was observed. The RGM staining pattern in adult healthy human brain is very similar to the staining pattern observed in adult rat spinal cords (Schwab et al. Eur. J. Neurosci. 21:1569-76, 2005 b; Hata et al. J. Cell Biol. 173:47-58, 2006).

Based on the accumulation of RGM A at lesion sites in brain and spinal cord injury and due to its cellular neurite growth inhibitory activity, it is expected that the protein will exert neurite growth inhibitory activity and its neutralization by antibodies, or antigen-binding fragment thereof that bind to at least one epitope of the human RGM A might result in improved regrowth of injured nerve fibers and in an

enhancement of functional recovery in indications characterized by nerve fiber injury and RGM accumulation.

Unless otherwise stated the term "RGM A" also encompasses RGM A molecules isolated or obtained from other species, as for example, rodents, like mice or rats; specifically, the rat derived molecule is designated herein as "rat RGM A".

TABLE 1: LIST OF SEQUENCES OF RGM A RELATED MOLECULES

Protein	Sequence identifier	Description
hRGM A	SEQ ID NO. 2	Human RGM A protein sequence
	SEQ ID NO. 1	Human RGM A nucleotide sequence
hRGM A	SEQ ID NO. 4	Human RGM A-fc protein sequence
	SEQ ID NO. 3	Human RGM A-fc nucleotide sequence
hRGM A	SEQ ID NO. 6	Human RGM A light chain – fc protein sequence
	SEQ ID NO. 5	Human RGM A light chain - fc nucleotide sequence
rat RGM A	SEQ ID NO. 8	Rat RGM A protein sequence
	SEQ ID NO. 7	Rat RGM A nucleotide sequence

"Biological activity " as used herein, refers to all inherent biological properties of RGM A as defined herein.

The terms "specific binding" or "specifically binding", as used herein, in reference to the interaction of an antibody, a protein, or a peptide with a second chemical species, mean that the interaction is dependent upon the presence of a particular structure (e.g., an "antigenic determinant" or "epitope" as defined below) on the chemical species; for example, an antibody recognizes and binds to a specific protein structure rather than to proteins generally. If an antibody is specific for epitope "A", the presence of a molecule containing epitope A (or free, unlabeled A), in a reaction containing labeled "A" and the antibody, will reduce the amount of labeled A bound to the antibody.

The term "antibody", as used herein, broadly refers to any immunoglobulin (Ig) molecule comprised of four polypeptide chains, two heavy (H) chains and two light (L) chains, or any functional fragment, mutant, variant, or derivation thereof, which

retains the essential epitope binding features of an Ig molecule. Such mutant, variant, or derivative antibody formats are known in the art. Nonlimiting embodiments of which are discussed below. An antibody is said to be "capable of binding" a molecule if it is capable of specifically reacting with the molecule to thereby bind the molecule to the antibody.

A "monoclonal antibody" as used herein is intended to refer to a preparation of antibody molecules, which share a common heavy chain and common light chain amino acid sequence, in contrast with "polyclonal" antibody preparations that contain a mixture of different antibodies. Monoclonal antibodies can be generated by several novel technologies like phage, bacteria, yeast or ribosomal display, as well as classical methods exemplified by hybridoma-derived antibodies (e.g., an antibody secreted by a hybridoma prepared by hybridoma technology, such as the standard Kohler and Milstein hybridoma methodology ((1975) Nature 256:495-497).

In a full-length antibody, each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (abbreviated herein as HCVR or VH) and a heavy chain constant region. The heavy chain constant region is comprised of three domains, CH1, CH2 and CH3. Each light chain is comprised of a light chain variable region (abbreviated herein as LCVR or VL) and a light chain constant region. The light chain constant region is comprised of one domain, CL. The VH and VL regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity determining regions (CDR), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each VH and VL is composed of three CDRs and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Immunoglobulin molecules can be of any type (e.g., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA and IgY), class (e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2) or subclass.

The term "antigen-binding portion" or "antigen-binding fragment" of an antibody (or simply "antibody portion" or "antibody fragment"), as used herein, refers to one or more fragments of an antibody that retain the ability to specifically bind to an antigen (*e.g.*, hRGM A). It has been shown that the antigen-binding function of an antibody can be performed by fragments of a full-length antibody. Such antibody embodiments may also be bispecific, dual specific, or multi-specific formats; specifically binding to two or more different antigens. Examples of binding fragments

encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody include (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the VL, VH, CL and CH1 domains; (ii) a $F(ab')_2$ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fd fragment consisting of the VH and CH1 domains; (iv) a Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody, (v) a dAb fragment (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546, Winter et al., PCT publication WO 90/05144 A1 herein incorporated by reference), which comprises a single variable domain; and (vi) an isolated complementarity determining region (CDR). Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, VL and VH, are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the VL and VH regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); see *e.g.*, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody. Other forms of single chain antibodies, such as diabodies are also encompassed. Diabodies are bivalent, bispecific antibodies in which VH and VL domains are expressed on a single polypeptide chain, but using a linker that is too short to allow for pairing between the two domains on the same chain, thereby forcing the domains to pair with complementary domains of another chain and creating two antigen binding sites (see *e.g.*, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123). Such antibody binding portions are known in the art (Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

The term "antibody construct" as used herein refers to a polypeptide comprising one or more the antigen binding portions of the invention linked to a linker polypeptide or an immunoglobulin constant domain. Linker polypeptides comprise two or more amino acid residues joined by peptide bonds and are used to link one or more antigen binding portions. Such linker polypeptides are well known in the art (see *e.g.*, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123). An immunoglobulin constant domain refers to a heavy or light chain constant domain. Human IgG heavy

chain and light chain constant domain amino acid sequences are known in the art and represented in Table 2.

TABLE 2: SEQUENCE OF HUMAN IgG HEAVY CHAIN CONSTANT DOMAIN AND LIGHT CHAIN CONSTANT DOMAIN

Protein	**Sequence Identifier**	Sequence
		123456789012345678901234567890
Ig gamma-1 constant region	**SEQ ID NO.:11**	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Ig gamma-1 constant region mutant	**SEQ ID NO.:12**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Ig Kappa constant region	**SEQ ID NO.:13**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
Ig Lambda constant region	**SEQ ID NO.:14**	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS

Still further, an antibody or antigen-binding portion thereof may be part of a larger immunoadhesion molecules, formed by covalent or noncovalent association of the antibody or antibody portion with one or more other proteins or peptides. Examples of such immunoadhesion molecules include use of the streptavidin core region to make a tetrameric scFv molecule (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) and use of a cysteine residue, a marker peptide and a C-terminal polyhistidine tag to make bivalent and biotinylated scFv molecules (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Antibody

portions, such as Fab and F(ab')$_2$ fragments, can be prepared from whole antibodies using conventional techniques, such as papain or pepsin digestion, respectively, of whole antibodies. Moreover, antibodies, antibody portions and immunoadhesion molecules can be obtained using standard recombinant DNA techniques, as described herein.

An "isolated antibody", as used herein, is intended to refer to an antibody that is substantially free of other antibodies having different antigenic specificities (*e.g.*, an isolated antibody that specifically binds hRGM A is substantially free of antibodies that specifically bind antigens other than hRGM A). An isolated antibody that specifically binds hRGM A may, however, have cross-reactivity to other antigens, such as RGM A molecules from other species. Moreover, an isolated antibody may be substantially free of other cellular material and/or chemicals.

The term "human antibody", as used herein, is intended to include antibodies having variable and constant regions derived from human germline immunoglobulin sequences. The human antibodies of the invention may include amino acid residues not encoded by human germline immunoglobulin sequences (e.g., mutations introduced by random or site-specific mutagenesis in vitro or by somatic mutation in vivo), for example in the CDRs and in particular CDR3. However, the term "human antibody", as used herein, is not intended to include antibodies in which CDR sequences derived from the germline of another mammalian species, such as a mouse, have been grafted onto human framework sequences.

The term "recombinant human antibody", as used herein, is intended to include all human antibodies that are prepared, expressed, created or isolated by recombinant means, such as antibodies expressed using a recombinant expression vector transfected into a host cell (described further below), antibodies isolated from a recombinant, combinatorial human antibody library (Hoogenboom H.R., (1997) *TIB Tech.* 15:62-70; Azzazy H., and Highsmith W.E., (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445; Gavilondo J.V., and Larrick J.W. (2002) *BioTechniques* 29:128-145; Hoogenboom H., and Chames P. (2000) *Immunology Today* 21:371-378), antibodies isolated from an animal (e.g., a mouse) that is transgenic for human immunoglobulin genes (see e.g., Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., and Green L.L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13:593-597; Little M. et al (2000) *Immunology Today* 21:364-370) or antibodies prepared, expressed, created or isolated by any other means that involves splicing of human immunoglobulin gene

sequences to other DNA sequences. Such recombinant human antibodies have variable and constant regions derived from human germline immunoglobulin sequences. In certain embodiments, however, such recombinant human antibodies are subjected to in vitro mutagenesis (or, when an animal transgenic for human Ig sequences is used, in vivo somatic mutagenesis) and thus the amino acid sequences of the VH and VL regions of the recombinant antibodies are sequences that, while derived from and related to human germline VH and VL sequences, may not naturally exist within the human antibody germline repertoire in vivo.

The term "chimeric antibody" refers to antibodies which comprise heavy and light chain variable region sequences from one species and constant region sequences from another species, such as antibodies having murine heavy and light chain variable regions linked to human constant regions. The chimeric antibody can be produced through recombinant molecular biological techniques, or may be physically conjugated together.

The term "CDR-grafted antibody" refers to antibodies which comprise heavy and light chain variable region sequences from one species but in which the sequences of one or more of the CDR regions of VH and/or VL are replaced with CDR sequences of another species, such as antibodies having murine heavy and light chain variable regions in which one or more of the murine CDRs (*e.g.*, CDR3) has been replaced with human CDR sequences.

The terms "Kabat numbering", "Kabat definitions and "Kabat labeling" are used interchangeably herein. These terms, which are recognized in the art, refer to a system of numbering amino acid residues which are more variable (*i.e.* hypervariable) than other amino acid residues in the heavy and light chain variable regions of an antibody, or an antigen binding portion thereof (Kabat *et al.* (1971) *Ann. NY Acad, Sci.* 190:382-391 and , Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). For the heavy chain variable region, the hypervariable region ranges from amino acid positions 31 to 35 for CDR1, amino acid positions 50 to 65 for CDR2, and amino acid positions 95 to 102 for CDR3. For the light chain variable region, the hypervariable region ranges from amino acid positions 24 to 34 for CDR1, amino acid positions 50 to 56 for CDR2, and amino acid positions 89 to 97 for CDR3.

As used herein, the terms "acceptor" and "acceptor antibody" refer to the antibody or nucleic acid sequence providing or encoding at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 98% or 100% of the amino acid sequences of one or more of the framework regions. In some embodiments, the term "acceptor" refers to the antibody amino acid or nucleic acid sequence providing or encoding the constant region(s). In yet another embodiment, the term "acceptor" refers to the antibody amino acid or nucleic acid sequence providing or encoding one or more of the framework regions and the constant region(s). In a specific embodiment, the term "acceptor" refers to a human antibody amino acid or nucleic acid sequence that provides or encodes at least 80%, preferably, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 98%, or 100% of the amino acid sequences of one or more of the framework regions. In accordance with this embodiment, an acceptor may contain at least 1, at least 2, at least 3, least 4, at least 5, or at least 10 amino acid residues that does (do) not occur at one or more specific positions of a human antibody. An acceptor framework region and/or acceptor constant region(s) may be, e.g., derived or obtained from a germline antibody gene, a mature antibody gene, a functional antibody (e.g., antibodies well-known in the art, antibodies in development, or antibodies commercially available).

As used herein, the term "CDR" refers to the complementarity determining region within antibody variable sequences. There are three CDRs in each of the variable regions of the heavy chain and the light chain, which are designated CDR1, CDR2 and CDR3, for each of the variable regions. The term "CDR set" as used herein refers to a group of three CDRs that occur in a single variable region capable of binding the antigen. The exact boundaries of these CDRs have been defined differently according to different systems. The system described by Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991)) not only provides an unambiguous residue numbering system applicable to any variable region of an antibody, but also provides precise residue boundaries defining the three CDRs. These CDRs may be referred to as Kabat CDRs. Chothia and coworkers (Chothia &Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) and Chothia et al., Nature 342:877-883 (1989)) found that certain sub-portions within Kabat CDRs adopt nearly identical peptide backbone conformations, despite having great diversity at the level of amino acid sequence. These sub-portions were designated as L1, L2 and L3 or H1, H2 and H3 where the "L" and the

"H" designates the light chain and the heavy chains regions, respectively. These regions may be referred to as Chothia CDRs, which have boundaries that overlap with Kabat CDRs. Other boundaries defining CDRs overlapping with the Kabat CDRs have been described by Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) and MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996)). Still other CDR boundary definitions may not strictly follow one of the above systems, but will nonetheless overlap with the Kabat CDRs, although they may be shortened or lengthened in light of prediction or experimental findings that particular residues or groups of residues or even entire CDRs do not significantly impact antigen binding. The methods used herein may utilize CDRs defined according to any of these systems, although preferred embodiments use Kabat or Chothia defined CDRs.

As used herein, the term "canonical" residue refers to a residue in a CDR or framework that defines a particular canonical CDR structure as defined by Chothia et al. (J. Mol. Biol. 196:901-907 (1987); Chothia et al., J. Mol. Biol. 227:799 (1992), both are incorporated herein by reference). According to Chothia et al., critical portions of the CDRs of many antibodies have nearly identical peptide backbone confirmations despite great diversity at the level of amino acid sequence. Each canonical structure specifies primarily a set of peptide backbone torsion angles for a contiguous segment of amino acid residues forming a loop.

As used herein, the terms "donor" and "donor antibody" refer to an antibody providing one or more CDRs. In a preferred embodiment, the donor antibody is an antibody from a species different from the antibody from which the framework regions are obtained or derived. In the context of a humanized antibody, the term "donor antibody" refers to a non-human antibody providing one or more CDRs.

As used herein, the term "framework" or "framework sequence" refers to the remaining sequences of a variable region minus the CDRs. Because the exact definition of a CDR sequence can be determined by different systems, the meaning of a framework sequence is subject to correspondingly different interpretations. The six CDRs (CDR-L1, -L2, and -L3 of light chain and CDR-H1, -H2, and -H3 of heavy chain) also divide the framework regions on the light chain and the heavy chain into four sub-regions (FR1, FR2, FR3 and FR4) on each chain, in which CDR1 is positioned between FR1 and FR2, CDR2 between FR2 and FR3, and CDR3 between FR3 and FR4. Without specifying the particular sub-regions as FR1, FR2, FR3 or FR4, a framework region, as referred by others, represents the combined

FR's within the variable region of a single, naturally occurring immunoglobulin chain. As used herein, a FR represents one of the four sub- regions, and FRs represents two or more of the four sub- regions constituting a framework region.

Human heavy chain and light chain acceptor sequences are known in the art. In one embodiment of the invention the human heavy chain and light chain acceptor sequences are selected from the sequences described in Table 3 and Table 4. Different combinations for human framework sequences FR1 to FR4 are stated in said tables.

TABLE 3: HUMAN HEAVY CHAIN ACCEPTOR SEQUENCES

SEQ ID No.	Protein region	Sequence
		123456789012345678901234567890 12
15	VH3-48/JH3 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
16	VH3-48/JH3 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
17	VH3-48/JH3 FR3	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
18	VH3-48/JH3 FR4	WGQGTMVTVSS
15	VH3-48/JH4 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
16	VH3-48/JH4 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
17	VH3-48/JH4 FR3	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
19	VH3-48/JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
15	VH3-48/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
16	VH3-48/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
17	VH3-48/JH6 FR3	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
20	VH3-48/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
21	VH3-33/JH3 FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
22	VH3-33/JH3 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
23	VH3-33/JH3 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
18	VH3-33/JH3 FR4	WGQGTMVTVSS
21	VH3-33/JH4 FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
22	VH3-33/JH4 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
23	VH3-33/JH4 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
19	VH3-33/JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
21	VH3-33/JH6 FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
22	VH3-33/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
23	VH3-33/JH6 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
20	VH3-33/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
24	VH3-23/JH3 FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
25	VH3-23/JH3 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
26	VH3-23/JH3 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
18	VH3-23/JH3 FR4	WGQGTMVTVSS
24	VH3-23/JH4 FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
25	VH3-23/JH4 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
26	VH3-23/JH4 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK

SEQ ID No.	Protein region	Sequence
		12345678901234567890123456789012
19	VH3-23/JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
24	VH3-23/JH6 FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
25	VH3-23/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
26	VH3-23/JH6 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
20	VH3-23/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS

TABLE 4: HUMAN LIGHT CHAIN ACCEPTOR SEQUENCES

SEQ ID No.	Protein region	Sequence
		12345678901234567890123456789012
27	A18/JK2 FR1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC
28	A18/JK2 FR2	WYLQKPGQSPQLLIY
29	A18/JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
30	A18/JK2 FR4	FGQGTKLEIKR
31	A17/JK2 FR1	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
32	A17/JK2 FR2	WFQQRPGQSPRRLIY
33	A17/JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
30	A17/JK2 FR4	FGQGTKLEIKR

As used herein, the term "germline antibody gene" or "gene fragment" refers to an immunoglobulin sequence encoded by non-lymphoid cells that have not undergone the maturation process that leads to genetic rearrangement and mutation for expression of a particular immunoglobulin. (See, e.g., Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001)). One of the advantages provided by various embodiments of the present invention stems from the recognition that germline antibody genes are more likely than mature antibody genes to conserve essential amino acid sequence structures characteristic of individuals in the species, hence less likely to be recognized as from a foreign source when used therapeutically in that species.

As used herein, the term "key" residues refer to certain residues within the variable region that have more impact on the binding specificity and/or affinity of an antibody, in particular a humanized antibody. A key residue includes, but is not limited to, one or more of the following: a residue that is adjacent to a CDR, a potential glycosylation site (can be either N- or O-glycosylation site), a rare residue, a residue capable of interacting with the antigen, a residue capable of interacting with a CDR, a canonical residue, a contact residue between heavy chain variable

region and light chain variable region, a residue within the Vernier zone, and a residue in the region that overlaps between the Chothia definition of a variable heavy chain CDR1 and the Kabat definition of the first heavy chain framework.

The term "humanized antibody" generally refers to antibodies which comprise heavy and light chain variable region sequences from a non-human species (*e.g.*, a mouse) but in which at least a portion of the VH and/or VL sequence has been altered to be more "human-like", *i.e.*, more similar to human germline variable sequences. One type of humanized antibody is a CDR-grafted antibody, in which human CDR sequences are introduced into non-human VH and VL sequences to replace the corresponding nonhuman CDR sequences.

In particular, the term "humanized antibody" as used herein, is an antibody or a variant, derivative, analog or fragment thereof which immunospecifically binds to an antigen of interest and which comprises a framework (FR) region having substantially the amino acid sequence of a human antibody and a complementary determining region (CDR) having substantially the amino acid sequence of a non-human antibody. As used herein, the term "substantially" in the context of a CDR refers to a CDR having an amino acid sequence at least 50, 55, 60, 65, 70, 75 or 80%, preferably at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 98% or at least 99% identical to the amino acid sequence of a non-human antibody CDR. A humanized antibody comprises substantially all of at least one, and typically two, variable domains (Fab, Fab', F(ab') 2, FabC, Fv) in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin (i.e., donor antibody) and all or substantially all of the framework regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. Preferably, a humanized antibody also comprises at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. In some embodiments, a humanized antibody contains both the light chain as well as at least the variable domain of a heavy chain. The antibody also may include the CH1, hinge, CH2, CH3, and CH4 regions of the heavy chain. In some embodiments, a humanized antibody only contains a humanized light chain. In some embodiments, a humanized antibody only contains a humanized heavy chain. In specific embodiments, a humanized antibody only contains a humanized variable domain of a light chain and/or humanized heavy chain.

The humanized antibody can be selected from any class of immunoglobulins, including IgY, IgM, IgG, IgD, IgA and IgE, and any isotype, including without

limitation IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4. The humanized antibody may comprise sequences from more than one class or isotype, and particular constant domains may be selected to optimize desired effector functions using techniques well-known in the art.

The framework and CDR regions of a humanized antibody need not correspond precisely to the parental sequences, e.g., the donor antibody CDR or the consensus framework may be mutagenized by substitution, insertion and/or deletion of at least one amino acid residue so that the CDR or framework residue at that site does not correspond to either the donor antibody or the consensus framework. In a preferred embodiment, such mutations, however, will not be extensive. Usually, at least 50, 55, 60, 65, 70, 75 or 80%, preferably at least 85%, more preferably at least 90%, and most preferably at least 95% of the humanized antibody residues will correspond to those of the parental FR and CDR sequences. As used herein, the term "consensus framework" refers to the framework region in the consensus immunoglobulin sequence. As used herein, the term "consensus immunoglobulin sequence" refers to the sequence formed from the most frequently occurring amino acids (or nucleotides) in a family of related immunoglobulin sequences (See e.g., Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987). In a family of immunoglobulins, each position in the consensus sequence is occupied by the amino acid occurring most frequently at that position in the family. If two amino acids occur equally frequently, either can be included in the consensus sequence.

As used herein, "Vernier" zone refers to a subset of framework residues that may adjust CDR structure and fine-tune the fit to antigen as described by Foote and Winter (1992, J. Mol. Biol. 224:487-499, which is incorporated herein by reference). Vernier zone residues form a layer underlying the CDRs and may impact on the structure of CDRs and the affinity of the antibody.

The term "inhibition of binding" of RGM to one of his receptors as used herein encompasses partial (as for example by about 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95% or more) or complete reduction of said receptor binding activity. Said "inhibition of binding" may be determined by any suitable method available in the art, preferably by any method as exemplified herein, as for example ELISA based binding assays.

As used herein, the term "neutralizing" refers to neutralization of biological activity of a target protein when a binding protein specifically binds the target protein.

Neutralizing may be the result of different ways of binding of said binding protein to the target. For example, neutralizing may be caused by binding of the binding protein in a region of the target which does not affect receptor binding to the target molecule. Alternatively binding of a binding protein may result in a blockade of the receptor binding to the target, which blockade finally neutralizes the target protein activity. Each of said different mechanism may occur according to the invention. Preferably a neutralizing binding protein is a neutralizing antibody whose binding to hRGM A results in neutralization of a biological activity of hRGM A. Preferably the neutralizing binding protein binds hRGM A and decreases a biologically activity of hRGM A by at least about 20%, 40%, 60%, 80%, 85% or more. Neutralization of a biological activity of hRGM A by a neutralizing binding protein can be assessed by measuring one or more indicators of hRGM A biological activity well known in the art. For example neutralization of hRGM A reverses the inhibition in a Ntera neuronal outgrowth assay (see Example 3, below). The Ntera neurite growth assay addresses inhibition of neurite outgrowth. In the absence of an inhibitory RGM A protein or fragment and in the presence of the outgrowth-stimulating substrate laminin, neuronal NTera aggregates show an extensive and dense network of outgrowing neurites. RGM A or RGM A fragments inhibit neurite outgrowth, resulting in reduced length and numbers of neurites. Function-blocking RGM A antagonists or MABs like mAb 5F9 neutralized the neurite outgrowth inhibitory activity of the potent fc-conjugated hRGM A light chain fragment (amino acids 47 – 168) of the human RGM A protein in neurite growth assays with aggregates of differentiated human NTera neurons, resulting in a strong increase in neurite length and numbers.

A "neutralizing monoclonal antibody" as used herein is intended to refer to a preparation of antibody molecules, which upon binding to the specific antigen are able to compete and inhibit the binding of the natural ligand for said antigen. In a particular embodiment of the present application, the neutralizing antibodies of the present invention are capable of competing with RGM A for binding to Neogenin and/or to BMP-2 and/or BMP-4, and to prevent RGM A biological activity or function.. In particular, the neutralizing antibodies of the present invention are capable of binding with RGM A and to prevent binding to Neogenin and/or to BMP-2 and/or BMP-4, and to prevent RGM A biological activity or function.The term "activity" includes activities such as the binding specificity/affinity of an antibody for an antigen, for example, an anti-hRGM A antibody that binds to an RGM A antigen

and/or the neutralizing potency of an antibody, for example, an anti-hRGM A antibody whose binding to hRGM A inhibits the biological activity of hRGM A, e.g. as determined in a hRGM A-Neogenin binding assay, hRGM A – BMP-2 binding assay or hRGM A - BMP-4 binding assay as described below in the experimental section.

The biologic activity of RGM A can be described as regulating cellular migration. A special example of cellular migration is neurite growth, which is impeded or inhibited by RGM A proteins. In addition RGM proteins have been shown to modulate activity of BMP-proteins. Herein published examples describe a synergizing, potentiating activity of RGM proteins on the BMP-pathway on one side and an inhibitory activity of RGM proteins on the BMP-pathway, which is important for regulation of iron metabolism, bone and cartilage regeneration and in the CNS for remyelination and regeneration.

The term "epitope" or "antigenic determinant" includes any polypeptide determinant capable of specific binding to an immunoglobulin or T-cell receptor. In certain embodiments, epitope determinants include chemically active surface groupings of molecules such as amino acids, sugar side chains, phosphoryl, or sulfonyl, and, in certain embodiments, may have specific three dimensional structural characteristics, and/or specific charge characteristics. An epitope is a region of an antigen that is bound by an antibody. In certain embodiments, an antibody is said to specifically bind an antigen when it preferentially recognizes its target antigen in a complex mixture of proteins and/or macromolecules.

The term "surface plasmon resonance", as used herein, refers to an optical phenomenon that allows for the analysis of real-time biospecific interactions by detection of alterations in protein concentrations within a biosensor matrix, for example using the BIAcore system (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ). For further descriptions, see Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., *et al.* (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; and Johnnson, B., *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

The term "k_{on}", as used herein, is intended to refer to the on rate constant for association of an antibody to the antigen to form the antibody/antigen complex as is known in the art.

The term "k_{off}", as used herein, is intended to refer to the off rate constant for dissociation of an antibody from the antibody/antigen complex as is known in the art.

The term "K_d", as used herein, is intended to refer to the dissociation constant of a particular antibody-antigen interaction as is known in the art.

The term "labelled binding protein" as used herein, refers to a protein with a label incorporated that provides for the identification of the binding protein. Preferably, the label is a detectable marker, e.g., incorporation of a radiolabelled amino acid or attachment to a polypeptide of biotinyl moieties that can be detected by marked avidin (e.g., streptavidin containing a fluorescent marker or enzymatic activity that can be detected by optical or colorimetric methods). Examples of labels for polypeptides include, but are not limited to, the following: radioisotopes or radionuclides (e.g., ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, or ^{153}Sm); fluorescent labels (e.g., FITC, rhodamine, lanthanide phosphors), enzymatic labels (e.g., horseradish peroxidase, luciferase, alkaline phosphatase); chemiluminescent markers; biotinyl groups; predetermined polypeptide epitopes recognized by a secondary reporter (e.g., leucine zipper pair sequences, binding sites for secondary antibodies, metal binding domains, epitope tags); and magnetic agents, such as gadolinium chelates.

The term "antibody conjugate" refers to a binding protein, such as an antibody, chemically linked to a second chemical moiety, such as a therapeutic or cytotoxic agent. The term "agent" is used herein to denote a chemical compound, a mixture of chemical compounds, a biological macromolecule, or an extract made from biological materials. Preferably the therapeutic or cytotoxic agents include, but are not limited to, pertussis toxin, taxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, and puromycin and analogs or homologs thereof.

The terms "crystal", and "crystallized" as used herein, refer to an antibody, or antigen binding portion thereof, that exists in the form of a crystal. Crystals are one form of the solid state of matter, which is distinct from other forms such as the amorphous solid state or the liquid crystalline state. Crystals are composed of regular, repeating, three-dimensional arrays of atoms, ions, molecules (e.g., proteins such as antibodies), or molecular assemblies (e.g., antigen/antibody complexes). These three-dimensional arrays are arranged according to specific

mathematical relationships that are well-understood in the field. The fundamental unit, or building block, that is repeated in a crystal is called the asymmetric unit. Repetition of the asymmetric unit in an arrangement that conforms to a given, well-defined crystallographic symmetry provides the "unit cell" of the crystal. Repetition of the unit cell by regular translations in all three dimensions provides the crystal. See Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)."

The term "polynucleotide" as referred to herein means a polymeric form of two or more nucleotides, either ribonucleotides or deoxynucleotides or a modified form of either type of nucleotide. The term includes single and double stranded forms of DNA but preferably is double-stranded DNA.

The term "isolated polynucleotide" as used herein shall mean a polynucleotide (e.g., of genomic, cDNA, or synthetic origin, or some combination thereof) that, by virtue of its origin , the "isolated polynucleotide": is not associated with all or a portion of a polynucleotide with which the "isolated polynucleotide" is found in nature; is operably linked to a polynucleotide that it is not linked to in nature; or does not occur in nature as part of a larger sequence.

The term "vector", as used herein, is intended to refer to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments may be ligated. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments may be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (e.g., bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (e.g., non-episomal mammalian vectors) can be integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "recombinant expression vectors" (or simply, "expression vectors"). In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" may be used interchangeably as the plasmid is

the most commonly used form of vector. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors, such as viral vectors (e.g., replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses), which serve equivalent functions.

The term "operably linked" refers to a juxtaposition wherein the components described are in a relationship permitting them to function in their intended manner. A control sequence "operably linked" to a coding sequence is ligated in such a way that expression of the coding sequence is achieved under conditions compatible with the control sequences. "Operably linked" sequences include both expression control sequences that are contiguous with the gene of interest and expression control sequences that act in *trans* or at a distance to control the gene of interest. The term "expression control sequence" as used herein refers to polynucleotide sequences, which are necessary to effect the expression and processing of coding sequences to which they are ligated. Expression control sequences include appropriate transcription initiation, termination, promoter and enhancer sequences; efficient RNA processing signals such as splicing and polyadenylation signals; sequences that stabilize cytoplasmic mRNA; sequences that enhance translation efficiency (i.e., Kozak consensus sequence); sequences that enhance protein stability; and when desired, sequences that enhance protein secretion. The nature of such control sequences differs depending upon the host organism; in prokaryotes, such control sequences generally include promoter, ribosomal binding site, and transcription termination sequence; in eukaryotes, generally, such control sequences include promoters and transcription termination sequence. The term "control sequences" is intended to include components whose presence is essential for expression and processing, and can also include additional components whose presence is advantageous, for example, leader sequences and fusion partner sequences.

"Transformation", as defined herein, refers to any process by which exogenous DNA enters a host cell. Transformation may occur under natural or artificial conditions using various methods well known in the art. Transformation may rely on any known method for the insertion of foreign nucleic acid sequences into a prokaryotic or eukaryotic host cell. The method is selected based on the host cell being transformed and may include, but is not limited to, viral infection, electroporation, lipofection, and particle bombardment. Such "transformed" cells

include stably transformed cells in which the inserted DNA is capable of replication either as an autonomously replicating plasmid or as part of the host chromosome. They also include cells which transiently express the inserted DNA or RNA for limited periods of time.

The term "recombinant host cell" (or simply "host cell"), as used herein, is intended to refer to a cell into which exogenous DNA has been introduced. It should be understood that such terms are intended to refer not only to the particular subject cell, but, to the progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term "host cell" as used herein. Preferably host cells include prokaryotic and eukaryotic cells selected from any of the Kingdoms of life. Preferred eukaryotic cells include protist, fungal, plant and animal cells. Most preferably host cells include but are not limited to the prokaryotic cell line E. coli; mammalian cell lines CHO, HEK 293 and COS; the insect cell line Sf9; and the fungal cell Saccharomyces cerevisiae.

Standard techniques may be used for recombinant DNA, oligonucleotide synthesis, and tissue culture and transformation (e.g., electroporation, lipofection). Enzymatic reactions and purification techniques may be performed according to manufacturer's specifications or as commonly accomplished in the art or as described herein. The foregoing techniques and procedures may be generally performed according to conventional methods well known in the art and as described in various general and more specific references that are cited and discussed throughout the present specification. See e.g., Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), which is incorporated herein by reference for any purpose.

"Transgenic organism", as known in the art and as used herein, refers to an organism having cells that contain a transgene, wherein the transgene introduced into the organism (or an ancestor of the organism) expresses a polypeptide not naturally expressed in the organism. A "transgene" is a DNA construct, which is stably and operably integrated into the genome of a cell from which a transgenic organism develops, directing the expression of an encoded gene product in one or more cell types or tissues of the transgenic organism.

The terms "regulate" and "modulate" are used interchangeably, and, as used herein, refer to a change or an alteration in the activity of a molecule of interest (e.g., the biological activity of hRGM A). Modulation may be an increase or a decrease in the magnitude of a certain activity or function of the molecule of interest. Exemplary activities and functions of a molecule include, but are not limited to, binding characteristics, enzymatic activity, cell receptor activation, and signal transduction.

Correspondingly, the term "modulator," as used herein, is a compound capable of changing or altering an activity or function of a molecule of interest (e.g., the biological activity of hRGM A). For example, a modulator may cause an increase or decrease in the magnitude of a certain activity or function of a molecule compared to the magnitude of the activity or function observed in the absence of the modulator.The term "agonist", as used herein, refers to a modulator that, when contacted with a molecule of interest, causes an increase in the magnitude of a certain activity or function of the molecule compared to the magnitude of the activity or function observed in the absence of the agonist. Particular agonists of interest may include, but are not limited to, hRGM A polypeptides or polypeptides, nucleic acids, carbohydrates, or any other molecules that bind to hRGM A. The term "antagonist" as used herein, refer to a modulator that, when contacted with a molecule of interest causes a decrease in the magnitude of a certain activity or function of the molecule compared to the magnitude of the activity or function observed in the absence of the antagonist. Exemplary antagonists include, but are not limited to, proteins, peptides, antibodies, peptibodies, carbohydrates or small organic molecules. Peptibodies are described, e.g., in WO01/83525.

Particular antagonists of interest include those that block or modulate the biological or immunological activity of hRGM A. Antagonists of hRGM A may include, but are not limited to, proteins, nucleic acids, carbohydrates, or any other molecules, which bind to hRGM A, like monoclonal antibodies that interact with the RGM A molecule. It should be noted that the interaction with RGM A may result in binding and neutralization of other ligands/cell membrane components, and may be useful for additive or synergistic functioning against multiple diseases.

As used herein, the term "effective amount" refers to the amount of a therapy which is sufficient to reduce or ameliorate the severity and/or duration of a disorder or one or more symptoms thereof, prevent the advancement of a disorder, cause regression of a disorder, prevent the recurrence, development, onset or progression

of one or more symptoms associated with a disorder, detect a disorder, or enhance or improve the prophylactic or therapeutic effect(s) of another therapy (e.g. , prophylactic or therapeutic agent).

The term "sample", as used herein, is used in its broadest sense. A "biological sample", as used herein, includes, but is not limited to, any quantity of a substance from a living thing or formerly living thing. Such living things include, but are not limited to, humans, mice, rats, monkeys, dogs, rabbits and other animals. Such substances include, but are not limited to, blood, serum, urine, synovial fluid, cells, organs, tissues, bone marrow, lymph nodes and spleen.

2. Polypeptides that bind hRGM A

The principal embodiment of the present application comprises isolated proteins or polypeptides that specifically bind to at least one epitope of a RGM A protein. The isolated proteins or polypeptides that specifically bind to at least one epitope of a RGM A protein are capable of inhibiting binding of RGM A to its receptor Neogenin and/or to bone morphogenetic proteins 2 and 4 (BMP-2, BMP-4).

The most preferred embodiment of the present application comprises antibodies that bind to RGM Aor antigen-binding portions or fragments thereof.

Preferably, anti-RGM A antibodies of the present invention, exhibit a high capacity to reduce or to neutralize RGM A activity, e.g., as assessed by any one of several in vitro and in vivo assays known in the art or described below.

The present application most preferably comprises neutralizing monoclonal antibodies against RGM A, which selectively prevent binding of RGM A to its receptor Neogenin and to bone morphogenetic proteins 2 and 4 (BMP-2, BMP-4), and the generation of a neutralizing monoclonal antibody against RGM A, which selectively prevents binding of RGM A to its coreceptors bone morphogenetic proteins 2 and 4 (BMP-2, BMP-4).

Preferably, the monoclonal neutralizing antibody of the present application is a human antibody or humanized antibody. The term "human antibody" refers to antibodies having variable and constant regions corresponding to, or derived from, human germline immunoglobulin sequences (e.g., see Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991). The human antibodies of the present application, however, may include amino acid residues not encoded by

human germline immunoglobulin sequences (e.g., mutations introduced by random or site-specific mutagenesis in vitro or by somatic mutation in vivo), for example, in the CDRs and, in particular, CDR3.

In various embodiments, the antibody is a recombinant antibody or a monoclonal antibody. The most preferred neutralizing antibodies of the present application are referred to herein as mAb5F9 and mAb8D1 and functional antibody fragments thereof, and other antibodies and functional antibody fragments with equivalent properties to mAb5F9 and mAb8D1, such as high affinity binding to RGM A with low dissociation kinetics and high neutralizing capacity, are intended as part of the present invention. The binding affinity and dissociation rate of an anti-RGM A antibody of the present application to an immunogenic RGM A polypeptide or fragment thereof, may be determined by any method known in the art. For example, the binding affinity can be measured by competitive ELISAs, c RIAs, BIAcore or KinExA technology. The dissociation rate also can be measured by BIAcore or KinExA technology. The binding affinity and dissociation rate are measured by surface plasmon resonance using, e.g., a BIAcore.

One of the preferred monoclonal antibodies of the present application, the mAb5F9 antibody, has at least 90% amino acid sequence identity with a sequence comprising a heavy chain variable region (VH region) comprising the sequence of SEQ ID NO: 9 or 34 and a light chain variable region (VL region) comprising the sequence of SEQ ID NO: 10.

It is also intended that the isolated monoclonal antibodies that interact with RGM A of the present application may be a glycosylated binding protein wherein the antibody or antigen-binding portion thereof comprises one or more carbohydrate residues. Nascent *in vivo* protein production may undergo further processing, known as post-translational modification. In particular, sugar (glycosyl) residues may be added enzymatically, a process known as glycosylation. The resulting proteins bearing covalently linked oligosaccharide side chains are known as glycosylated proteins or glycoproteins. Protein glycosylation depends on the amino acid sequence of the protein of interest, as well as the host cell in which the protein is expressed. Different organisms may produce different glycosylation enzymes (eg., glycosyltransferases and glycosidases), and have different substrates (nucleotide sugars) available. Due to such factors, protein glycosylation pattern, and composition

of glycosyl residues, may differ depending on the host system in which the particular protein is expressed. Glycosyl residues useful in the invention may include, but are not limited to, glucose, galactose, mannose, fucose, n-acetylglucosamine and sialic acid. Preferably the glycosylated binding protein comprises glycosyl residues such that the glycosylation pattern is human.

The antibodies of the present application comprise a heavy chain constant region, such as an IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, IgY or IgD constant region. Furthermore, the antibody can comprise a light chain constant region, either a kappa light chain constant region or a lambda light chain constant region. Preferably, the antibody comprises a kappa light chain constant region. Alternatively, the antibody portion can be, for example, a Fab fragment or a single chain Fv fragment. Replacements of amino acid residues in the Fc portion to alter antibody effector's function are known in the art (Winter, et al. U.S. Pat. Nos. 5,648,260; 5,624,821). The Fc portion of an antibody mediates several important effector's functions e.g. cytokine induction, ADCC, phagocytosis, complement dependent cytotoxicity (CDC) and half- life/clearance rate of antibody and antigen-antibody complexes. In some cases these effector's functions are desirable for therapeutic antibody but in other cases might be unnecessary or even deleterious, depending on the therapeutic objectives. Certain human IgG isotypes, particularly IgG1 and IgG3, mediate ADCC and CDC via binding to Fcγ Rs and complement C1q, respectively. Neonatal Fc receptors (FcRn) are the critical components determining the circulating half-life of antibodies. In still another embodiment at least one amino acid residue is replaced in the constant region of the antibody, for example the Fc region of the antibody, such that effector's functions of the antibody are altered.

3. Generation of anti-hRGM A antibodies

3.1. General

Antibodies of the application can be generated by immunization of a suitable host (e.g., vertebrates, including humans, mice, rats, sheep, goats, pigs, cattle, horses, reptiles, fishes, amphibians, and in eggs of birds, reptiles and fish). To generate the antibodies of the present application, the host is immunized with an immunogenic RGM A polypeptide or fragment thereof of the invention. The term

"immunization" refers herein to the process of presenting an antigen to an immune repertoire whether that repertoire exists in a natural genetically unaltered organism, or a transgenic organism, including those modified to display an artificial human immune repertoire. Similarly, an "immunogenic preparation" is a formulation of antigen that contains adjuvants or other additives that would enhance the immunogenicity of the antigen.

Immunization of animals may be done by any method known in the art. See, e.g., Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Methods for immunizing non- human animals such as mice, rats, sheep, goats, pigs, cattle and horses are well known in the art. See, e.g., Harlow and Lane and U.S. Pat. No. 5, 994,619. In a preferred embodiment, the RGM A antigen is administered with an adjuvant to stimulate the immune response. Such adjuvants include complete or incomplete Freund's adjuvant, RIBI (muramyl dipeptides) or ISCOM (immunostimulating complexes). Such adjuvants may protect the polypeptide from rapid dispersal by sequestering it in a local deposit, or they may contain substances that stimulate the host to secrete factors that are chemotactic for macrophages and other components of the immune system. Preferably, if a polypeptide is being administered, the immunization schedule will involve two or more administrations of the polypeptide, spread out over several weeks.

It is contemplated that the animal host is immunized with the antigen associated with the cell membrane of an intact or disrupted cell and antibodies of the present application are identified by binding to an immunogenic polypeptide of the invention. After immunization of the animal host with the antigen, antibodies may be obtained from the animal. The antibody-containing serum is obtained from the animal by bleeding or sacrificing the animal. The serum may be used as it is obtained from the animal, an immunoglobulin fraction may be obtained from the serum, or the antibodies may be purified from the serum. Serum or immunoglobulins obtained in this manner are polyclonal, thus having a heterogeneous array of properties.

3.2 Anti-RGM A monoclonal antibodies using Hybridoma technology

Monoclonal antibodies can be prepared using a wide variety of techniques known in the art including the use of hybridoma, recombinant, and phage display technologies, or a combination thereof. For example, monoclonal antibodies can be produced using hybridoma techniques including those known in the art and taught,

for example, in Harlow et al. , Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (said references incorporated by reference in their entireties). The term "monoclonal antibody" as used herein is not limited to antibodies produced through hybridoma technology. The term "monoclonal antibody" refers to an antibody that is derived from a single clone, including any eukaryotic, prokaryotic, or phage clone, and not the method by which it is produced.

Methods for producing and screening for specific antibodies using hybridoma technology are routine and well known in the art. In one embodiment, the present invention provides methods of generating monoclonal antibodies as well as antibodies produced by the method comprising culturing a hybridoma cell secreting an antibody of the invention wherein, preferably, the hybridoma is generated by fusing splenocytes isolated from a mouse immunized with an antigen of the invention with myeloma cells and then screening the hybridomas resulting from the fusion for hybridoma clones that secrete an antibody able to bind a polypeptide of the invention. Briefly, mice can be immunized with an RGM A antigen. In a preferred embodiment, the RGM A antigen is administered with a adjuvant to stimulate the immune response. Such adjuvants include complete or incomplete Freund's adjuvant, RIBI (muramyl dipeptides) or ISCOM (immunostimulating complexes). Such adjuvants may protect the polypeptide from rapid dispersal by sequestering it in a local deposit, or they may contain substances that stimulate the host to secrete factors that are chemotactic for macrophages and other components of the immune system. Preferably, if a polypeptide is being administered, the immunization schedule will involve two or more administrations of the polypeptide, spread out over several weeks.

Once an immune response is detected, e.g., antibodies specific for the antigen RGM A are detected in the mouse serum, the mouse spleen is harvested and splenocytes isolated. The splenocytes are then fused by well-known techniques to any suitable myeloma cells, for example cells from cell line SP20 available from the ATCC. Hybridomas are selected and cloned by limited dilution. The hybridoma clones are then assayed by methods known in the art for cells that secrete antibodies capable of binding RGM A. Ascites fluid, which generally contains high levels of antibodies, can be generated by immunizing mice with positive hybridoma clones.

In another embodiment, antibody-producing immortalized hybridomas may be prepared from the immunized animal. After immunization, the animal is sacrificed and the splenic B cells are fused to immortalized myeloma cells as is well known in the art. See, e.g., Harlow and Lane, *supra*. In a preferred embodiment, the myeloma cells do not secrete immunoglobulin polypeptides (a non-secretory cell line). After fusion and antibiotic selection, the hybridomas are screened using RGM A, or a portion thereof, or a cell expressing RGM A. In a preferred embodiment, the initial screening is performed using an enzyme-linked immunoassay (ELISA) or a radioimmunoassay (RIA), preferably an ELISA. An example of ELISA screening is provided in WO 00/37504, herein incorporated by reference.

Anti- RGM A antibody-producing hybridomas are selected, cloned and further screened for desirable characteristics, including robust hybridoma growth, high antibody production and desirable antibody characteristics, as discussed further below. Hybridomas may be cultured and expanded *in vivo* in syngeneic animals, in animals that lack an immune system, e.g., nude mice, or in cell culture *in vitro*. Methods of selecting, cloning and expanding hybridomas are well known to those of ordinary skill in the art.

In a preferred embodiment, the hybridomas are mouse hybridomas, as described above. In another preferred embodiment, the hybridomas are produced in a non-human, non-mouse species such as rats, sheep, pigs, goats, cattle or horses. In another embodiment, the hybridomas are human hybridomas, in which a human non-secretory myeloma is fused with a human cell expressing an anti- RGM A antibody.

Antibody fragments that recognize specific epitopes may be generated by known techniques. For example, Fab and F(ab')2 fragments of the invention may be produced by proteolytic cleavage of immunoglobulin molecules, using enzymes such as papain (to produce Fab fragments) or pepsin (to produce F(ab')2 fragments). F(ab')2 fragments contain the variable region, the light chain constant region and the CHI domain of the heavy chain.

3.3 Anti- RGM A monoclonal antibodies using SLAM

In another aspect of the invention, recombinant antibodies are generated from single, isolated lymphocytes using a procedure referred to in the art as the selected lymphocyte antibody method (SLAM), as described in U.S. Patent No. 5,627,052,

PCT Publication WO 92/02551 and Babcock, J.S. *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848. In this method, single cells secreting antibodies of interest, *e.g.*, lymphocytes derived from any one of the immunized animals described above, are screened using an antigen-specific hemolytic plaque assay, wherein the antigen RGM A, a subunit of RGM A, or a fragment thereof, is coupled to sheep red blood cells using a linker, such as biotin, and used to identify single cells that secrete antibodies with specificity for RGM A. Following identification of antibody-secreting cells of interest, heavy- and light-chain variable region cDNAs are rescued from the cells by reverse transcriptase-PCR and these variable regions can then be expressed, in the context of appropriate immunoglobulin constant regions (*e.g.*, human constant regions), in mammalian host cells, such as COS or CHO cells. The host cells transfected with the amplified immunoglobulin sequences, derived from *in vivo* selected lymphocytes, can then undergo further analysis and selection *in vitro*, for example by panning the transfected cells to isolate cells expressing antibodies to RGM A. The amplified immunoglobulin sequences further can be manipulated *in vitro*, such as by *in vitro* affinity maturation methods such as those described in PCT Publication WO 97/29131 and PCT Publication WO 00/56772.

3.4 Anti- RGM A monoclonal antibodies using transgenic animals

In another embodiment of the instant invention, antibodies are produced by immunizing a non-human animal comprising some, or all, of the human immunoglobulin locus with an RGM A antigen. In a preferred embodiment, the non-human animal is a XENOMOUSE transgenic mouse, an engineered mouse strain that comprises large fragments of the human immunoglobulin loci and is deficient in mouse antibody production. *See, e.g.,* Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994) and United States Patents 5,916,771, 5,939,598, 5,985,615, 5,998,209, 6,075,181, 6,091,001, 6,114,598 and 6,130,364. See also WO 91/10741, published July 25,1991, WO 94/02602, published February 3, 1994, WO 96/34096 and WO 96/33735, both published October 31, 1996, WO 98/16654, published April 23, 1998, WO 98/24893, published June 11, 1998, WO 98/50433, published November 12, 1998, WO 99/45031, published September 10, 1999, WO 99/53049, published October 21, 1999, WO 00 09560, published February 24, 2000 and WO 00/037504, published June 29, 2000. The XENOMOUSE transgenic mouse produces an adult-like human repertoire of fully human antibodies, and generates antigen-specific

human Mabs. The XENOMOUSE transgenic mouse contains approximately 80% of the human antibody repertoire through introduction of megabase sized, germline configuration YAC fragments of the human heavy chain loci and x light chain loci. See Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green and Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998), the disclosures of which are hereby incorporated by reference.

3.5 Anti- RGM A monoclonal antibodies using recombinant antibody libraries

In vitro methods also can be used to make the antibodies of the invention, wherein an antibody library is screened to identify an antibody having the desired binding specificity. Methods for such screening of recombinant antibody libraries are well known in the art and include methods described in, for example, Ladner *et al.* U.S. Patent No. 5,223,409; Kang *et al.* PCT Publication No. WO 92/18619; Dower *et al.* PCT Publication No. WO 91/17271; Winter *et al.* PCT Publication No. WO 92/20791; Markland *et al.* PCT Publication No. WO 92/15679; Breitling *et al.* PCT Publication No. WO 93/01288; McCafferty *et al.* PCT Publication No. WO 92/01047; Garrard *et al.* PCT Publication No. WO 92/09690; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; and Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982, US patent application publication 20030186374, and PCT Publication No. WO 97/29131, the contents of each of which are incorporated herein by reference.

The recombinant antibody library may be from a subject immunized with RGM A, or a portion of RGM A. Alternatively, the recombinant antibody library may be from a naïve subject, i.e., one who has not been immunized with RGM A, such as a human antibody library from a human subject who has not been immunized with human RGM A. Antibodies of the invention are selected by screening the recombinant antibody library with the peptide comprising human RGM A to thereby select those antibodies that recognize RGM A. Methods for conducting such screening and selection are well known in the art, such as described in the references in the preceding paragraph. To select antibodies of the invention having

particular binding affinities for hRGM A, such as those that dissociate from human RGM A with a particular k_{off} rate constant, the art-known method of surface plasmon resonance can be used to select antibodies having the desired k_{off} rate constant. To select antibodies of the invention having a particular neutralizing activity for hRGM A , such as those with a particular an IC_{50}, standard methods known in the art for assessing the inhibition of hRGM A activity may be used.

In one aspect, the invention pertains to an isolated antibody, or an antigen-binding portion thereof, that binds human RGM A. Preferably, the antibody is a neutralizing antibody. In various embodiments, the antibody is a recombinant antibody or a monoclonal antibody.

For example, the antibodies of the present invention can also be generated using various phage display methods known in the art. In phage display methods, functional antibody domains are displayed on the surface of phage particles which carry the polynucleotide sequences encoding them. In a particular, such phage can be utilized to display antigen-binding domains expressed from a repertoire or combinatorial antibody library (e. g., human or murine). Phage expressing an antigen binding domain that binds the antigen of interest can be selected or identified with antigen, e.g., using labeled antigen or antigen bound or captured to a solid surface or bead. Phage used in these methods are typically filamentous phage including fd and M13 binding domains expressed from phage with Fab, Fv or disulfide stabilized Fv antibody domains recombinantly fused to either the phage gene III or gene VIII protein. Examples of phage display methods that can be used to make the antibodies of the present invention include those disclosed in Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); PCT application No. PCT/GB91/01134; PCT publications WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; and U.S. Pat. Nos. 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 and 5,969,108; each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

As described in the above references, after phage selection, the antibody coding regions from the phage can be isolated and used to generate whole antibodies including human antibodies or any other desired antigen binding

fragment, and expressed in any desired host, including mammalian cells, insect cells, plant cells, yeast, and bacteria, e.g., as described in detail below. For example, techniques to recombinantly produce Fab, Fab' and $F(ab')_2$ fragments can also be employed using methods known in the art such as those disclosed in PCT publication WO 92/22324; Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); and Sawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); and Better et al., Science 240:1041-1043 (1988) (said references incorporated by reference in their entireties). Examples of techniques, which can be used to produce single-chain Fvs and antibodies include those described in U.S. Pat. 4,946,778 and 5,258, 498; Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu et al., PNAS 90:7995-7999 (1993); and Skerra et al., Science 240:1038-1040 (1988).

Alternative to screening of recombinant antibody libraries by phage display, other methodologies known in the art for screening large combinatorial libraries can be applied to the identification of dual specificity antibodies of the invention. One type of alternative expression system is one in which the recombinant antibody library is expressed as RNA-protein fusions, as described in PCT Publication No. WO 98/31700 by Szostak and Roberts, and in Roberts, R.W. and Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302. In this system, a covalent fusion is created between an mRNA and the peptide or protein that it encodes by *in vitro* translation of synthetic mRNAs that carry puromycin, a peptidyl acceptor antibiotic, at their 3' end. Thus, a specific mRNA can be enriched from a complex mixture of mRNAs (*e.g.*, a combinatorial library) based on the properties of the encoded peptide or protein, *e.g.*, antibody, or portion thereof, such as binding of the antibody, or portion thereof, to the dual specificity antigen. Nucleic acid sequences encoding antibodies, or portions thereof, recovered from screening of such libraries can be expressed by recombinant means as described above (*e.g.*, in mammalian host cells) and, moreover, can be subjected to further affinity maturation by either additional rounds of screening of mRNA-peptide fusions in which mutations have been introduced into the originally selected sequence(s), or by other methods for affinity maturation *in vitro* of recombinant antibodies, as described above.

In another approach the antibodies of the present invention can also be generated using yeast display methods known in the art. In yeast display methods, genetic methods are used to tether antibody domains to the yeast cell wall and display them on the surface of yeast. In particular, such yeast can be utilized to

display antigen-binding domains expressed from a repertoire or combinatorial antibody library (e. g., human or murine). Examples of yeast display methods that can be used to make the antibodies of the present invention include those disclosed Wittrup, et al. U.S. Patent No. 6,699,658 incorporated herein by reference.

4. Production of particular recombinant RGM A antibodies of the invention

Antibodies of the present invention may be produced by any of a number of techniques known in the art. For example, expression from host cells, wherein expression vector(s) encoding the heavy and light chains is (are) transfected into a host cell by standard techniques. The various forms of the term "transfection" are intended to encompass a wide variety of techniques commonly used for the introduction of exogenous DNA into a prokaryotic or eukaryotic host cell, *e.g.*, electroporation, calcium-phosphate precipitation, DEAE-dextran transfection and the like. Although it is possible to express the antibodies of the invention in either prokaryotic or eukaryotic host cells, expression of antibodies in eukaryotic cells is preferable, and most preferable in mammalian host cells, because such eukaryotic cells (and in particular mammalian cells) are more likely than prokaryotic cells to assemble and secrete a properly folded and immunologically active antibody.

Preferred mammalian host cells for expressing the recombinant antibodies of the invention include Chinese Hamster Ovary (CHO cells) (including dhfr- CHO cells, described in Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, used with a DHFR selectable marker, *e.g.*, as described in R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), NS0 myeloma cells, COS cells and SP2 cells. When recombinant expression vectors encoding antibody genes are introduced into mammalian host cells, the antibodies are produced by culturing the host cells for a period of time sufficient to allow for expression of the antibody in the host cells or, more preferably, secretion of the antibody into the culture medium in which the host cells are grown. Antibodies can be recovered from the culture medium using standard protein purification methods.

Host cells can also be used to produce functional antibody fragments, such as Fab fragments or scFv molecules. It will be understood that variations on the above procedure are within the scope of the present invention. For example, it may be desirable to transfect a host cell with DNA encoding functional fragments of either the light chain and/or the heavy chain of an antibody of this invention. Recombinant

DNA technology may also be used to remove some, or all, of the DNA encoding either or both of the light and heavy chains that is not necessary for binding to the antigens of interest. The molecules expressed from such truncated DNA molecules are also encompassed by the antibodies of the invention. In addition, bifunctional antibodies may be produced in which one heavy and one light chain are an antibody of the invention and the other heavy and light chain are specific for an antigen other than the antigens of interest by crosslinking an antibody of the invention to a second antibody by standard chemical crosslinking methods.

In a preferred system for recombinant expression of an antibody, or antigen-binding portion thereof, of the invention, a recombinant expression vector encoding both the antibody heavy chain and the antibody light chain is introduced into dhfr-CHO cells by calcium phosphate-mediated transfection. Within the recombinant expression vector, the antibody heavy and light chain genes are each operatively linked to CMV enhancer/AdMLP promoter regulatory elements to drive high levels of transcription of the genes. The recombinant expression vector also carries a DHFR gene, which allows for selection of CHO cells that have been transfected with the vector using methotrexate selection/amplification. The selected transformant host cells are cultured to allow for expression of the antibody heavy and light chains and intact antibody is recovered from the culture medium. Standard molecular biology techniques are used to prepare the recombinant expression vector, transfect the host cells, select for transformants, culture the host cells and recover the antibody from the culture medium. Still further the invention provides a method of synthesizing a recombinant antibody of the invention by culturing a host cell of the invention in a suitable culture medium until a recombinant antibody of the invention is synthesized. The method can further comprise isolating the recombinant antibody from the culture medium.

4.1 Anti RGM A antibodies

Table 5 is a list of amino acid sequences of VH and VL regions of preferred anti-hRGM A antibodies of the invention.

TABLE 5: LIST OF AMINO ACID SEQUENCES OF VH AND VL REGIONS OF ANTI hRGM A ANTIBODIES 5F9 AND 8D1

SEQ ID No.	Protein region		Sequence
			12345678901234567890123456789O
34	**VH 5F9**		EVQLVESGGGLVQPGSSLKLSCVASGFTFS **NYGMN**WIRQAPKKGLEWIG**MIYYDSSEKHY ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLEMNSLRSED TAIYYCAK**GTTPDY**WGQGVMVTVSS
57	VH 5F9 CDR-H1	Residues 31-35 of SEQ ID NO.:34	**NYGMN**
58	VH 5F9 CDR-H2	Residues 50-66 of SEQ ID NO.:34	**MIYYDSSEKHYADSVKG**
59	VH 5F9 CDR-H3	Residues 99-104 of SEQ ID NO.:34	**GTTPDY**
10	**VL 5F9**		DVVLTQTPVSLSVTLGDQASMSC**RSSQSLE YSDGYTFLE**WFLQKPGQSPQLLIY**EVSNRF S**GVPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGV YYC**FQATHDPLT**FGSGTKLEIKR
60	VL 5F9 CDR-L1	Residues 24-39 of SEQ ID NO.:10	**RSSQSLEYSDGYTFLE**
61	VL 5F9 CDR-L2	Residues 55-61 of SEQ ID NO.:10	**EVSNRFS**
62	VL 5F9 CDR-L3	Residues 94-102 of SEQ ID NO.:10	**FQATHDPLT**
55	**VH 8D1**		EVQLQQSGPELVKPGTSVKMSCKTSGYTFT **SYVMH**WVKQKPGQGLEWIG**YIIPYNDNTKY NEKFKG**KATLTSDKSSSTAYMELSSLTSED SAVYYC**ARRNEYYGSSFFDY**WGQGTTLTVS S
63	VH 8D1 CDR-H1	Residues 31-35 of SEQ ID NO.:55	**SYVMH**
64	VH 8D1 CDR-H2	Residues 50-66 of SEQ ID NO.:55	**YIIPYNDNTKYNEKFKG**
65	VH 8D1 CDR-H3	Residues 97-110 of SEQ ID NO.:55	**ARRNEYYGSSFFDY**
56	**VL 8D1**		DIQMTQSPASLSASLEEIVTITC**QASQDID NYLA**WYHQKPGKSPRLLIY**GATNLAD**GVPS RFSGSRSGTQFSLKINRLQIEDLGIYYC**LQ GYIPPRT**FGGGTKLELKR
66	VL 8D1 CDR-L1	Residues 24-34 of SEQ ID NO.:56	**QASQDIDNYLA**
67	VL 8D1 CDR-L2	Residues 50-56 of SEQ ID NO.:56	**GATNLAD**

SEQ ID No.	Protein region		Sequence
			123456789012345678901234567890
68	VL 8D1 CDR-L3	Residues 89-97 of SEQ ID NO.:56	LQGYIPPRT

The foregoing isolated anti-RGM A antibody CDR sequences establish a novel family of RGM A binding proteins, isolated in accordance with this invention. To generate and to select CDR's of the invention having preferred RGM A binding and/or neutralizing activity with respect to hRGM A, standard methods known in the art for generating binding proteins of the present invention and assessing the RGM A binding and/or neutralizing characteristics of those binding protein may be used, including but not limited to those specifically described herein.

4.2 Anti RGM A Chimeric antibodies

A chimeric antibody is a molecule in which different portions of the antibody are derived from different animal species, such as antibodies having a variable region derived from a murine monoclonal antibody and a human immunoglobulin constant region. Methods for producing chimeric antibodies are known in the art. See e.g., Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; U.S. Pat. Nos. 5,807,715; 4,816,567; and 4,816,397, which are incorporated herein by reference in their entireties. In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454 which are incorporated herein by reference in their entireties) by splicing genes from a mouse antibody molecule of appropriate antigen specificity together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used.

In one embodiment, the chimeric antibodies of the invention are produced by replacing the heavy chain constant region of the murine monoclonal anti human RGM A antibodies described herein with a human IgG1 constant region.

4.3 Anti RGM A CDR grafted antibodies

CDR-grafted antibodies of the invention comprise heavy and light chain variable region sequences from a human antibody wherein one or more of the CDR regions of V_H and/or V_L are replaced with CDR sequences of non- human, as for example murine antibodies of the invention. A framework sequence from any human antibody may serve as the template for CDR grafting. However, straight chain replacement onto such a framework often leads to some loss of binding affinity to the antigen. The more homologous a human antibody is to the original murine antibody, the less likely the possibility that combining the murine CDRs with the human framework will introduce distortions in the CDRs that could reduce affinity. Therefore, it is preferable that the human variable framework that is chosen to replace the murine variable framework apart from the CDRs have at least a 65% sequence identity with the murine antibody variable region framework. It is more preferable that the human and murine variable regions apart from the CDRs have at least 70% sequence identify. It is even more preferable that the human and murine variable regions apart from the CDRs have at least 75% sequence identity. It is most preferable that the human and murine variable regions apart from the CDRs have at least 80% sequence identity. Methods for producing CDR-grafted antibodies are known in the art (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); U.S. Pat. Nos. 5,225,539). In a specific embodiment the invention provides CDR grafted antibodies with V_H and/or V_L chains as described in Table 6.

TABLE 6: CDR GRAFTED ANTIBODIES

SEQ ID No.	Protein region	Sequence
		1234567890123456789012345678 90
35	**VH 5F9.1-GL**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
(15)	(VH3-48/JH3 FR1)	**NYGMN**WVRQAPGKGLEWVS**MIYYDSSEKHY**
(16)	(VH3-48/JH3 FR2)	**ADSVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDED
(17)	(VH3-48/JH3 FR3)	TAVYYCAR**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
(18)	(VH3-48/JH3 FR4)	
36	**VH 5F9.2-GL**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
(15)	(VH3-48/JH4 FR1)	**NYGMN**WVRQAPGKGLEWVS**MIYYDSSEKHY**
(16)	(VH3-48/JH4 FR2)	**ADSVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDED
(17)	(VH3-48/JH4 FR3)	TAVYYCAR**GTTPDY**WGQGTLVTVSS
(19)	(VH3-48/JH4 FR4)	

SEQ ID No.	Protein region	Sequence
		1234567890123456789012345678 90
37	**VH 5F9.3-GL**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
(15)	(VH3-48/JH6 FR1)	**NYGMN**WVRQAPGKGLEWVS**MIYYDSSEKHY**
(16)	(VH3-48/JH6 FR2)	**ADSVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDED
(17)	(VH3-48/JH6 FR3)	TAVYYCAR**GTTPDY**WGQGTTVTVSS
(20)	(VH3-48/JH6 FR4)	
38	**VH 5F9.4-GL**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
(21)	(VH3-33/JH3 FR1)	**NYGMN**WVRQAPGKGLEWVA**MIYYDSSEKHY**
(22)	(VH3-33/JH3 FR2)	**ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED
(23)	(VH3-33/JH3 FR3)	TAVYYCAR**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
(18)	(VH3-33/JH3 FR4)	
39	**VH 5F9.5-GL**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
(21)	(VH3-33/JH4 FR1)	**NYGMN**WVRQAPGKGLEWVA**MIYYDSSEKHY**
(22)	(VH3-33/JH4 FR2)	**ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED
(23)	(VH3-33/JH4 FR3)	TAVYYCAR**GTTPDY**WGQGTLVTVSS
(19)	(VH3-33/JH4 FR4)	
40	**VH 5F9.6-GL**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
(21)	(VH3-33/JH6 FR1)	**NYGMN**WVRQAPGKGLEWVA**MIYYDSSEKHY**
(22)	(VH3-33/JH6 FR2)	**ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED
(23)	(VH3-33/JH6 FR3)	TAVYYCAR**GTTPDY**WGQGTTVTVSS
(20)	(VH3-33/JH6 FR4)	
41	**VH 5F9.7-GL**	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
(24)	(VH3-23/JH3 FR1)	**NYGMN**WVRQAPGKGLEWVS**MIYYDSSEKHY**
(25)	(VH3-23/JH3 FR2)	**ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED
(26)	(VH3-23/JH3 FR3)	TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
(18)	(VH3-23/JH3 FR4)	
42	**VH 5F9.8-GL**	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
(24)	(VH3-23/JH4 FR1)	**NYGMN**WVRQAPGKGLEWVS**MIYYDSSEKHY**
(25)	(VH3-23/JH4 FR2)	**ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED
(26)	(VH3-23/JH4 FR3)	TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTLVTVSS
(19)	(VH3-23/JH4 FR4)	
43	**VH 5F9.9-GL**	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
(24)	(VH3-23/JH6 FR1)	**NYGMN**WVRQAPGKGLEWVS**MIYYDSSEKHY**
(25)	(VH3-23/JH6 FR2)	**ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED
(26)	(VH3-23/JH6 FR3)	TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTTVTVSS
(20)	(VH3-23/JH6 FR4)	
44	**VL 5F9.1-GL**	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC**RSSQSLE**
(27)	(A18/JK2 FR1)	**YSDGYTFLE**WYLQKPGQSPQLLIY**EVSNRF**
(28)	(A18/JK2 FR2)	**S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
(29)	(A18/JK2 FR3)	YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
(30)	(A18/JK2 FR4)	
45	**VL 5F9.2-GL**	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLE**
(31)	(A17/JK2 FR1)	**YSDGYTFLE**WFQQRPGQSPRRLIY**EVSNRF**
(32)	(A17/JK2 FR2)	**S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
(33)	(A17/JK2 FR3)	YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
(30)	(A17/JK2 FR4)	
46	**VL 5F9.3-GL**	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLE**
(31)	(A17/JK2 FR1)	**YSDGYTFLE**WYLQKPGQSPQLLIY**EVSNRF**
(28)	(A18/JK2 FR2)	**S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
(29)	(A18/JK2 FR3)	YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
(30)	(A18/JK2 FR4)	

CDR sequences derived from mAb 5F9 are stated in bold letters. reference is also made to the specific framework sequences (FR1 to FR4) by stating the corresponding SEQ ID Nos (see also Tables 3 and 4)

4.4 Anti RGM A Humanized antibodies

Humanized antibodies are antibody molecules from non-human species antibody that binds the desired antigen having one or more complementarity determining regions (CDRs) from the non-human species and framework regions from a human immunoglobulin molecule. Known human Ig sequences are disclosed, e.g., www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez- /query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH- 05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m-ikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html.www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.- html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html- ; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.acjp/.about.yasuhito-/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/lin- ks.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP- Start.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/linksl.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/pu- blic/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOsem-inar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/h-umanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html.Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), each entirely incorporated herein by reference. Such imported sequences can be used to reduce immunogenicity or reduce, enhance or modify binding, affinity, on-rate, off-rate, avidity, specificity, half-life, or any other suitable characteristic, as known in the art.

Framework residues in the human framework regions may be substituted with the corresponding residue from the CDR donor antibody to alter, preferably improve, antigen binding. These framework substitutions are identified by methods well known in the art, e.g., by modeling of the interactions of the CDR and framework residues to identify framework residues important for antigen binding and sequence comparison to identify unusual framework residues at particular positions. (See, e.g., Queen et al., U.S. Pat. No. 5,585,089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988), which are incorporated herein by reference in their entireties.) Three-dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, i.e., the analysis of residues that influence the ability of the candidate immunoglobulin to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the consensus and import sequences so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for the target antigen(s), is achieved. In general, the CDR residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding. Antibodies can be humanized using a variety of techniques known in the art, such as but not limited to those described in Jones et al., Nature 321:522 (1986); Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al. , PNAS 91:969-973 (1994); PCT publication WO 91/09967, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592,106; EP 519,596, EP 239,400, U.S. Pat. Nos. 5,565,332, 5,723,323, 5,976,862, 5,824,514, 5,817,483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5,714,352, 6,204,023, 6,180,370, 5,693,762, 5,530,101, 5,585,089, 5,225,539; 4,816,567, each entirely incorporated herein by reference, included references cited therein.

5. Further Embodiments of Antibodies of the Invention

5.1 Fusion Antibodies and Immunoadhesins

The present application also describes a fusion antibody or immunoadhesin that may be made which comprises all or a portion of a RGM A antibody of the present application linked to another polypeptide. In some embodiments, only the variable region of the RGM A antibody is linked to the polypeptide. In other embodiments, the VH domain of a RGM A antibody of this application is linked to a first polypeptide, while the VL domain of the antibody is linked to a second polypeptide that associates with the first polypeptide in a manner that permits the VH and VL domains to interact with one another to form an antibody binding site. In other embodiments, the VH domain is separated from the VL domain by a linker that permits the VH and VL domains to interact with one another (see below under Single Chain Antibodies). The VH -linker- VL antibody is then linked to a polypeptide of interest. The fusion antibody is useful to directing a polypeptide to a cell or tissue that expresses a RGM A. The polypeptide of interest may be a therapeutic agent, such as a toxin, or may be a diagnostic agent, such as an enzyme; that may be easily visualized, such as horseradish peroxidase. In addition, fusion antibodies can be created in which two (or more) single-chain antibodies are linked to one another. This is useful if one wants to create a divalent or polyvalent antibody on a single polypeptide chain, or if one wants to create a bispecific antibody.

One embodiment provides a labelled binding protein wherein an antibody or antibody portion of the present application is derivatized or linked to another functional molecule (e.g., another peptide or protein). For example, a labelled binding protein of the present application can be derived by functionally linking an antibody or antibody portion of the present application (by chemical coupling, genetic fusion, noncovalent association or otherwise) to one or more other molecular entities, such as a nucleic acid, another antibody (e.g., a bispecific antibody or a diabody), a detectable agent, a cytotoxic agent, a pharmaceutical agent, and/or a protein or peptide that can mediate association of the antibody or antibody portion with another molecule (such as a streptavidin core region or a polyhistidine tag).

Useful detectable agents with which an antibody or antibody portion of the present application may be derivatized include fluorescent compounds. Exemplary fluorescent detectable agents include fluorescein, fluorescein isothiocyanate,

rhodamine, 5-dimethylamine-1-napthalenesulfonyl chloride, phycoerythrin and the like. An antibody may also be derivatized with detectable enzymes, such as alkaline phosphatase, horseradish peroxidase, glucose oxidase and the like. When an antibody is derivatized with a detectable enzyme, it is detected by adding additional reagents that the enzyme uses to produce a detectable reaction product. For example, when the detectable agent horseradish peroxidase is present, the addition of hydrogen peroxide and diaminobenzidine leads to a colored reaction product, which is detectable. An antibody may also be derivatized with a nucleic acid, biotin, and detected through indirect measurement of avidin or streptavidin binding.

5.2 Single Chain Antibodies

The present application includes a single chain antibody (scFv) that binds an immunogenic RGM A of the invention. To produce the scFv, VH- and V-encoding DNA is operatively linked to DNA encoding a flexible linker, e.g., encoding the amino acid sequence (Gly4-Ser), such that the VH and VL sequences can be expressed as a contiguous single-chain protein, with the VL and VH regions joined by the flexible linker (see e.g., Bird et al. (1988) Science 242:423-42 6; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; McCafferty et al., 30 Nature (1990) 34 8: 552-554). The single chain antibody may be monovalent, if only a single VH and VL are used, bivalent, if two VH and VL are used, or polyvalent, if more than two VH and VL are used. Two of said scFv fragments coupled via a linker are called "diabody" which form is also encompassed by the invention.

5.3 Bispecific Antibodies

The present application further includes a bispecific antibody or antigen-binding fragment thereof in which one specificity is for an immunogenic RGM A polypeptide of the present application. For example, a bispecific antibody can be generated that specifically binds to an immunogenic RGM A polypeptide of the invention through one binding domain and to a second molecule through a second binding domainIn addition, a single chain antibody containing more than one VH and VL may be generated that binds specifically to an immunogenic polypeptide of the invention and to another molecule that is associated with attenuating myelin mediated growth cone collapse and inhibition of neurite outgrowth and sprouting. Such bispecific antibodies can be generated using techniques that are well known

for example, Fanger et al. Immunol Methods 4: 72-81 (1994) and Wright and Harris, 20 (supra).

In some embodiments, the bispecific antibodies are prepared using one or more of the variable regions from an antibody of the invention. In another embodiment, the bispecific antibody is prepared using one or more CDR regions from said antibody.

5.4 Derivatized and Labeled Antibodies

An antibody or an antigen- binding fragment of the present application can be derivatized or linked to another molecule (e.g., another peptide or protein). In general, the antibody or antigen-binding fragment is derivatized such that binding to an immunogenic polypeptide of the invention is not affected adversely by the derivatization or labeling.

For example, an antibody or antibody portion of the present application can be functionally linked (by chemical coupling, genetic fusion, noncovalent association or otherwise) to one or more other molecular entities, such as another antibody (e.g., a bispecific antibody or a diabody), a detection reagent, a cytotoxic agent, a pharmaceutical agent, and/or a protein or peptide that can mediate association of the antibody or antigen-binding fragment with another molecule (such as a streptavidin core region or a polyhistidine tag). Still further, an antibody or antigen-binding portion thereof may be part of a larger immunoadhesion molecule, formed by covalent or non-covalent association of the antibody or antibody portion with one or more other or different proteins or peptides. Examples of such immunoadhesion molecules include use of the streptavidin core region to make a tetrameric scFv molecule (Kipriyanov et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) and use of a cysteine residue, a marker peptide and a C-terminal polyhistidine tag to make bivalent and biotinylated scFv molecules (Kipriyanov et al. (1994) Molecular Immunology 31:1047-1058). Antibody portions, such as Fab and $F(ab')_2$ fragments, can be prepared from whole antibodies using conventional techniques, such as papain or pepsin digestion, respectively, of whole antibodies. Moreover, antibodies, antibody portions and immunoadhesion molecules can be obtained using standard recombinant DNA techniques.

A derivatized antibody may be produced by crosslinking two or more antibodies (of the same type or of different types, e. g., to create bispecific antibodies). Suitable crosslinkers include those that are heterobifunctional, having two distinctly reactive groups separated by an appropriate spacer (e.g. m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester) or homobifunctional (e.g., disuccinimidyl suberate). Such linkers are available from Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.

A derivatized antibody may also be a labeled antibody. For instance, detection agents with which an antibody or antibody portion of the invention may be derivatized are fluorescent compounds, including fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, 5-dimethylamine-l-napthalenesulfonyl chloride, phycoerythrin, lanthanide phosphors and the like. An antibody also may be labeled with enzymes that are useful for detection, such as horseradish peroxidase, galactosidase, luciferase, alkaline phosphatase, glucoseoxidase and the like. In embodiments that are labeled with a detectable enzyme, the antibody is detected by adding additional reagents that the enzyme uses to produce a detectable reaction product. For example, horseradish peroxidase with hydrogen peroxide and diaminobenzidine. An antibody also may be labeled with biotin, and detected through indirect measurement of avidin or streptavidin binding. An antibody may also be labeled with a predetermined polypeptide epitope recognized by a secondary reporter (e. g., leucine zipper pair sequences, binding sites for secondary antibodies, metal binding domains, epitope: tags). An RGM A antibody or an antigen fragment thereof also may be labeled with a radio-labeled amino acid. The radiolabel may be used for both diagnostic and therapeutic purposes. The radio-labeled RGM A antibody may be used diagnostically, for example, for determining RGM A receptor levels in a subject. Further, the radio-labeled RGM A antibody may be used therapeutically for treating spinal cord injury.

Examples of labels for polypeptides include, but are not limited to, the following radioisotopes or radionucleotides ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, ^{153}Sm. A RGM A antibody or an antigen fragment thereof may also be derivatized with a chemical group such as polyethylene glycol (PEG), a methyl or ethyl group, or a carbohydrate group. These groups may be useful to improve the biological characteristics of the antibody, e.g., to increase serum half-life or to increase tissue binding. Also, a label for polypeptides can include a nucleic acid, for

example DNA for detection by PCR, or enhancing gene expression, or siRNA to suppress gene expression in RGM A-bearing cells or tissues.

The class and subclass of RGM A antibodies may be determined by any method known in the art. In general, the class and subclass of an antibody may be determined using antibodies that are specific for a particular class and subclass of antibody. Such antibodies are available commercially. The class and subclass can be determined by ELISA, Western Blot as well as other techniques. Alternatively, the class and subclass may be determined by sequencing all or a portion of the constant domains of the heavy and/or light chains of the antibodies, comparing their amino acid sequences to the known amino acid sequences of various classes and subclasses of immunoglobulins, and determining the class and subclass of the antibodies.

5.5 Dual Variable Domain Immunoglobulins

Dual variable domain (DVD) binding proteins or immunoglobulins as used herein, are binding proteins that comprise two or more antigen binding sites and are multivalent binding proteins, as for example divalent and tetravalent. The term "multivalent binding protein" is used in this specification to denote a binding protein comprising two or more antigen binding sites. The multivalent binding protein is preferably engineered to have the two or more antigen binding sites, and is generally not a naturally occurring antibody. The term "multispecific binding protein" refers to a binding protein capable of binding two or more related or unrelated targets. Such DVDs may be monospecific, i.e capable of binding one antigen or multispecific, i.e. capable of binding two or more antigens. DVD binding proteins comprising two heavy chain DVD polypeptides and two light chain DVD polypeptides are referred to a DVD Ig. Each half of a DVD Ig comprises a heavy chain DVD polypeptide, and a light chain DVD polypeptide, and two antigen binding sites. Each binding site comprises a heavy chain variable domain and a light chain variable domain with a total of 6 CDRs involved in antigen binding per antigen binding site. DVD binding proteins and methods of making DVD binding proteins are disclosed in US. Patent Application No. 11/507,050 and incorporated herein by reference. It is intended that the present invention comprises a DVD binding protein comprising binding proteins capable of binding RGM A. Preferably the DVD binding protein is capable of binding RGM A and a second target. The second target is selected from the group

consisting of anti inflammatory MAB activities (IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12,IL-17, IL-18, IL-23,TNF alpha/beta, IFN-beta, gamma, LIF, OSM, CNTF, PF-4, Platelet basic protein (PBP), NAP-2, beta-TG, MIP-1, MCP2/3, RANTES, lymphotactin), of transport-mediating proteins (insulin receptor, transferrin receptor, thrombin receptor, leptin receptor, LDL receptor), of other neuroregenerative MABs (NgR, Lingo, p75, CSPG (e.g. NG-2, neurocan, brevican, versican, aggrecan) hyaluronic acid, mAG, tenascin, NI-35, NI-250, IMP, perlecan, neurocan, phosphacan, nogo-A, OMGP, Sema4D, Sema 3A, ephrin B3, ephrin A2, ephrin A5, MAG, EphA4,plexin B1, TROY, wnts, ryk rec., BMP-2, BMP-4, BMP-7), of neuroprotective MAB activities(EGF, EGFR, Sema 3), of anti-amyloid beta MABs (e.g. m266, 3D6 (bapineuzumab), anti-globulomer MABs 7C6), of CNS located receptors and transporters (serotonin receptors, dopamine receptors, DAT, Asc-1, GlyT1).

5.6 Dual-specific antibodies

The present application also describes "dual-specific antibody" technology. Dual-specific antibodies may serve as agonists, antagonists, or both in different combinations. Dual-specific antibodies are antibodies in which the VH chain binds to a first antigen and the VL chain binds to another antigen as exemplified in WO2008082651.

5.7 Crystallized Antibodies

Another embodiment of the present application provides a crystallized binding protein. The term "crystallized" as used herein, refer to an antibody, or antigen binding portion thereof, that exists in the form of a crystal. Crystals are one form of the solid state of matter, which is distinct from other forms such as the amorphous solid state or the liquid crystalline state. Crystals are composed of regular, repeating, three-dimensional arrays of atoms, ions, molecules (e.g., proteins such as antibodies), or molecular assemblies (e.g., antigen/antibody complexes). These three-dimensional arrays are arranged according to specific mathematical relationships that are well understood in the field. The fundamental unit, or building block, that is repeated in a crystal is called the asymmetric unit. Repetition of the asymmetric unit in an arrangement that conforms to a given, well-defined crystallographic symmetry provides the "unit cell" of the crystal. Repetition of the unit cell by regular translations in all three dimensions provides the crystal.

See Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ed., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999).

Preferably the present application describes crystals of whole RGM A antibodies and fragments thereof as disclosed herein, and formulations and compositions comprising such crystals. In one embodiment the crystallized binding protein has a greater half-life in vivo than the soluble counterpart of the binding protein. In another embodiment the binding protein retains biological activity after crystallization.

Crystallized binding protein of the invention may be produced according methods known in the art and as disclosed in WO 02072636, incorporated herein by reference.

5.8 Glycosylated Antibodies

Another embodiment of the invention provides a glycosylated binding protein wherein the antibody or antigen-binding portion thereof comprises one or more carbohydrate residues. Nascent *in vivo* protein production may undergo further processing, known as post-translational modification. In particular, sugar (glycosyl) residues may be added enzymatically, a process known as glycosylation. The resulting proteins bearing covalently linked oligosaccharide side chains are known as glycosylated proteins or glycoproteins. Antibodies are glycoproteins with one or more carbohydrate residues in the Fc domain, as well as the variable domain. Carbohydrate residues in the Fc domain have important effect on the effector function of the Fc domain, with minimal effect on antigen binding or half-life of the antibody (R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* **21** (2005), pp. 11–16). In contrast, glycosylation of the variable domain may have an effect on the antigen binding activity of the antibody. Glycosylation in the variable domain may have a negative effect on antibody binding affinity, likely due to steric hindrance (Co, M.S., et al., Mol. Immunol. (1993) 30:1361- 1367), or result in increased affinity for the antigen (Wallick, S.C., et al., Exp. Med. (1988) 168:1099-1109; Wright, A., et al., EMBO J. (1991) 10:2717 2723).

One aspect of the present invention is directed to generating glycosylation site mutants in which the O- or N-linked glycosylation site of the binding protein has been mutated. One skilled in the art can generate such mutants using standard well-

known technologies. Glycosylation site mutants that retain the biological activity but have increased or decreased binding activity are another object of the present invention.

In still another embodiment, the glycosylation of the antibody or antigen-binding portion of the invention is modified. For example, an aglycoslated antibody can be made (i.e., the antibody lacks glycosylation). Glycosylation can be altered to, for example, increase the affinity of the antibody for antigen. Such carbohydrate modifications can be accomplished by, for example, altering one or more sites of glycosylation within the antibody sequence. For example, one or more amino acid substitutions can be made that result in elimination of one or more variable region glycosylation sites to thereby eliminate glycosylation at that site. Such aglycosylation may increase the affinity of the antibody for antigen. Such an approach is described in further detail in PCT Publication WO2003016466A2, and U.S. Pat. Nos. 5,714,350 and 6,350,861, each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

Additionally or alternatively, a modified antibody of the invention can be made that has an altered type of glycosylation, such as a hypofucosylated antibody having reduced amounts of fucosyl residues or an antibody having increased bisecting GlcNAc structures. Such altered glycosylation patterns have been demonstrated to increase the ADCC ability of antibodies. Such carbohydrate modifications can be accomplished by, for example, expressing the antibody in a host cell with altered glycosylation machinery. Cells with altered glycosylation machinery have been described in the art and can be used as host cells in which to express recombinant antibodies of the invention to thereby produce an antibody with altered glycosylation. See, for example, Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, as well as, European Patent No: EP 1,176,195; PCT Publications WO 03/035835; WO 99/54342 80, each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

Protein glycosylation depends on the amino acid sequence of the protein of interest, as well as the host cell in which the protein is expressed. Different organisms may produce different glycosylation enzymes (eg., glycosyltransferases and glycosidases), and have different substrates (nucleotide sugars) available. Due to such factors, protein glycosylation pattern, and composition of glycosyl residues, may differ depending on the host system in which the particular protein is expressed. Glycosyl residues useful in the invention may include, but are not limited to, glucose,

galactose, mannose, fucose, n-acetylglucosamine and sialic acid. Preferably the glycosylated binding protein comprises glycosyl residues such that the glycosylation pattern is human.

It is known to those skilled in the art that differing protein glycosylation may result in differing protein characteristics. For instance, the efficacy of a therapeutic protein produced in a microorganism host, such as yeast, and glycosylated utilizing the yeast endogenous pathway may be reduced compared to that of the same protein expressed in a mammalian cell, such as a CHO cell line. Such glycoproteins may also be immunogenic in humans and show reduced half-life *in vivo* after administration. Specific receptors in humans and other animals may recognize specific glycosyl residues and promote the rapid clearance of the protein from the bloodstream. Other adverse effects may include changes in protein folding, solubility, susceptibility to proteases, trafficking, transport, compartmentalization, secretion, recognition by other proteins or factors, antigenicity, or allergenicity. Accordingly, a practitioner may prefer a therapeutic protein with a specific composition and pattern of glycosylation, for example glycosylation composition and pattern identical, or at least similar, to that produced in human cells or in the species-specific cells of the intended subject animal.

Expressing glycosylated proteins different from that of a host cell may be achieved by genetically modifying the host cell to express heterologous glycosylation enzymes. Using techniques known in the art a practitioner may generate antibodies or antigen-binding portions thereof exhibiting human protein glycosylation. For example, yeast strains have been genetically modified to express non-naturally occurring glycosylation enzymes such that glycosylated proteins (glycoproteins) produced in these yeast strains exhibit protein glycosylation identical to that of animal cells, especially human cells (U.S patent applications 20040018590 and 20020137134 and PCT publication WO2005100584 A2).

Further, it will be appreciated by one skilled in the art that a protein of interest may be expressed using a library of host cells genetically engineered to express various glycosylation enzymes, such that member host cells of the library produce the protein of interest with variant glycosylation patterns. A practitioner may then select and isolate the protein of interest with particular novel glycosylation patterns. Preferably, the protein having a particularly selected novel glycosylation pattern exhibits improved or altered biological properties

5.9 Anti-idiotypic antibodies

In addition to the binding proteins, the present invention is also directed to an anti-idiotypic (anti-Id) antibody specific for such binding proteins of the invention. An anti-Id antibody is an antibody, which recognizes unique determinants generally associated with the antigen-binding region of another antibody. The anti-Id can be prepared by immunizing an animal with the binding protein or a CDR containing region thereof. The immunized animal will recognize, and respond to the idiotypic determinants of the immunizing antibody and produce an anti-Id antibody. The anti-Id antibody may also be used as an "immunogen" to induce an immune response in yet another animal, producing a so-called anti-anti-Id antibody.

6. Uses of the Antibodies

Given their ability to bind to human RGM A, the neutralizing antibodies of the present application, or portions thereof, can be used to detect human RGM A (e.g., in a biological sample, such as serum or plasma), using a conventional immunoassay, such as an enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), a radioimmunoassay (RIA) or tissue immunohistochemistry. The present application provides a method for detecting human RGM A in a biological sample comprising contacting a biological sample with an antibody, or antibody portion, of the invention and detecting either the antibody (or antibody portion) bound to human RGM A or unbound antibody (or antibody portion), to thereby detect human RGM A in the biological sample. The antibody is directly or indirectly labeled with a detectable substance to facilitate detection of the bound or unbound antibody. Suitable detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, beta-galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; and examples of suitable radioactive material include ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, ^{153}Sm.

The antibodies and antibody portions of the present application preferably are capable of neutralizing human RGM A activity both *in vitro* and *in vivo*. Accordingly, such antibodies and antibody portions of the invention can be used to inhibit RGM A binding to its receptor Neogenin, to BMP-2, and or BM-4, and therefore inhibit the resulting activity.

In another embodiment, the present application provides a method for reducing RMG A activity in a subject, advantageously from a subject suffering from a disease or disorder in which RGM A resulting activity is detrimental. The present application provides methods for reducing RGM A activity in a subject suffering from such a disease or disorder, by preventing RGM A binding to Neogenin, and/or BMP-2, and/or BMP-4, through the use of the monoclonal antibodies of the present application. The antibodies of the present application, in particular the humanized antibodies disclosed herein, can be administered to a human subject for therapeutic purposes. Moreover, the antibodies of the present application can be administered to a non-human mammal expressing an RGM A with which the antibody is capable of binding for veterinary purposes or as an animal model of human disease. Regarding the latter, such animal models may be useful for evaluating the therapeutic efficacy of antibodies of the invention (e.g., testing of dosages and time courses of administration).

As used herein, the term "a disorder in which RGM A activity is detrimental" is intended to include diseases and other disorders in which the presence of RGM A or its resulting activity in a subject suffering from the disorder has been shown to be or is suspected of being either responsible for the pathophysiology of the disorder or a factor that contributes to a worsening of the disorder. Accordingly, a disorder in which RGM A activity is detrimental is a disorder in which reduction of RGM A activity is expected to alleviate the symptoms and/or progression of the disorder. Non-limiting examples of disorders that can be treated with the antibodies of the invention include those disorders discussed in the section below pertaining to pharmaceutical compositions of the antibodies of the invention.

It is recognized that RGM A plays an important role in the pathology associated with a variety of diseases involving neurological diseases associated with neurodegeneration or inhibition of neuroregenerative processes, resulting in paralysis. This includes dementia, senile dementia, mild cognitive impairment, Alzheimer-related dementia, Huntington's chorea, tardive dyskinesia, hyperkinesias,

manias, Morbus Parkinson, Steel-Richard syndrome, Down's syndrome, myasthenia gravis, nerve trauma, vascular amyloidosis, cerebral hemorrhage I with amyloidosis, brain inflammation, Friedrich's ataxia, acute confusion disorder, glaucoma, Alzheimer's disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis, Brachial Plexus Injury, Brain Injury, including traumatic brain injury, Cerebral Palsy, Guillain Barre, Leukodystrophies, Multiple Sclerosis, Post Polio, Spina Bifida, Spinal Cord Injury, Spinal Muscle Atrophy, Spinal Tumors, Stroke, and Transverse Myelitis.

Also, as previously discussed, DVD immunoglobulins, or dual-specific antibodies between any one of the partners described above may be of use. Such antibody preparations as described above may be useful for the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, spinal cord injury, traumatic brain injury, multiple sclerosis, peripheral nerve injury, schizophrenia, depression, anxiety, as well as any plasticity and neurite growth and neurotoxicity related disease cited above.

The antibodies of the present application may also be combined with peptides allowing the trans-membrane transfer to include targeting of intracellular target proteins. Such peptide sequences may include, but are not limited to, tat, antennapedia, poly-arginins, some anti-microbial peptides. Such peptides may allow transfer through membranes, including cellular plasma membranes, but also epithelia and endothelial membranes, including the blood-brain-barrier, gut mucosa, meninges, and others.

An antibody, or antibody portion, of the present application also can be administered with one or more additional small molecule therapeutic agents useful in the treatment of disorders in which RGM A activity is involved as discussed in the foregoing paragraphs. It should be understood that the antibodies of the present application or antigen binding portion thereof can be used alone or in combination with an additional agent, e.g., a therapeutic agent, said additional agent being selected by the skilled artisan for its intended purpose. For example, the additional agent can be a therapeutic agent art-recognized as being useful to treat the disease or condition being treated by the antibody of the present invention. The additional agent also can be an agent that imparts a beneficial attribute to the therapeutic composition e.g., an agent that affects the viscosity of the composition.

7. Pharmaceutical Compositions

The invention also provides pharmaceutical compositions comprising an antibody, or antigen-binding portion thereof, of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier. The pharmaceutical compositions comprising antibodies of the invention are for use in, but not limited to, diagnosing, detecting, or monitoring a disorder, in preventing, treating, managing, or ameliorating of a disorder or one or more symptoms thereof, and/or in research. In a specific embodiment, a composition comprises one or more antibodies of the invention. In another embodiment, the pharmaceutical composition comprises one or more antibodies of the invention and one or more prophylactic or therapeutic agents other than antibodies of the invention for treating a disorder in which RGM A activity is detrimental. Preferably, the prophylactic or therapeutic agents known to be useful for or having been or currently being used in the prevention, treatment, management, or amelioration of a disorder or one or more symptoms thereof. In accordance with these embodiments, the composition may further comprise of a carrier, diluent or excipient.

The antibodies and antibody-portions of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions suitable for administration to a subject. Typically, the pharmaceutical composition comprises an antibody or antibody portion of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier. As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically compatible. Examples of pharmaceutically acceptable carriers include one or more of water, saline, phosphate buffered saline, dextrose, glycerol, ethanol and the like, as well as combinations thereof. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, or sodium chloride in the composition. Pharmaceutically acceptable carriers may further comprise minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, preservatives or buffers, which enhance the shelf life or effectiveness of the antibody or antibody portion.

Various delivery systems are known and can be used to administer one or more antibodies of the invention or the combination of one or more antibodies of the invention and a prophylactic agent or therapeutic agent useful for preventing, managing, treating, or ameliorating a disorder or one or more symptoms thereof,

e.g., encapsulation in liposomes, microparticles, microcapsules, recombinant cells capable of expressing the antibody or antibody fragment, receptor- mediated endocytosis (see, e. g., Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), construction of a nucleic acid as part of a retroviral or other vector, etc. Methods of administering a prophylactic or therapeutic agent of the invention include, but are not limited to, parenteral administration (e.g., intradermal, intramuscular, intraperitoneal, intravenous and subcutaneous), epidural administration, intratumoral administration, and mucosal adminsitration (e.g., intranasal and oral routes). In addition, pulmonary administration can be employed, e.g., by use of an inhaler or nebulizer, and formulation with an aerosolizing agent. See, e.g., U.S. Pat. Nos. 6, 019,968, 5,985, 320, 5,985,309, 5,934, 272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290, 540, and 4,880,078; and PCT Publication Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, and WO 99/66903, each of which is incorporated herein by reference their entireties. In one embodiment, an antibody of the invention, combination therapy, or a composition of the invention is administered using Alkermes AIR® pulmonary drug delivery technology (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.). In a specific embodiment, prophylactic or therapeutic agents of the invention are administered intramuscularly, intravenously, intratumorally, orally, intranasally, pulmonary, or subcutaneously. The prophylactic or therapeutic agents may be administered by any convenient route, for example by infusion or bolus injection, by absorption through epithelial or mucocutaneous linings (e.g. , oral mucosa, rectal and intestinal mucosa, etc.) and may be administered together with other biologically active agents. Administration can be systemic or local.

In a specific embodiment, it may be desirable to administer the prophylactic or therapeutic agents of the invention locally to the area in need of treatment; this may be achieved by, for example, and not by way of limitation, local infusion, by injection, or by means of an implant, said implant being of a porous or non-porous material, including membranes and matrices, such as sialastic membranes, polymers, fibrous matrices (e.g., Tisseel®), or collagen matrices. In one embodiment, an effective amount of one or more antibodies of the invention antagonists is administered locally to the affected area to a subject to prevent, treat, manage, and/or ameliorate a disorder or a symptom thereof. In another embodiment, an effective amount of one or more antibodies of the invention is administered locally to the affected area in combination with an effective amount of one or more therapies (e. g., one or more

prophylactic or therapeutic agents) other than an antibody of the invention of a subject to prevent, treat, manage, and/or ameliorate a disorder or one or more symptoms thereof.

In another embodiment, the prophylactic or therapeutic agent can be delivered in a controlled release or sustained release system. In one embodiment, a pump may be used to achieve controlled or sustained release (see 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). In another embodiment, polymeric materials can be used to achieve controlled or sustained release of the therapies of the invention (see e.g., Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; see also Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7 1:105); U.S. Pat. No. 5,679,377; U.S. Pat. No. 5, 916,597; U. S. Pat. No. 5,912,015; U.S. Pat. No. 5,989,463; U.S. Pat. No. 5,128,326; PCT Publication No. WO 99/15154; and PCT Publication No. WO 99/20253. Examples of polymers used in sustained release formulations include, but are not limited to, poly(2-hydroxy ethyl methacrylate), poly(methyl methacrylate), poly(acrylic acid), poly(ethylene-co-vinyl acetate), poly(methacrylic acid), polyglycolides (PLG), polyanhydrides, poly(N- vinyl pyrrolidone), poly(vinyl alcohol), polyacrylamide, poly(ethylene glycol), polylactides (PLA), poly(lactide-co-glycolides) (PLGA), and polyorthoesters. In a preferred embodiment, the polymer used in a sustained release formulation is inert, free of leachable impurities, stable on storage, sterile, and biodegradable. In yet another embodiment, a controlled or sustained release system can be placed in proximity of the prophylactic or therapeutic target, thus requiring only a fraction of the systemic dose (see, e.g., Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Controlled release systems are discussed in the review by Langer (1990, Science 249:1527-1533). Any technique known to one of skill in the art can be used to produce sustained release formulations comprising one or more therapeutic agents of the invention. See, e.g., U. S. Pat. No. 4,526, 938, PCT publication WO 91/05548, PCT publication WO 96/20698, Ning et al. , 1996, "Intratumoral

Radioimmunotheraphy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy &Oncology 39:179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long- Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science &Technology 50:372-397, Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, and Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759- 760, each of which is incorporated herein by reference in their entireties.

In a specific embodiment, where the composition of the invention is a nucleic acid encoding a prophylactic or therapeutic agent, the nucleic acid can be administered in vivo to promote expression of its encoded prophylactic or therapeutic agent, by constructing it as part of an appropriate nucleic acid expression vector and administering it so that it becomes intracellular, e.g., by use of a retroviral vector (see U. S. Pat. No. 4,980,286), or by direct injection, or by use of microparticle bombardment (e.g., a gene gun; Biolistic, Dupont), or coating with lipids or cell-surface receptors or transfecting agents, or by administering it in linkage to a homeobox-like peptide which is known to enter the nucleus (see, e.g., Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868). Alternatively, a nucleic acid can be introduced intracellularly and incorporated within host cell DNA for expression by homologous recombination.

A pharmaceutical composition of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of routes of administration include, but are not limited to, parenteral, e.g., intravenous, intradermal, subcutaneous, oral, intranasal (e.g., inhalation), transdermal (e.g., topical), transmucosal, and rectal administration. In a specific embodiment, the composition is formulated in accordance with routine procedures as a pharmaceutical composition adapted for intravenous, subcutaneous, intramuscular, oral, intranasal, or topical administration to human beings. Typically, compositions for intravenous administration are solutions in sterile isotonic aqueous buffer. Where necessary, the composition may also include a solubilizing agent and a local anesthetic such as lignocamne to ease pain at the site of the injection.

If the compositions of the invention are to be administered topically, the compositions can be formulated in the form of an ointment, cream, transdermal

patch, lotion, gel, shampoo, spray, aerosol, solution, emulsion, or other form well known to one of skill in the art. See, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). For non- sprayable topical dosage forms, viscous to semi-solid or solid forms comprising a carrier or one or more excipients compatible with topical application and having a dynamic viscosity preferably greater than water are typically employed. Suitable formulations include, without limitation, solutions, suspensions, emulsions, creams, ointments, powders, liniments, salves, and the like, which are, if desired, sterilized or mixed with auxiliary agents (e.g., preservatives, stabilizers, wetting agents, buffers, or salts) for influencing various properties, such as, for example, osmotic pressure. Other suitable topical dosage forms include sprayable aerosol preparations wherein the active ingredient, preferably in combination with a solid or liquid inert carrier, is packaged in a mixture with a pressurized volatile (e.g., a gaseous propellant, such as freon) or in a squeeze bottle. Moisturizers or humectants can also be added to pharmaceutical compositions and dosage forms if desired. Examples of such additional ingredients are well known in the art.

If the method of the invention comprises intranasal administration of a composition, the composition can be formulated in an aerosol form, spray, mist or in the form of drops. In particular, prophylactic or therapeutic agents for use according to the present invention can be conveniently delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebuliser, with the use of a suitable propellant (e.g., dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichloro-tetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas). In the case of a pressurized aerosol the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges (composed of, e.g., gelatin) for use in an inhaler or insufflator may be formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch.

If the method of the invention comprises oral administration, compositions can be formulated orally in the form of tablets, capsules, cachets, gelcaps, solutions, suspensions, and the like. Tablets or capsules can be prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable excipients such as binding agents (e.g., pregelatinised maize starch, polyvinylpyrrolidone, or hydroxypropyl methylcellulose); fillers (e.g., lactose, microcrystalline cellulose, or calcium hydrogen phosphate) ; lubricants (e.g., magnesium stearate, talc, or silica); disintegrants (e.g., potato starch

or sodium starch glycolate) ; or wetting agents (e.g., sodium lauryl sulphate). The tablets may be coated by methods well-known in the art. Liquid preparations for oral administration may take the form of, but not limited to, solutions, syrups or suspensions, or they may be presented as a dry product for constitution with water or other suitable vehicle before use. Such liquid preparations may be prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable additives such as suspending agents (e.g., sorbitol syrup, cellulose derivatives, or hydrogenated edible fats); emulsifying agents (e.g., lecithin or acacia); non-aqueous vehicles (e.g., almond oil, oily esters, ethyl alcohol, or fractionated vegetable oils); and preservatives (e.g., methyl or propyl-p- hydroxybenzoates or sorbic acid). The preparations may also contain buffer salts, flavoring, coloring, and sweetening agents as appropriate. Preparations for oral administration may be suitably formulated for slow release, controlled release, or sustained release of a prophylactic or therapeutic agent(s).

The method of the invention may comprise pulmonary administration, e.g., by use of an inhaler or nebulizer, of a composition formulated with an aerosolizing agent. See, e.g., U.S. Pat. Nos. 6,019, 968, 5,985, 320, 5, 985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540, and 4,880,078; and PCT Publication Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, and WO 99/66903, each of which is incorporated herein by reference their entireties. In a specific embodiment, an antibody of the invention, combination therapy, and/or composition of the invention is administered using Alkermes AIR® pulmonary drug delivery technology (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

The method of the invention may comprise administration of a composition formulated for parenteral administration by injection (e. g., by bolus injection or continuous infusion). Formulations for injection may be presented in unit dosage form (e.g., in ampoules or in multi-dose containers) with an added preservative. The compositions may take such forms as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and may contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents. Alternatively, the active ingredient may be in powder form for constitution with a suitable vehicle (e.g., sterile pyrogen-free water) before use. The methods of the invention may additionally comprise of administration of compositions formulated as depot preparations. Such long acting formulations may be administered by implantation (e.g., subcutaneously or intramuscularly) or by intramuscular injection. Thus, for example, the compositions

may be formulated with suitable polymeric or hydrophobic materials (e.g., as an emulsion in an acceptable oil) or ion exchange resins, or as sparingly soluble derivatives (e.g., as a sparingly soluble salt).

The methods of the invention encompass administration of compositions formulated as neutral or salt forms. Pharmaceutically acceptable salts include those formed with anions such as those derived from hydrochloric, phosphoric, acetic, oxalic, tartaric acids, etc., and those formed with cations such as those derived from sodium, potassium, ammonium, calcium, ferric hydroxides, isopropylamine, triethylamine, 2- ethylamino ethanol, histidine, procaine, etc.

Generally, the ingredients of compositions are supplied either separately or mixed together in unit dosage form, for example, as a dry lyophilized powder or water free concentrate in a hermetically sealed container such as an ampoule or sachette indicating the quantity of active agent. Where the mode of administration is infusion, composition can be dispensed with an infusion bottle containing sterile pharmaceutical grade water or saline. Where the mode of administration is by injection, an ampoule of sterile water for injection or saline can be provided so that the ingredients may be mixed prior to administration.

In particular, the invention also provides that one or more of the prophylactic or therapeutic agents, or pharmaceutical compositions of the invention is packaged in a hermetically sealed container such as an ampoule or sachette indicating the quantity of the agent. In one embodiment, one or more of the prophylactic or therapeutic agents, or pharmaceutical compositions of the invention is supplied as a dry sterilized lyophilized powder or water free concentrate in a hermetically sealed container and can be reconstituted (e.g., with water or saline) to the appropriate concentration for administration to a subject. Preferably, one or more of the prophylactic or therapeutic agents or pharmaceutical compositions of the invention is supplied as a dry sterile lyophilized powder in a hermetically sealed container at a unit dosage of at least 5 mg, more preferably at least 10 mg, at least 15 mg, at least 25 mg, at least 35 mg, at least 45 mg, at least 50 mg, at least 75 mg, or at least 100 mg. The lyophilized prophylactic or therapeutic agents or pharmaceutical compositions of the invention should be stored at between 2° C. and 8° C. in its original container and the prophylactic or therapeutic agents, or pharmaceutical compositions of the invention should be administered within 1 week, preferably within 5 days, within 72 hours, within 48 hours, within 24 hours, within 12 hours,

within 6 hours, within 5 hours, within 3 hours, or within 1 hour after being reconstituted. In an alternative embodiment, one or more of the prophylactic or therapeutic agents or pharmaceutical compositions of the invention is supplied in liquid form in a hermetically sealed container indicating the quantity and concentration of the agent. Preferably, the liquid form of the administered composition is supplied in a hermetically sealed container at least 0.25 mg/ml, more preferably at least 0.5 mg/ml, at least 1 mg/ml, at least 2.5 mg/ml, at least 5 mg/ml, at least 8 mg/ml, at least 10 mg/ml, at least 15 mg/kg, at least 25 mg/ml, at least 50 mg/ml, at least 75 mg/ml or at least 100 mg/ml. The liquid form should be stored at between 2° C. and 8° C. in its original container.

The antibodies and antibody-portions of the invention can be incorporated into a pharmaceutical composition suitable for parenteral administration. Preferably, the antibody or antibody-portions will be prepared as an injectable solution containing 0.1-250 mg/ml antibody. The injectable solution can be composed of either a liquid or lyophilized dosage form in a flint or amber vial, ampule or pre-filled syringe. The buffer can be L-histidine (1-50 mM), optimally 5-10mM, at pH 5.0 to 7.0 (optimally pH 6.0). Other suitable buffers include but are not limited to, sodium succinate, sodium citrate, sodium phosphate or potassium phosphate. Sodium chloride can be used to modify the toxicity of the solution at a concentration of 0-300 mM (optimally 150 mM for a liquid dosage form). Cryoprotectants can be included for a lyophilized dosage form, principally 0-10% sucrose (optimally 0.5-1.0%). Other suitable cryoprotectants include trehalose and lactose. Bulking agents can be included for a lyophilized dosage form, principally 1-10% mannitol (optimally 2-4%). Stabilizers can be used in both liquid and lyophilized dosage forms, principally 1-50 mM L-Methionine (optimally 5-10 mM). Other suitable bulking agents include glycine, arginine, can be included as 0-0.05% polysorbate-80 (optimally 0.005-0.01%). Additional surfactants include but are not limited to polysorbate 20 and BRIJ surfactants. The pharmaceutical composition comprising the antibodies and antibody-portions of the invention prepared as an injectable solution for parenteral administration, can further comprise an agent useful as an adjuvant, such as those used to increase the absorption, or dispersion of a therapeutic protein (e.g., antibody). A particularly useful adjuvant is hyaluronidase, such as Hylenex® (recombinant human hyaluronidase). Addition of hyaluronidase in the injectable solution improves human bioavailability following parenteral administration, particularly subcutaneous

administration. It also allows for greater injection site volumes (i.e. greater than 1 ml) with less pain and discomfort, and minimum incidence of injection site reactions. (see WO2004078140, US2006104968 incorporated herein by reference).

The compositions of this invention may be in a variety of forms. These include, for example, liquid, semi-solid and solid dosage forms, such as liquid solutions (*e.g.*, injectable and infusible solutions), dispersions or suspensions, tablets, pills, powders, liposomes and suppositories. The preferred form depends on the intended mode of administration and therapeutic application. Typical preferred compositions are in the form of injectable or infusible solutions, such as compositions similar to those used for passive immunization of humans with other antibodies. The preferred mode of administration is parenteral (*e.g.*, intravenous, subcutaneous, intraperitoneal, intramuscular). In a preferred embodiment, the antibody is administered by intravenous infusion or injection. In another preferred embodiment, the antibody is administered by intramuscular or subcutaneous injection.

Therapeutic compositions typically must be sterile and stable under the conditions of manufacture and storage. The composition can be formulated as a solution, microemulsion, dispersion, liposome, or other ordered structure suitable to high drug concentration. Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound (*i.e.*, antibody or antibody portion) in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile, lyophilized powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and spray-drying that yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof. The proper fluidity of a solution can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prolonged absorption of injectable compositions can be brought about by including, in the composition, an agent that delays absorption, for example, monostearate salts and gelatin.

The antibodies and antibody-portions of the present invention can be administered by a variety of methods known in the art, although for many therapeutic applications, the preferred route/mode of administration is subcutaneous injection, intravenous injection or infusion. As will be appreciated by the skilled artisan, the route and/or mode of administration will vary depending upon the desired results. In certain embodiments, the active compound may be prepared with a carrier that will protect the compound against rapid release, such as a controlled release formulation, including implants, transdermal patches, and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Many methods for the preparation of such formulations are patented or generally known to those skilled in the art. See, *e.g.*, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

In certain embodiments, an antibody or antibody portion of the invention may be orally administered, for example, with an inert diluent or an assimilable edible carrier. The compound (and other ingredients, if desired) may also be enclosed in a hard or soft shell gelatin capsule, compressed into tablets, or incorporated directly into the subject's diet. For oral therapeutic administration, the compounds may be incorporated with excipients and used in the form of ingestible tablets, buccal tablets, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers, and the like. To administer a compound of the invention by other than parenteral administration, it may be necessary to coat the compound with, or co-administer the compound with, a material to prevent its inactivation.

Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions. In certain embodiments, an antibody or antibody portion of the invention is coformulated with and/or coadministered with one or more additional therapeutic agents that are useful for treating disorders in which RGM A activity is detrimental. For example, an anti-RGM A antibody or antibody portion of the invention may be coformulated and/or coadministered with one or more additional antibodies that bind other targets (*e.g.*, antibodies that bind cytokines or that bind cell surface molecules). Furthermore, one or more antibodies of the invention may be used in combination with two or more of the foregoing therapeutic agents. Such combination therapies may advantageously utilize lower dosages of the administered

therapeutic agents, thus avoiding possible toxicities or complications associated with the various monotherapies.

In certain embodiments, an antibody to RGM A or fragment thereof is linked to a half-life extending vehicle known in the art. Such vehicles include, but are not limited to, the Fc domain, polyethylene glycol, and dextran. Such vehicles are described, e.g., in U.S. Application Serial No. 09/428,082 and published PCT Application No. WO 99/25044, which are hereby incorporated by reference for any purpose.

In a specific embodiment, nucleic acid sequences comprising nucleotide sequences encoding an antibody of the invention or another prophylactic or therapeutic agent of the invention are administered to treat, prevent, manage, or ameliorate a disorder or one or more symptoms thereof by way of gene therapy. Gene therapy refers to therapy performed by the administration to a subject of an expressed or expressible nucleic acid. In this embodiment of the invention, the nucleic acids produce their encoded antibody or prophylactic or therapeutic agent of the invention that mediates a prophylactic or therapeutic effect.

Any of the methods for gene therapy available in the art can be used according to the present invention. For general reviews of the methods of gene therapy, see Goldspiel et al., 1993, Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, Science 260:926- 932 (1993); and Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIBTECH 11(5):155-215. Methods commonly known in the art of recombinant DNA technology which can be used are described in Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley &Sons, NY (1993); and Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990). Detailed description of various methods of gene therapy are disclosed in US20050042664 A1 which is incorporated herein by reference.

RGM A plays a critical role in the pathology associated with a variety of diseases as defined herein above. RGM A and RGM proteins have been described to be up-regulated at lesion sites in humans suffering from traumatic brain injury (Schwab et al., Arch. Neurol. 62: 1561-8, 2005a) in infarcted penumbra and core areas of the stroke-damaged human brain(Schwab et al., Arch. Neurol. 62: 1561-8,

2005a), in the substantia nigra of patients suffering from Parkinson's disease (Bossers et al. Brain Pathology vol. 19 : 91-107, 2008). Therefore RGM A antibodies are suitable agents for combinatorial therapy of cerebral stroke, traumatic brain injury, Parkinson's disease, Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders of the human nervous system. In stroke patients current treatment within the first three hours consists of delivery of tissue plasminogen activator for lysis of blood clots (Liang et al. Arch. Neurol . 65: 1429 – 33, 2008) and such a treatment could in principle be combined with an RGM A antibody delivery which offers a different treatment approach and a far more exended therapeutic window. In Alzheimer's disease, drug combination with RGMA antibodies is possible with the approved cognition enhancers, Donepezil, Memantine and such an approach might significantly slow down the progressive neuropathology. Intranasal delivery of insulin has positive effects on attention and memory (Hanson and Frey, BMC Neurosci. 9: S5, 2008) and is a possible administration route for RGM A antibodies thereby bypassing the blood-brain-barrier. In Parkinson disease (PD) patients, current treatment is based mainly on dopaminergic agents like levodopa, a dopamine prodrug (Khor and Hsu, Curr. Clin. Pharmacol. 2: 234 – 43, 2007), ropinirole, a non-ergolinic dopamine agonist (Jost et al. J. Neurol. 255 Suppl. 5: 60 –63, 2008), the monoamine oxidase B inhibitors Rasagiline and Selegiline (Elmer and Bertoni, Expert Opin. Pharmacother. 9: 2759 – 72, 2008). Despite their beneficial effects in early and mild PD none of these drugs is able to prevent the progressive degeneration of the substantia nigra and associated subcortical and cortical brain areas and a combination therapy with regeneration-stimulating RGM A antibodies could therefore slow down the disease process.

Any neuroprotective agent being it an antioxidant, a radical scavengers, an anti-convulsive drug like Phenytoin or the anemia drug Erythropoetin is suitable for a combinatorial therapy with pro-regenerative RGM A antibodies thereby extending the usually very short therapeutic treatment window of the neuroprotectants.

The antibodies, and antibody portions of the invention can be used to treat humans suffering from such diseases.

It should be understood that the antibodies of the invention or antigen binding portion thereof can be used alone or in combination with an additional agent, e.g., a therapeutic agent, said additional agent being selected by the skilled artisan for its intended purpose. For example, the additional agent can be a therapeutic agent art-

recognized as being useful to treat the disease or condition being treated by the antibody of the present invention. The additional agent also can be an agent that imparts a beneficial attribute to the therapeutic composition e.g., an agent, which effects the viscosity of the composition.

It should further be understood that the combinations which are to be included within this invention are those combinations useful for their intended purpose. The agents set forth below are illustrative for purposes and not intended to be limited. The combinations, which are part of this invention, can be the antibodies of the present invention and at least one additional agent selected from the lists below. The combination can also include more than one additional agent, e.g., two or three additional agents if the combination is such that the formed composition can perform its intended function.

Non-limiting examples of therapeutic agents for multiple sclerosis with which an antibody, or antibody portion, of the invention can be combined include the following: corticosteroids; prednisolone; methylprednisolone; azathioprine; cyclophosphamide; cyclosporine; methotrexate; 4-aminopyridine; tizanidine; interferon-β1a (AVONEX; Biogen); interferon-β1b (BETASERON; Chiron/Berlex); interferon α-n3) (Interferon Sciences/Fujimoto), interferon-α (Alfa Wassermann/J&J), interferon β1A-IF (Serono/Inhale Therapeutics), Peginterferon α 2b (Enzon/Schering-Plough), Copolymer 1 (Cop-1; COPAXONE; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); hyperbaric oxygen; intravenous immunoglobulin; cladribine; antibodies to or antagonists of other human cytokines or growth factors and their receptors, for example, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-23, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, and PDGF. Antibodies of the invention, or antigen binding portions thereof, can be combined with antibodies to cell surface molecules such as CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 or their ligands. The antibodies of the invention, or antigen binding portions thereof, may also be combined with agents, such as methotrexate, cyclosporine, FK506, rapamycin, mycophenolate mofetil, leflunomide, NSAIDs, for example, ibuprofen, corticosteroids such as prednisolone, phosphodiesterase inhibitors, adensosine agonists, antithrombotic agents, complement inhibitors, adrenergic agents, agents which interfere with signalling by proinflammatory cytokines such as TNFα or IL-1 (e.g. IRAK, NIK, IKK, p38 or MAP kinase inhibitors),

IL-1β converting enzyme inhibitors, TACE inhibitors, T-cell signaling inhibitors such as kinase inhibitors, metalloproteinase inhibitors, sulfasalazine, azathioprine, 6-mercaptopurines, angiotensin converting enzyme inhibitors, soluble cytokine receptors and derivatives thereof (e.g. soluble p55 or p75 TNF receptors, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) and antiinflammatory cytokines (e.g. IL-4, IL-10, IL-13 and TGFβ).

Preferred examples of therapeutic agents for multiple sclerosis in which the antibody or antigen binding portion thereof can be combined to include interferon-β, for example, IFNβ1a and IFNβ1b; copaxone, corticosteroids, caspase inhibitors, for example inhibitors of caspase-1, IL-1 inhibitors, TNF inhibitors, and antibodies to CD40 ligand and CD80.

The antibodies of the invention, or antigen binding portions thereof, may also be combined with agents, such as alemtuzumab, dronabinol, Unimed, daclizumab, mitoxantrone, xaliproden hydrochloride, fampridine, glatiramer acetate, natalizumab, sinnabidol, a-immunokine NNSO3, ABR-215062, AnergiX.MS, chemokine receptor antagonists, BBR-2778, calagualine, CPI-1189, LEM (liposome encapsulated mitoxantrone), THC.CBD (cannabinoid agonist) MBP-8298, mesopram (PDE4 inhibitor), MNA-715, anti-IL-6 receptor antibody, neurovax, pirfenidone allotrap 1258 (RDP-1258), sTNF-R1, talampanel, teriflunomide,TGF-beta2, tiplimotide, VLA-4 antagonists (for example, TR-14035, VLA4 Ultrahaler, Antegran-ELAN/Biogen), interferon gamma antagonists, IL-4 agonists.

The pharmaceutical compositions of the invention may include a "therapeutically effective amount" or a "prophylactically effective amount" of an antibody or antibody portion of the invention. A "therapeutically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired therapeutic result. A therapeutically effective amount of the antibody or antibody portion may be determined by a person skilled in the art and may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the ability of the antibody or antibody portion to elicit a desired response in the individual. A therapeutically effective amount is also one in which any toxic or detrimental effects of the antibody, or antibody portion, are outweighed by the therapeutically beneficial effects. A "prophylactically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired prophylactic result. Typically, since a prophylactic dose is used in subjects

prior to or at an earlier stage of disease, the prophylactically effective amount will be less than the therapeutically effective amount.

Dosage regimens may be adjusted to provide the optimum desired response (*e.g.*, a therapeutic or prophylactic response). For example, a single bolus may be administered, several divided doses may be administered over time or the dose may be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the mammalian subjects to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on (a) the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic or prophylactic effect to be achieved, and (b) the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of sensitivity in individuals.

An exemplary, non-limiting range for a therapeutically or prophylactically effective amount of an antibody or antibody portion of the invention is 0.1-20 mg/kg, more preferably 1-10 mg/kg. It is to be noted that dosage values may vary with the type and severity of the condition to be alleviated. It is to be further understood that for any particular subject, specific dosage regimens should be adjusted over time according to the individual need and the professional judgment of the person administering or supervising the administration of the compositions, and that dosage ranges set forth herein are exemplary only and are not intended to limit the scope or practice of the claimed composition.

It will be readily apparent to those skilled in the art that other suitable modifications and adaptations of the methods of the invention described herein are obvious and may be made using suitable equivalents without departing from the scope of the invention or the embodiments disclosed herein. Having now described the present invention in detail, the same will be more clearly understood by reference to the following examples, which are included for purposes of illustration only and are not intended to be limiting of the invention.

EXAMPLES:

Methods

The following methods describe in detail the experimental procedures used in the Examples section.

(i) Direct binding ELISA plates were coated with hRGM A (R&D) at a concentration of 2µg/mL in Carbonate buffer. The wells were then blocked with 2% Blocking solution (Bio-Rad) for 1 hour at room temperature. Biotinylated antibodies were serially diluted with a 1:5 dilution factor in 0.1% BSA/PBS down the plate and incubated for 1 hour at room temperature. The detection reagent was a 1:10,000 dilution of streptavidin-HRP in 0.1% BSA/PBS. Detection was done with a TMB reagent, which was stopped with 2N H_2SO_4 and OD was read at 450nM.

(ii)FACS analysis. Stable transfectants of HEK293 cells overexpressing hRGM A or BAF3 cells overexpressing ratRGM A were subjected to staining with unlabelled 5F9 or 8D1 MABs for more than 15 minutes at 4° in 0.1% BSA/PBS buffer. Detection was carried out with a mouse anti-rat IgG PE antibody.

(iii)Solid phase ELISA assays for evaluating MAB 5F9 in hRGM A - neogenin binding assays.

ELISA plates (Immuno Plate Cert. Maxi Sorb. F96 NUNC, 439454) were coated for 1 h at 37°C with a concentration of 2.5 µg/ml of the extracellular domain of the His-tagged human Neogenin protein (concentration of stock solution: 30 µg/ml). After the incubation, unbound Neogenin was removed in 3 separate wash steps with PBS containing 0.02% Tween 20. Blocking of the Neogenin-coated plates was done by adding 200 µl per well of a 3% Bovine serum albumin (BSA), PBS, Tween 20 (0.02%)blocking solution. After incubation for 1 h at 37°C, the blocking solution was removed and RGM A fragments or full length protein, conjugated with a human fc tag, with or without antibody, was added. In some experiments antibodies were preincubated with the fc-conjugated hRGM A proteins for 1 h at room temperature. The Neogenin-coated plates were incubated with hRGM A with or without antibodies for 1 h at 37°C. After 3 wash steps with PBS-Tween 20 (0.02%), plates were incubated with a Biotin-labeled anti-human fc antibody (1mg/ml,diluted 1:200 in PBS containing 0.6% BSA, 0.02% Tween 20),Jackson ImmunoResearch catalog no: 709-065-149, for 1h at 37°C. Unbound antibody was removed by 3 wash steps with PBS-Tween 20 (0.02%). To visualize binding of the Biotin-labeled anti-fc antibody, a

complex consisting of Streptavidin-Peroxidase (Roche, cat.# 11089153001), diluted 1:5000 with PBS containing 0.6% BSA, 0.02% Tween 20 was added, followed by incubation at 37°C for 1h. Unbound Peroxidase-complex was removed in 3 subsequent wash steps (PBS-Tween 20 (0.02%) before adding the Peroxidase substrate (Immuno Pure TMB , Pierce # 34021). The substrate reaction was stopped 1 – 30 min after its addition to the wells by 2.5 M H_2SO_4. Plates were analysed (OD determination) at a wave length of 450 nm using an Anthos photometer.

(iv) Solid phase ELISA assays for evaluating MAB 5F9 in hRGM A – BMP-4 binding assays.

ELISA plates (Immuno Plate Cert. Maxi Sorb. F96 NUNC, 439454) were coated for 1 h at 37°C with a solution containing a concentration of 2.5 µg/ml of recombinant human BMP-4 protein (R&D Systems, # 314-BP, Lot # BEM316061). After the incubation, unbound BMP-4 was removed in 3 separate wash steps with PBS containing 0.02% Tween 20. Blocking of the BMP-4 coated plates was done by adding 200 µl per well of a 3% Bovine serum albumin (BSA), PBS, Tween 20(0.02%)blocking solution. After incubation for 1 h at 37°C, the blocking solution was removed and RGM A fragments or full length protein, conjugated with a human fc tag, with or without antibody, was added. In some experiments antibodies were preincubated with the fc-conjugated hRGM A proteins for 1 h at room temperature. The BMP-4 coated plates were incubated with hRGM A with or without antibodies for 1 h at 37°C. After 3 wash steps with PBS-Tween 20 (0,02%), plates were incubated with a Biotin-labeled anti-human fc antibody (1mg/ml, diluted 1:200 in PBS containing 0.6% BSA, 0.02% Tween 20), Jackson ImmunoResearch catalog no: 709-065-149, for 1h at 37°C. Unbound antibody was removed by 3 wash steps with PBS-Tween 20 (0.02%). To visualize binding of the Biotin-labeled anti-fc antibody, a complex consisting of Streptavidin-Peroxidase (Roche, cat.# 11089153001), diluted 1:5000 with PBS containing 0.6% BSA, 0.02% Tween 20 was added, followed by incubation at 37°C for 1h. Unbound Peroxidase-complex was removed in 3 subsequent wash steps (PBS-Tween 20 (0.02%)before adding the Peroxidase substrate (Immuno Pure TMB , Pierce # 34021). The substrate reaction was stopped 1 – 30 min after its addition to the wells by 2.5 M H_2SO_4. Plates were analysed (OD determination) at a wave length of 450 nm using an Anthos photometer.

(v) Solid phase ELISA assays for evaluating MAB 5F9 in hRGM A – BMP-2 binding assays.

ELISA plates (Immuno Plate Cert. Maxi Sorb. F96 NUNC, 439454) were coated for 1 h at 37^{0}C with a solution containing a concentration of 2.5 µg/ml of recombinant human BMP-2 protein (R&D Systems, # 355-BM, Lot # MSA04). After the incubation, unbound BMP-2 was removed in 3 separate wash steps with PBS containing 0.02% Tween 20. Blocking of the BMP-2 coated plates was done by adding 200 µl per well of a 3% Bovine serum albumin (BSA), PBS, Tween 20(0.02%)blocking solution. After incubation for 1 h at 37^{0}C, the blocking solution was removed and RGM A fragments or full length protein, conjugated with a human fc tag, with or without antibody, was added. In some experiments antibodies were preincubated with the fc-conjugated hRGM A proteins for 1 h at room temperature. The BMP-2 coated plates were incubated with hRGM A with or without antibodies for 1 h at 37^{0}C. After 3 wash steps with PBS-Tween 20 (0.02%), plates were incubated with a Biotin-labeled anti-human fc antibody (1mg/ml,diluted 1:200 in PBS containing 0.6% BSA, 0.02% Tween 20), Jackson ImmunoResearch catalog no: 709-065-149, for 1h at 37°C. Unbound antibody was removed by 3 wash steps with PBS-Tween 20 (0.02%). To visualize binding of the Biotin-labeled anti-fc antibody, a complex consisting of Streptavidin-Peroxidase (Roche, cat.# 11089153001), diluted 1:5000 with PBS containing 0.6% BSA, 0.02% Tween 20 was added, followed by incubation at 37^{0}C for 1h. Unbound Peroxidase-complex was removed in 3 subsequent wash steps (PBS-Tween 20 (0.02%) before adding the Peroxidase substrate (Immuno Pure TMB , Pierce # 34021). The substrate reaction was stopped 1 – 30 min after its addition to the wells by 2.5 M H_2SO_4. Plates were analysed (OD determination) at a wave length of 450 nm using an Anthos photometer.

(vi) Ntera-2 cell culture

Human Ntera-2 cells were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DMSZ, Braunschweig). Frozen stocks of undifferentiated Ntera-2 cells were thawed in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum (FBS; JRH Bioscience, Kansas, USA) and 5% horse serum (HS; Sigma, Germany). Cells were grown in culture flasks (Greiner, Germany) until they reached confluence of 80%.

For neuronal differentiation, Ntera-2 cells were seeded at a density of 2.5 x 10^6 cells/175 cm^2 in differentiation medium (DMEM medium containing 10% FBS, 5% HS, 1% penicillin-streptomycin, retinoic acid 10µM). Cells were differentiated for 3 weeks and the medium was exchanged twice a week.

After differentiation, cells were detached with trypsin-EDTA and split at a ratio of 1:6. 48h later neuronal cells were separated by tapping from the underlying cells. Dislodged cells were transferred for aggregation in new medium into new shaking culture flasks (Corning, USA). Differentiated Ntera-2 cells were allowed to aggregate under smooth horizontal shaking conditions at 37°C, for 24h in Neurobasal medium (Gibco) supplemented with B27 (Gibco), glutamine (Gibco) and penicillin-streptomycin. Ntera-2 aggregates were seeded at a density of approximately 20 – 30 aggregates per cover slip in 24-well plates. The poly-lysine precoated cover slips were coated with laminin (20µg/ml, Sigma) and with the recombinant fc-coupled human RGM A fragment #786 (amino acids 47 – 168) at a concentration of 10 µg/ml. After seeding, cultures were treated with the 5F9 MAB, added at three different concentrations (0.1 µg/ml; 1 µg/ml; 10 µg/ml) to the culture medium and were further incubated for 24h at 37°C in Neurobasal medium. Aggregates were then fixed in 4% paraformaldehyde (2h, room temperature) and permeabilized by addition of 0.1% Triton X-100 in PBS (20 min. room temperature). For fluorescent staining cultures were blocked with PBS containing 1 % BSA for 1 h at room temperature. After blocking Ntera cells were incubated with a mouse monoclonal antibody against ß-tubulin isotype 3 (clone SDL3D10, Sigma # T8660) for 2 h at room temperature. Unbound antibody was removed by 3 different wash steps (5 – 15 min each) and Ntera cells were incubated with a Cy-3 conjugated Donkey anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch Lot 62597), diluted 1:350 fold in PBS/0,5% BSA and 0,5 µg/ml bisbenzimide. Ater a 1 hour incubation, cultures were washed 3 times to remove unbound secondary antibody. For fluorescence microscopy, coverslips were embedded in Fluoromount G (Southern Biotech, Eching).

Images of Ntera-2 aggregates were acquired using a Zeiss Axiovert 200 fluorescence microscope and the outgrowth of the cultures was automatically analysed using an in-house image acquisition and analysis system. Automatic analysis of outgrowth was done with Image Pro Plus 4.5 and the statistical analysis of the data was performed with Graph Pad Prism 4. Outgrowth was normalized to control cultures grown in the absence of the human RGM A fragment #786.

(vii) SH-SY5Y culture.

SH-SY5Y cells (ATCC, CRL-2266) are human neuroblastoma cells derived from a metastatic brain tumor. These cells were grown in a medium consisting of 50% Earle's Balanced Salt Solution(Invitrogen Life Technologies, Cat. # 24010-043)

and 50% F12 (Ham) Nutrient Mix + GlutaMAX-1 (Invitrogen Life Technologies, Cat. # 31765-027). This medium is further supplemented with heat-inactivated 10% fetal calf serum (FCS, JRH Biosciences, Kansas Cat. # 12107-1000M), 1% NEAA (MEM Non essential Amino Acid solution (Sigma-Aldrich Cat.# M1745), and 1% Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml) (Invitrogen Life Technologies, Cat. # 15140-122). To stimulate neuronal differentiation and growth of neuronal processes, SH-SY5Y cells were cultured in medium supplemented with 10 µM retinoic acid (RA, Sigma-Aldrich Cat. # R2625-050MG)) for several days. Differentiated SH-SY5Y cells were grown in tissue culture flasks and were removed by careful trypsination and were plated on glass coverslips coated with a striped pattern of RGM A protein or fragment of it and Collagen I.

(viii) Preparation of striped glass coverslips

The modified version of the stripe assay on glass coverslips was performed in a slightly different way as described previously (Knoell et al. Nature Protocols 2: 1216 – 1224, 2007) and is summarized below.

Sterile silicon matrices for production of stripes consisting of purified proteins were pressed on the surface of a petri dish with the rough face of the matrix pointing upwards. Ethanol washed, clean coverslips were laid down onto the matrix and the corners of the matrix are marked with an ink ball point pen at the backside of the coverslip. The matrix carrying the coverslip was carefully turned upside down with the coverslip facing the bottom of the petri dish. Fc-conjugated full length inhibitory RGM A or fc – fragments or recombinant human RGM A (R&D Systems Cat. # 2459 RM) of it were mixed with 10 µl of an FITC-labeled anti-mouse antibody (Fab-specific goat anti-mouse IgG, Sigma-Aldrich Cat. # F-4018) to visualize the RGM A stripes. Using a Hamilton syringe, 50 µl of the RGM A – FITC antibody solution is carefully injected through the inlet channel. Excess fluid left the matrix through the outlet channel and is removed with a Kleenex cloth. After incubation of the matrix-coverslip at 37^{0}C for 2 hours, the first coating solution (containing RGM A) was washed away with 100 µl of PBS. In the next step, the coverslip with the RGM A stripes was transferred to a 24 well plate, coated with 500 µl Collagen I (rat tail Collagen I, Becton Dickinson Biosciences Cat. # 354236) to fill the empty spaces between the RGM A stripes and was incubated at 37^{0}C for 2 hours. In the end a pattern of alternating stripes of RGM A and Collagen I was produced on the coverslip. After incubation, non-bound Collagen I was washed away by three separate wash steps

with PBS and differentiated SH-SY5Y cells were plated onto the coverslips. Incubation of the SH-SY5Y cells on the patterned substrate was continued at 37^{0}C for 20 – 24 hours in the presence or absence of monoclonal antibodies directed against human RGM A.

For immunofluorescence analysis cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 2h at room temperature or overnight at 4^{0}C and permeabilized by incubation with PBS containing 0.1% Triton X-100 for 10 - 20 min at room temperature. After blocking with 3% BSA for 60 minutes, cells were incubated with the primary antibody (monoclonal anti—ß-tubulin isotype 3 clone SDL 3D10, Sigma-Aldrich Cat. # T8660) for 2 hours at room temperature and after several wash steps with the secondary antibody (Cy-3 donkey anti-mouse JacksonImmuno Research Lot:62597), diluted in PBS with 0.1% BSA for 1h. Nuclei were counterstained using bisbenzimide H33258 (Riedel-De-Haen, Cat. # A-0207). Cells were finally embedded in Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates Inc.: Cat. # 010001). Cells were analysed using an Axioplan2 fluorescence microscope (Zeiss).

(ix) Construction and expression of recombinant anti RGMA antibodies

The DNA encoding the cDNA fragments of the heavy chain variable region of rat anti-human RGMA monoclonal antibodies 5F9 and 8D1 was cloned into a pHybE expression vector containing the human IgG1 constant region, which contains 2 hinge-region amino acid mutations, by homologous recombination in bacteria. These mutations are a leucine to alanine change at positions 234 and 235 (EU numbering, Lund et al., 1991, J. Immunol., 147:2657). The light chain variable region of the 5F9 and 8D1 monoclonal antibodies were cloned into pHybE vector containing a human kappa constant region. Exemplary pHyb-E vectors include the pHybE-hCk, and pHybE-hCg1,z,non-a (see US Patent Application Serial No. 61/021,282). Full-length antibodies were transiently expressed in 293E cells by co-transfection of chimeric heavy and light chain cDNAs ligated into the pHybE expression plasmid. Cell supernatants containing recombinant antibody were purified by Protein A Sepharose chromatography and bound antibody was eluted by addition of acid buffer. Antibodies were neutralized and dialyzed into PBS. The purified anti-human RGMA monoclonal antibodies were then tested for their ability to bind RGMA by ELISA as described in Example 1 and competition ELISA as described in Example 7.

Example 1:Generation of Anti human RGMA monoclonal antibodies

Anti human RGMA rat monoclonal antibodies were obtained as follows:

Example 1A:Immunization of rats with human RGMA antigen

Twenty-five micrograms of recombinant purified human RGMA (R&D Systems Cat#2459-RM lot MRH02511A) mixed with complete Freund's adjuvant (Sigma,) was injected subcutaneously into four 6-8 week-old Harlan Sprague Dawley rats on day 1. On days 21, 42, and 63, twenty-five micrograms of recombinant purified human RGMA mixed with Incomplete Freunds adjuvant (Sigma) was injected subcutaneously into the same 4 Harlan Sprague Dawley rats. On day 144, or day 165 rats were injected intravenously with 10 µg recombinant purified human RGMA

Example 1B:Generation of Hybridoma

Splenocytes obtained from the immunized rats described in Example 1.2.A were fused with SP2/O- cells at a ratio of 2:1 according to the established method described in Kohler, G. and Milstein 1975, Nature, 256:495 to generate hybridomas. Fusion products were plated in selection media containing azaserine and hypoxanthine in 96-well plates at a density of $1.5x10^5$ spleen cells per well. Seven to ten days post fusion, macroscopic hybridoma colonies were observed. Supernatant from each well containing hybridoma colonies was tested by direct ELISA (see Example 2) for the presence of antibody to human RGMA. ELISA positive cell lines were tested in FACS against stable transfected HEK293 cells expressing human and/or rat RGMA. These rat hybridoma cell lines were subsequently tested in Direct ELISA for crossreactivity with rat RGMA, and ELISA binding to HuRGMA 47-168 fusion protein.

Table 7: Binding of anti RGMA Rat Monoclonal Antibodies

Name	Direct ELISA rHuRGMA	FACS HEK293-rhRGMA	Direct ELISA rRatRGMA	Direct ELISA hRGMA 47-168/HuIgGFc
ML68-8D1	Yes	Yes	No	Yes
ML69-5F9	Yes	Yes	Yes	Yes

Example 2. Direct ELISA binding of mABs 5F9 and 8D1.

As shown in Figure 1A, MABs 5F9 and 8D1 bind to hRGM A with similar titers, as described in above section(i). MAB 5F9 was also shown to bind to ratRGM A in ELISA, while 8D1 is not capable of binding to ratRGM A (data not shown). Figure 1B shows that MABs 5F9 and 8D1 bind to HEK293 cells overexpressing hRGM A in FACS. Figure 1C shows that 5F9 but not 8D1 is capable of binding BAF3 cells overexpressing ratRGM A in FACS. FACS was carried out as described in section (ii).

Solid phase ELISA assays were used to evaluate MAB 5F9 binding in competitive hRGM A-neogenin binging assays. ELISA plates were prepared and used as described in section (iii) of the present application. hRGM A was added at a concentration of 0.5 µg/ml with 5F9 antibodies for 1 h at 37^{0}C. MAB 5F9 was used at the following concentrations: 1.25 µg/ml; 0.63 µg/ml; 0.32 µg/ml; 0.16 µg/ml; 0.08 µg/ml; 0.04 µg/ml; 0.02 µg/ml; 0.01 µg/ml. Binding of hRGM A was visualized using a Biotin-labeled anti-fc antibody and a Streptavidin-Peroxidase complex. Plates were analysed (OD determination) at a wave length of 450 nm using an Anthos photometer. As shown in Figure 2, the three highest antibody concentrations, dose-dependently inhibited binding of full length human RGM A to Neogenin.

Solid phase ELISA assays were used also for evaluating MAB 5F9 in competitive hRGM A – BMP-4 binding assays. ELISA plates were prepared and used as described in section (iv) of the present application. hRGM A was added at a concentration of 0.5 µg/ml with 5F9 antibodies for 1 h at 37^{0}C. MAB 5F9 was used at the following concentrations: 1.25 µg/ml; 0.63 µg/ml; 0.32 µg/ml; 0.16 µg/ml; 0.08 µg/ml; 0.04 µg/ml; 0.02 µg/ml; 0.01 µg/ml.. Binding of hRGM A was visualized using a Biotin-labeled anti-fc antibody and a Streptavidin-Peroxidase complex. Plates were analysed (OD determination) at a wave length of 450 nm using an Anthos

photometer. As shown in Figure 3, the four highest antibody concentrations, dose-dependently inhibited binding of full length human RGM A to BMP-4.

Solid phase ELISA assays were also used for evaluating MAB 5F9 binding inhibition of fragment 0 (47 – 168) hRGM A to BMP-4. ELISA plates were coated for 1 h at 37^{0}C with a concentration of 2.5 µg/ml of the human recombinant BMP-4 protein. hRGM A light chain (fragment 0, 47-168) was added at a concentration of 0.5 µg/ml with 5F9 antibodies for 1 h at 37^{0}C. MAB 5F9 was used at the following concentrations: 1.25 µg/ml; 0.63 µg/ml; 0.32 µg/ml; 0.16 µg/ml; 0.08 µg/ml; 0.04 µg/ml; 0.02 µg/ml; 0.01 µg/ml. Binding of hRGM A was visualized using a Biotin-labeled anti-fc antibody and a Streptavidin-Peroxidase complex. Plates were analysed (OD determination) at a wave length of 450 nm using an Anthos photometer. Figure 4 depicts the antibody concentrations of 1.25 µg/ml ,0.63 µg/ml and 0.32 µg/ml dose-dependently inhibiting binding of the human RGM A light chain to BMP-4.

Solid phase ELISA assays were also used for evaluating MAB 5F9 binding in competitive hRGM A – BMP-2 binding assays. ELISA plates were prepared and used as described in section (v) of the present application. Full length hRGM A was added at a concentration of 0.5 µg/ml with 5F9 antibodies for 1 h at 37^{0}C. MAB 5F9 was used at the following concentrations: 5 µg/ml; 2.5 µg/ml; 1.25 µg/ml; 0.63 µg/ml; 0.32 µg/ml; 0.16 µg/ml. Binding of hRGM A was visualized using a Biotin-labeled anti-fc antibody and a Streptavidin-Peroxidase complex. Plates were analysed (OD determination) at a wave length of 450 nm using an Anthos photometer. Figure 5 depicts antibody concentrations 5 µg/ml, 2.5 µg/ml, 1.25 µg/ml, 0.63 µg/ml, inhibiting the binding of full length human RGM A to BMP-2.

Solid phase ELISA assays were also used to evaluate MABs 5F9 and 8D1 in hRGM A – neogenin, hRGM A – BMP-2 and hRGM A – BMP-4 binding assays. (Figure 9) As described, ELISA plates were coated for 1 h at 37^{0}C with a concentration of 2.5 µg/ml of the extracellular domain of the His-tagged human Neogenin protein or with 2.5 µg/ml Bmp-2 or BMP-4. Full length fc-conjugated hRGM A was added at a concentration of 0,5 µg/ml with antibodies for 1 h at 37^{0}C. MABs 5F9 and 8D1 were used at the following concentrations: 5 µg/ml; 2.5 µg/ml; 1.25 µg/ml; 0.63 µg/ml; 0.32 µg/ml; 0.16 µg/ml; 0.08 µg/ml. Binding of hRGM A was visualized using a Biotin-labeled anti-fc antibody and a Streptavidin-Peroxidase complex. Plates were analysed (OD determination) at a wave length of 450 nm using

an Anthos photometer. As shown in Figure 9, the rat monoclonal antibody 8D1 inhibits or reduces binding of human RGM A to BMP-2 and to BMP-4 but is not able to inhibit its binding to Neogenin.

Example 3. mAb 5F9 activity in neurite growth assays with aggregates of differentiated human NTera neurons.

Ntera cells were obtained and cultured as described in Method section (vi) of the present application. mAb 5F9 neutralized the neurite outgrowth inhibitory activity of the potent fc-conjugated light chain (amino acids 47 – 168) of the human RGM A protein in neurite growth assays with aggregates of differentiated human NTera neurons. As shown in Figure 6, in the absence of an inhibitory RGM A protein or fragment and in the presence of the outgrowth-stimulating substrate laminin, neuronal NTera aggregates show an extensive and dense network of outgrowing neurites (A). Also shown in Figure 6, the presence of the hRGM A light chain, dramatically reduces number, density and length of NTera neurites, proving the potent inhibitory activity of the hRGM A fragment. The few neurites leaving the aggregate are short and tightly bundled (B). Parts C-E of Figure 6 show increasing concentrations of the MAB 5F9, added to the cultures does-dependently neutralised or derepressed the neurite-growth inhibitory activity of the hRGM A light chain fragment. With increasing MAB concentrations, outgrowth of NTera neuronal aggregates is completely restored, despite the presence of the RGM A inhibitor (C: 0.1 µg/ml MAB 5F9; D: 1 µg/ml MAB 5F9; E: 10 µg/ml MAB 5F9).

Quantitative analysis of the neutralising activity of MAB 5F9 in neurite growth assays with human NTera aggregates was performed to test the potent fc-conjugated light chain inhibitory fragment (amino acids 47 – 168) of the human RGM A protein. Outgrowth of the cultures was automatically analysed by having aggregates stained with bisbenzimide and subsequently photographed. The staining only marked the aggregate not the outgrowing neurites. These were however stained with an antibody to ß3-tubulin and a fluorophor-labeled secondary antibody. Neurite outgrowth was automatically determined by calculating the neurite outgrowth index, an index determined by subtracting the area of the cell bodies from the ß3-tubulin stained area of the aggregate and its processes. This factor was then divided by the area of the cell bodies as described in Lingor et al. J. Neurochem. 103: 181 – 189, 2007. Figure 7, shows that MAB 5F9 dose-dependently (0.1-10.0 µg) neutralized the

outgrowth inhibitory activity of an fc-conjugated, potent hRGM A inhibitor fragment (fragment 0, 47 – 168; 10 µg) in neurite growth assays with human Ntera aggregates.

Example 4. mAb 5F9 activity in hRGM A/ Collagen I stripes.

SH-SY5Y cells were cultured and used as described in section (vii) of the present application. Striped glass coverslips with RGM A and Collagen I were prepared as described in section (viii) of the present application. A carpet with alternating stripes of hRGM A/Collagen I and Collagen I was produced for the experiments according to a protocol described in the literature (Knoell et al. Nature Protocols 2: 1216 – 1224, 2007). In the absence of the 5F9 MAB (A), neuronal SH-SY5Y cells show a clear preference for the Collagen I stripe with more than 90% of the cells prefering Collagen I stripes over hRGM A stripes. With increasing concentrations of MAB 5F9 neuronal SH-SY5Y cells prefer hRGM A stripes over Collagen I stripes (B-E). At the highest MAB concentration used (E)), SH-SY5Y neurons show a strong preference for hRGM A stripes in comparison with the Collagen I stripes (see Figure 8). This can be interpreted as a unique characteristic of the 5F9 MAB since it transformed the inhibitory nature of RGM A in an attractive activity. In the presence of increasing concentrations of 5F9, neuronal cells prefer to migrate and grow on an RGM A substrate, and not on a permissive substrate like Collagen I. Such a unique feature has never been described before for a monoclonal antibody.

EXAMPLE 5: Construction of CDR-grafted antibodies

By applying standard methods well known in the art, the CDR sequences of VH and VL chains of monoclonal antibody 5F9 (see Table 5 above) are grafted into different human heavy and light chain acceptor sequences. Based on sequence VH and VL alignments with the VH and VL sequences of monoclonal antibody 5F9 of the present invention the following known human sequences are selected:

a) VH3-48, VH3-33 and VH3-23 as well as the joining sequences hJH3, hJH4 and hJH6 for constructing heavy chain acceptor sequences (according to Table 3 above);

b) A17 and A18 as well as hJK2 for constructing light chain acceptor sequences (according to Table 4 above).

By grafting the corresponding VH and VL CDRs of 5F9 into said acceptor sequences the following CDR grafted, humanized, modified VH and VL sequences were prepared (see also Table 6, above): VH 5F9.1-GL, VH 5F9.2-GL, VH 5F9.3-GL, VH 5F9.4-GL, VH 5F9.5-GL, VH 5F9.6-GL, VH 5F9.7-GL, and VH 5F9.8-GL; VL 5F9.1-GL, VL 5F9.2-GL, and VL 5F9.3-GL.

EXAMPLE 6: Construction of framework back mutations in CDR-grafted antibodies

To generate humanized antibody framework back mutations, mutations are introduced into the CDR-grafted antibody sequences as prepared according to Example 5, by *de novo* synthesis of the variable domain and/or using mutagenic primers and PCR, and methods well known in the art. Different combinations of back mutations and other mutations are constructed for each of the CDR-grafts as follows.

For heavy chains VH 5F9.1-GL, VH 5F9.2-GL, and VH 5F9.3-GL one or more of the following Vernier and VH/VL interfacing residues are back mutated as follows: V37→I, V48→I, S49→G, and/or R98→K

For heavy chains VH 5F9.4-GL, VH 5F9.5-GL, and VH 5F9.6-GL one or more of the following Vernier and VH/VL interfacing residues are back mutated as follows: V37→I, V48→I, A49→G, R98→K.

For heavy chains VH 5F9.7-GL, VH 5F9.8-GL, and VH 5F9.9-GL one or more of the following Vernier and VH/VL interfacing residues are back mutated as follows: V37→I, V48→I, S49→G.

Additional mutations include the following:

for heavy chains VH 5F9.1-GL, VH 5F9.2-GL, and VH 5F9.3-GL: D88→A,

for heavy chains VH 5F9.4-GL, VH 5F9.5-GL, and VH 5F9.6-GL: Q1→E and

for heavy chains VH 5F9.7-GL, VH 5F9.8-GL, and VH 5F9.9-GL: L5→V.

For light chain VL 5F9.1-GL one or more of the following Vernier and VH/VL interfacing residues are back mutated as follows: I2→V, M4→L, Y41→F.

For light chain VL 5F9.2-GL one or more of the following Vernier and VH/VL interfacing residues are back mutated as follows: M4→L, R51→L.

For light chain VL 5F9.3-GL one or more of the following Vernier and VH/VL interfacing residues are back mutated as follows: M4→L, Y41→F.

EXAMPLE 7: CONSTRUCTION AND EXPRESSION OF RECOMBINANT HUMANIZED ANTI RGMA ANTIBODIES

pHybE expression vectors harboring heavy and light chains containing framework back mutations were co-transfected into 293-6E cells to transiently produce full-length humanized antibodies as described in section ix above. Mutations were introduced into the CDR-grafted antibody sequences as prepared according to Example 5, by *de novo* synthesis of the variable domain and/or using mutagenic primers and PCR, and methods well known in the art. The amino acid sequences of the VH and VL regions of the humanized antibodies are disclosed in Table 8.

Specifically, for the heavy chains:

VH 5F9.1, VH 5F9.5, and VH 5F9.9 contain VH 5F9.4-GL with a Q1→E mutation.

VH 5F9.2, VH 5F9.6, VH 5F9.10, VH 5F9.19, VH 5F9.20, VH 5F9.21, and VH 5F9.22 contain VH 5F9.4-GL with a Q1→E mutation and the following Vernier and VH/VL interfacing residue back mutations: V37→I, V48→I, A49→G, R98→K.

VH 5F9.3, VH 5F9.7, and VH 5F9.11 contain VH 5F9.7-GL with a L5→V mutation. VH 5F9.4, VH 5F9.8, VH 5F9.12, VH 5F9.23, VH 5F9.24, VH 5F9.25, and VH 5F9.26 contain VH 5F9.7-GL with a L5→V mutation and the following Vernier and VH/VL interfacing residue back mutations: V37→I, V48→I, S49→G.

For the light chains:

VL 5F9.1, VL 5F9.2, VL 5F9.3, and VL 5F9.4 are identical to VL 5F9.1-GL.

VL 5F9.5, VL 5F9.6, VL 5F9.7, and VL 5F9.8 are identical to VL 5F9.2-GL.

VL 5F9.9, VL 5F9.10, VL 5F9.11, and VL 5F9.12 are identical to VL 5F9.3-GL.

VL 5F9.19 and VL 5F9.23 contain VL 5F9.2-GL with the following Vernier and VH/VL interfacing residue back mutations: M4→L, R51→L. VL 5F9.20 and VL 5F9.24 contain VL 5F9.2-GL with the following Vernier and VH/VL interfacing residue back mutation: M4→L.

VL 5F9.21 and VL 5F9.25 contain VL 5F9.3-GL with the following Vernier and VH/VL interfacing residue back mutations: M4→L, Y41→F. VL 5F9.22 and VL 5F9.26 contain VL 5F9.3-GL with the following Vernier and VH/VL interfacing residue back mutation: M4→L.

TABLE 8: Expression of humanized antibodies

SEQ ID No.	Protein region	Sequence
		12345678901234567890123456789O
47	VH h5F9.1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WVRQAPGKGLEWVA**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAR**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
44	VL h5F9.1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WYLQKPGQSPQLLIY**EVSNRF** **S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
48	VH h5F9.2	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WIRQAPGKGLEWIG**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
44	VL h5F9.2	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WYLQKPGQSPQLLIY**EVSNRF** **S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
49	VH h5F9.3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WVRQAPGKGLEWVS**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
44	VL h5F9.3	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WYLQKPGQSPQLLIY**EVSNRF** **S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
50	VH h5F9.4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WIRQAPGKGLEWIG**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
44	VL h5F9.4	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WYLQKPGQSPQLLIY**EVSNRF** **S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
47	VH h5F9.5	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WVRQAPGKGLEWVA**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAR**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
45	VL h5F9.5	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WFQQRPGQSPRRLIY**EVSNRF** **S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
48	VH h5F9.6	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WIRQAPGKGLEWIG**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
45	VL h5F9.6	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WFQQRPGQSPRRLIY**EVSNRF** **S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR

49	VH h5F9.7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WVRQAPGKGLEWVS**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
45	VL h5F9.7	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WFQQRPGQSPRRLIY**EVSNRF** **S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
50	VH h5F9.8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WIRQAPGKGLEWIG**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
45	VL h5F9.8	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WFQQRPGQSPRRLIY**EVSNRF** **S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
47	VH h5F9.9	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WVRQAPGKGLEWVA**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAR**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
46	VL h5F9.9	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WYLQKPGQSPQLLIY**EVSNRF** **S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
48	VH h5F9.10	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WIRQAPGKGLEWIG**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
46	VL h5F9.10	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WYLQKPGQSPQLLIY**EVSNRF** **S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
49	VH h5F9.11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WVRQAPGKGLEWVS**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
46	VL h5F9.11	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WYLQKPGQSPQLLIY**EVSNRF** **S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
50	VH h5F9.12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WIRQAPGKGLEWIG**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
46	VL h5F9.12	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WYLQKPGQSPQLLIY**EVSNRF** **S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
48	VH h5F9.19	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WIRQAPGKGLEWIG**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS

51	VL h5F9.19	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WFQQRPGQSPRLLIY**EVSNRF** SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
48	VH h5F9.20	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WIRQAPGKGLEWIG**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
52	VL h5F9.20	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WFQQRPGQSPRRLIY**EVSNRF** **S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
48	VH h5F9.21	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WIRQAPGKGLEWIG**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
53	VL h5F9.21	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WFLQKPGQSPQLLIY**EVSNRF** SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
48	VH h5F9.22	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WIRQAPGKGLEWIG**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
54	VL h5F9.22	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WYLQKPGQSPQLLIY**EVSNRF** SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
50	VH h5F9.23	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WIRQAPGKGLEWIG**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
51	VL h5F9.23	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WFQQRPGQSPRLLIY**EVSNRF** SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
50	VH h5F9.24	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WIRQAPGKGLEWIG**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
52	VL h5F9.24	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WFQQRPGQSPRRLIY**EVSNRF** SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR
50	VH h5F9.25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WIRQAPGKGLEWIG**MIYYDSSEKHY** **ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
53	VL h5F9.25	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLE** **YSDGYTFLE**WFLQKPGQSPQLLIY**EVSNRF** SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR

50	VH h5F9.26	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGMN**WIRQAPGKGLEWIG**MIYYDSSEKHY ADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
54	VL h5F9.26	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLE YSDGYTFLE**WYLQKPGQSPQLLIY**EVSNRF S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**FQATHDPLT**FGQGTKLEIKR

Example 8: Characterization of humanized 5F9 antibodies using competition ELISA

ELISA plates (Costar 3369) were coated overnight at 4°C with 50 µl/well of 0.25µg/ml hRGMA in 0.2 M sodium carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.4, washed with Wash Buffer (PBS containing 0.1% Tween 20), and blocked for 1 hr at room temperature with 200 µl/well of 2% nonfat dry milk in PBS. After washing with Wash Buffer, a mixture of a biotinylated chimeric 5F9 (0.1 µg/ml final concentration) and unlabelled competitor test antibody starting at 50 µg/ml final concentration and serially diluted 5-fold) in 50 µl/well of ELISA buffer was added in duplicate. After incubating the plates for 1 hr at room temperature, and washing with Wash Buffer, bound antibodies were detected using 100 µl/well of 1:10,000 dilution of HRP-conjugated streptavidin (Fitzgerald) in ELISA buffer. After incubating for 1 hr at room temperature, and washing with Wash Buffer, color development was performed by adding 100 µl/well of TMB Buffer (Zymed). After incubating for 15 min at room temperature, color development was stopped by adding 50 µl/well of 1N hydrochloric acid. Absorbance was read at 490 nm.

Table 9 shows the IC_{50} values of humanized 5F9 antibodies obtained using the computer software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Table 9: IC50 values of humanized 5F9 antibodies in competitive ELISA

Antibody	IC50 (µg/ml)	Antibody	IC50 (µg/ml)
h5F9.1	>10	h5F9.19	N/A
h5F9.2	>10	h5F9.20	>2.0
h5F9.3	>10	h5F9.21	0.60
h5F9.4	>10	h5F9.22	>2.0

h5F9.5	>10	h5F9.23	0.55
h5F9.6	>10	h5F9.24	1.32
h5F9.7	>10	h5F9.25	0.66
h5F9.8	>10	h5F9.26	>2.0
h5F9.9	>10		
h5F9.10	>10		
h5F9.11	>10		
h5F9.12	>10		

Example 9: Affinity Determinations of chimeric and humanized antibodies using BIACORE technology

The BIACORE assay (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) determines the affinity of antibodies with kinetic measurements of on-, off-rate constants. Binding of antibodies to recombinant purified human RGMA was determined by surface plasmon resonance-based measurements with a Biacore® 3000 instrument (Biacore® AB, Uppsala, Sweden) using running HBS-EP (10 mM HEPES [pH 7.4], 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, and 0.005% surfactant P20) at 25° C. All chemicals were obtained from Biacore® AB (Uppsala, Sweden). Approximately 5000 RU of goat anti-human IgG, (Fcγ), fragment specific polyclonal antibody (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) diluted in 10 mM sodium acetate (pH 4.5) was directly immobilized across a CM5 research grade biosensor chip using a standard amine coupling kit according to manufacturer's instructions and procedures at 25 µg/ml. Unreacted moieties on the biosensor surface were blocked with ethanolamine. Modified carboxymethyl dextran surface in flowcell 2 and 4 was used as a reaction surface. Unmodified carboxymethyl dextran without goat anti-human IgG in flow cell 1 and 3 was used as the reference surface. Purified antibodies were diluted in HEPES-buffered saline for capture across goat anti-humanIgG specific reaction surfaces. Human antibodies to be captured as a ligand (25 µg/ml) were injected over reaction matrices at a flow rate of 5 µl/min. The association and dissociation rate constants, k_{on} (unit $M^{-1}s^{-1}$) and k_{off} (unit s^{-1}) were determined under a continuous flow rate of 25 µl/min. Rate constants were derived by making kinetic binding measurements at ten different antigen concentrations ranging from 0.39 – 50

nM. For kinetic analysis, rate equations derived from the 1:1 Langmuir binding model were fitted simultaneously to association and dissociation phases of all eight injections (using global fit analysis) with the use of Biaevaluation 4.0.1 software. The equilibrium dissociation constant (unit M) of the reaction between humanized antibodies and recombinant purified human RGMA was then calculated from the kinetic rate constants by the following formula: $K_D = k_{off}/k_{on}$.

Table 9: Affinity of chimeric and humanized anti-RGMA Monoclonal Antibodies

Name	k_{on} (1/M•s)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
chimeric 5F9	$7.65x10^5$	$2.36x10^{-3}$	3.09
h5F9.21	$3.55x10^5$	$2.69x10^{-3}$	7.59
h5F9.23	$5.07x10^5$	$2.21x10^{-3}$	4.37
h5F9.25	$5.70x10^5$	$3.29x10^{-3}$	5.78

Example 10: the humanised 5F9 antibodies neutralise chemorepulsive activity of human RGM A in a neuronal SH-SY5Y chemotaxis assay.

The chemotaxis assay measures chemotactic behaviour of cells in response to diffusible factors which can exert chemoattracticve or chemorepulsive activities. RGM A has been described as a protein acting in both membrane-bound (contact-dependent repulsion) and in soluble, diffusible form (chemorepulsive) and has therefore been evaluated in an hRGM A chemotaxis assay. To this aim RGM A – sensitive human neuroblastoma cells SH-SY5Y, carrying the RGM receptor Neogenin were used (Schaffar et al. J. Neurochemistry: 107:_ 418 – 431, 2008). SH-SY5Y cells were grown in Earle's Balanced Salt Solution/F12 (EBSS/F12) medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% non-essential amino acids (MEM-NEAA). For induction of neurite outgrowth cells were cultured in medium supplemented with 10 µM retinoic acid (RA). 5-6 hours later, cells were trypsinized and counted for plating in 24-well Boyden Chambers (BD Falcon 351185, HTS Multiwell System). 500 µl of the cell suspension (corresponding to $1x10^5$ cells) was added to the inner circle of each well. This inner circle is separated from the larger outer circle of each well by a PET membrane with 8 µm pore diameter. 600 µl of

medium +/- RGM A +/- antibodies were pipetted into the outer circle and cells were cultivated in the Multiwell Boyden Chambers overnight at 37°C. After incubation medium was aspirated and replaced by the fixative (2% paraformaledhyde. Fixation was continued for 2 hours at room temperature and after several wash steps with PBS permeabilization was performed using PBS containing 0,1% Triton-X-100 (15 min, RT). Staining of cells was done by incubating them for 1 hour in the dark in a solution of Alexa Fluor 488 Phalloidin 1:100 (Invitrogen A12379) and Bisbenzimide (H332456) 1: 100. After 2 wash steps with PBS, cultures were filled by PBS, sealed by parafilm and stored in the dark for the analsis with a fluorescence microscope (Zeiss Axiovert).

In the absence of hRGM A cells migrate through the membrane pores and can be counted after fixation and staining. Only those cells are counted which attached to the bottom of the membrane, because these cells had migrated through the PET membrane. Cells on the upper side of the membrane were carefully removed before the fixation procedure. This chemotaxis assay proved that presence of hRGM A significantly reduced the number of SH-SY5Y cells migrating through the membrane by more than 80%. The rat monoclonal 5F9, the chimeric human-rat 5F9 and the humanised 5F9 but not an isotype control rat monoclonal antibody (p21) partially or completely neutralised chemorepulsive activity of hRGM A at 10 µg/ml, manifested as larger numbers of cells found at the bottom of the membrane (Figure 10).

EXAMPLE 11: 5F9 induces regeneration of crushed, damaged optic nerve axons in a rat model of optic nerve injury.

The model of Optic Nerve Crush (or Optic Nerve Injury) provides an animal model to test various substances that stimulate regeneration of the optic nerve fibers and reduce the massive cell death of retinal ganglion cells.

The experiments were carried out in adult male Sprague Dawley and male Wistar rats obtained from Charles River (D) Laboratories (Germany). The animals are kept in single cages on a 12 : 12 h light/dark cycle with food and water *ad libitum*. The optic nerve crush is performed always only at the left eye by minimal anterior surgery. This is a minimally invasive method of optic nerve injury and was developed by us, according to human anterior visual surgical methods. Before and during the operation procedure animals are anesthetized by inhalation anesthesia

using Sevoflurane (Abbott GmbH Co. & KG, Delkenheim, Germany) and are fixed on the operation table by using jawclamp and adhesive tape for the limbs. A drop in body temperature is prevented by mounting animals on a heating pad. For anterior crush surgery of the rat optic nerve, the left eye is carefully freed of ligament and connective tissue. As a first step, a microsurgical cut (2-3 mm) of the adjacent tissue in the outer corner of the eye is performed. Then the optic nerve is exposed by using a pair of forceps to move to the side the eye muscles and lacrimal gland, thus sparing it. At the next step, the meninges were longitudinally opened by using microscissors to expose the optic nerve.

This results in a higher mobility of the eye and enables lateral rotation of the eye and access to its left optic nerve. The optic nerve is injured approximately 1-3 mm behind the eye, using a pair of forceps set to provide a fixed maximum pressure for 20-30 s. Special care is taken not to damage the vascular supply to the eye.

Local administration of antibodies and buffer solution.

After crush injury of the optic nerve male Sprague Dawley rats were treated locally with 5F9 antibody (n = 10 animals), the 8D1 control antibody (n = 10 animals) or with a vehicle control PBS (n = 10 animals). Experimenters were blinded for the different treatment groups. For local antibody application, small gelfoam pieces (length: 2,5 mm, width: 2,5 mm, height: 2,5 mm) were soaked with 20 µl of a 10 mg/ml antibody solution or with 20 µl of PBS and were placed directly adjacent to the optic nerve lesion site. After minimal invasive surgery and antibody application, animals were placed on paper towels in the clean cage mounted on the warmer to control the body temperature until they started to move. An ointment which contains antibiotic (Gentamytrex, Dr. Mann Pharma) was applied onto the eye to avoid bacterial infection and drying-out of the sclera. Carprofen (Rimadyl, 5 mg/kg, Pfizer GmbH, Karlsruhe) was applied i.p. for postoperative pain therapy directly after surgery and then twice per day for a 3 days period. The animals were observed and controlled regularly several hours directly after surgery and in the next days to make sure that all the animals survived and recovered from anesthesia and surgery. 5 weeks after surgery and antibody/vehicle application, animals were anesthesized with an overdose of Narcoren (40 – 60 mg/kg) and were perfused by injection of 4% paraformaledyde solution into the heart. Optic nerves were isolated and were

transferred into a 4% paraformaldeyde solution for 1 h at room temperature to ensure proper fixation of the tissue. Following postfixation, rat optic nerves were stored over night in a 30% sucrose solution (4°C). On the following day optic nerves were embedded in Tissue Tek, frozen and longitudinal sections with a thickness of 16 µm were made using a Cryostat.

For immunostainings, optic nerve sections were fixed with cold (-20°C) Acetone (10 min), washed 3x (5 min) with Tris Buffered Saline (TBS, Fluka 93312) and were blocked and permeabilised with TBS, containing 5% Bovine Serum Albumin and 1% Triton-X-100 (30 min), at room temperature). Residual BSA and detergent was removed by 2 separate wash steps (5 min each) with TBS. Sections were incubated for 1h at room temperature with a polyclonal rabbit anti-GAP-43 antibody (Abcam, ab 7562) diluted 1:100 in 5% BSA/TBS solution. After 3 wash steps with TBS, 0,1% Tween, sections were incubated for 1 h at room temperature with an Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Molecular Probes A11034), diluted 1: 1000 in 5% BSA/TBS, containing a 1:100 dilution of Bisbenzimid (H33258, 50 µg/ml) to visualize cell nuclei. Before embedding, stained sections were washed 3 times with TBS 0,1% Tween (5 min each step) and with distilled water. Sections were embedded in Fluoromount G, were covered by a coverslip and were stored in the dark for microscopic documentation.

Using a Zeiss fluorescence microscope images (Figure 11) of stained longitudinal sections were stored using the Zeiss Axiovison software. Single pictures of each nerve were mounted for analysis using Photoshop Image Analysis software (Adobe). Quantitative analysis was done in two different ways using the composite images of the optic nerves. The GAP-43-positive area at the lesion site was measured using the Axiovision software (Figure 12B). Independent of this first quantitative analysis single regenerating fibers (GAP-43 positive) were counted in 4 different areas: 0 - 200 µm, 200 - 400 µm, 400 - 600 µm and 600 - 1200 µm beyond the crush site. Data analysis and statistical evaluation of data was done with the help of the Graphpad Prism software. (Figure 12A)

Systemic administration of antibodies and buffer solution.

For systemic antibody delivery, male Wistar rats were treated systemically (intraperitoneally, ip) or intravenously, iv) with 5F9 antibody (n = 10 animals) or with a vehicle control PBS (n = 10 animals). Animals were injected two times and

injections were done on day 0 shortly after inducing nerve crush and on day 21 after crush. Doses of antibody given were 2 mg/kg on day 0 and 10 mg/kg on day 21. Animals were killed five weeks after crush injury and tissue isolation, preparation of sections, stainings and quantitative analyis was done as described above. As before experimenters were blinded for the two different treatment groups. Composite images of rat optic nerves are shown in Figure 13. In the 5F9 treated animals (A), many GAP-43 positive fibers are extending beyond the crush site in contrast to control animals treated with PBS (B). The crush site is located at the left margin and regenerating fibers are stained with an antibody to GAP-43. Many fibers are observed at the upper and lower rim of the optic nerve in 5F9-treated animals but not in PBS animals.

5F9 but not the vehicle control PBS significantly increased the number of regenerating GAP-43 positive fibers. Significantly more fibers ($p < 0.001$) were found in animals treated with 5F9 at distances 300 µm to 1800 µm, than in vehicle treated animals.Animals were treated with 5F9 at day 0 and d21 with 2 mg/kg and 10 mg/kg, respectively. Antibody or vehicle were given intraperitoneally or intravenously. Data are from analysis of 9 animals per group. Per animal 3 series of cryostat sections were analysed. (Figure 14A)

In a second experiment, male Wistar rats were treated after optic nerve injury systemically (iv) with 5F9 antibody (n = 10 animals), the 8D1 control antibody (n = 10 animals) or with the vehicle control PBS (n = 10 animals). Rats were injected once per week with 2 mg/kg of antibody given iv and injections were started immediately after optic nerve crush. All rats received 4 injections and animals were euthanized 5 weeks after crush injury. Experimenters were blinded and tissue processing and quantitative analysis was done as described before. 5F9 but not the vehicle control PBS significantly increased the number of regenerating GAP-43 positive fibers. Significantly more fibers ($p < 0.001$) were found in animals treated with 5F9 at distances 200 µm to 1400 µm, than in vehicle or control antibody treated animals. Animals were treated iv once per week for 4 weeks starting at day 0 with 5F9 (2 mg/kg per dose), with the control antibody 8D1 (2 mg/kg per dose) or with PBS. (Figure 14B)

EXAMPLE 11: 5F9 induces remyelination of crushed, damaged optic nerve axons in a rat model of optic nerve injury.

A marker for oligodendrocytes and myelin is myelin-basic protein (MBP). An antibody directed against MBP was used to answer the question if differences occurred in remyelination in the different treatment groups. To visualize the process of remyelination, optic nerve sections of animals treated systemically were fixed with cold (-20°C) Acetone (10 min), washed 3x (5 min) with Tris Buffered Saline (TBS, Fluka 93312) and were blocked and permeabilised with TBS, containing 5% Bovine Serum Albumin and 1% Triton-X-100 (30 min), at room temperature). Residual BSA and detergent was removed by 2 separate wash steps (5 min each) with TBS. Sections were incubated for 3h or over night at 4°C with a polyclonal rabbit anti-MBP antibody (Abcam, ab 2404) diluted 1:50 in 5% BSA/TBS solution. After 3 wash steps with TBS, 0,1% Tween, sections were incubated for 1 h at room temperature with an Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Molecular Probes A11034), diluted 1: 1000 in 5% BSA/TBS, containing a 1:100 dilution of Bisbenzimid (H33258, 50 µg/ml) to visualize cell nuclei. Before embedding, stained sections were washed 3 times with TBS 0,1% Tween (5 min each step) and with distilled water. Sections were embedded in Fluoromount G, were covered by a coverslip and were stored in the dark for microscopic documentation.

Using a Zeiss fluorescence microscope images of stained longitudinal sections were stored using the Zeiss Axiovison software. Single pictures of each nerve were mounted for analysis using Photoshop Image Analysis software (Adobe). Quantitative analysis was done in two different ways using the composite images of the optic nerves. The MBP-positive area at the lesion site was measured using the Axiovision software. Data analysis and statistical evaluation of data was done with the help of the Graphpad Prism software.

Animals were treated with 5F9 at day 0 and d21 with 2 mg/kg and 10 mg/kg, respectively. Antibody or vehicle were given intraperitoneally or intravenously. Composite images of rat optic nerves.

Myelination is visualized using an antibody directed against the myelin marker myelin basic protein MBP. Crush sites ate located in the middle of the composite nerves and the area is free in vehicle treated control animals (A and B). In the 5F9 treated animals (C and D), many MBP-positive structures are observed in the middle area (crush center) of the optic nerves. (Figure 15)

Myelination is visualized using an antibody directed against the myelin marker myelin basic protein MBP. The MBP area was measured using the Zeiss Axiovison

software. M1 and M2 are two independent measurements and M is the average measured MPB-positive area. 5F9 increases significantly ($p < 0.001$ versus the vehicle control) the MBP-area of the optic nerve crush site by a factor of 3,5. (Figure 16)

CLAIMS

1. A binding protein that dissociates from human RGM A with a K_D of 1 x 10^{-7} M or less and a k_{off} rate constant of 1 x 10^{-2} s^{-1} or less, both determined by surface plasmon resonance.

2. The binding protein that binds to human RGM A and neutralizes the neurite outgrowth inhibitory activity of human RGM A as determined in a standard in vitro assay.

3. The binding protein of one of the preceding claims, having at least one of the following additional functional characteristics:
binding to rat RGM A,
binding to human RGM C, and
binding to rat RGM C.

4. The binding protein of one of the preceding claims, wherein said binding protein modulates the ability of RGM to bind to at least one of its receptors.

5. The binding protein of claim 4, wherein said binding protein interacts with a receptor binding domain of human RGM A.

6. The binding protein of claim 4, wherein said binding protein modulates at least one of the following interactions:
binding of human RGM A to human BMP-4.
binding of hRGM A to human Neogenin,
binding of hRGM C to human Neogenin,
binding of human RGM A to human BMP-2.

7. The binding protein according to one of the preceding claims, which is a humanized antibody.

8. The binding protein according to one of the preceding claims, comprising an antigen binding domain, said binding protein capable of binding an epitope of

an RGM molecule, said antigen binding domain comprising at least one CDR comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of

GTTPDY (SEQ ID NO: 59),

FQATHDPLT (SEQ ID NO: 62),

ARRNEYYGSSFFDY (SEQ ID NO: 65),

LQGYIPPRT (SEQ ID NO: 68), and

modified CDR amino acid sequences having a sequence identity of at least 50% to one of said sequences.

9. A binding protein comprising an antigen binding domain, said binding protein capable of binding an epitope of an RGM molecule, said antigen binding domain comprising at least one CDR comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

GTTPDY (SEQ ID NO: 59),

FQATHDPLT (SEQ ID NO: 62),

ARRNEYYGSSFFDY (SEQ ID NO: 65),

LQGYIPPRT (SEQ ID NO: 68), and

modified CDR amino acid sequences having a sequence identity of at least 50% to one of said sequences.

10. The binding protein according to one of the preceding claims, further comprising at least one CDR comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 57, 58, 60, 61, 63, 64, 66, 67 and modified CDR amino acid sequences having a sequence identity of at least 50% to one of said sequences.

11. The binding protein according to any one of the preceding claims, wherein said at least one CDR comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of:

SEQ ID NO: 57	Residues 31-35 of SEQ ID NO.:34
SEQ ID NO: 58	Residues 50-66 of SEQ ID NO.:34
SEQ ID NO: 59	Residues 99-104 of SEQ ID NO.:34
SEQ ID NO: 60	Residues 24-39 of SEQ ID NO.:10

SEQ ID NO: 61	Residues 55-61 of SEQ ID NO.:10
SEQ ID NO: 62	Residues 94-102 of SEQ ID NO.:10
SEQ ID NO: 63	Residues 31-35 of SEQ ID NO.:55
SEQ ID NO: 64	Residues 50-66 of SEQ ID NO.:55
SEQ ID NO: 65	Residues 97-110 of SEQ ID NO.:55
SEQ ID NO: 66	Residues 24-34 of SEQ ID NO.:56
SEQ ID NO: 67	Residues 50-56 of SEQ ID NO.:56
SEQ ID NO: 68	Residues 89-97 of SEQ ID NO.:56

12. The binding protein according to claim 11, comprising at least 3 CDRs which are selected from a variable domain CDR set consisting of:

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

or a variable domain set wherein at least one of said 3 CDRs is a modified CDR amino acid sequence having a sequence identity of at least 50% to the parent sequence.

13. The binding protein according to claim 12, comprising at least two variable domain CDR sets.

14. The binding protein according to claim 13, wherein said at least two variable domain CDR sets are selected from a group consisting of:

VH 5F9 set& VL 5F9 set; and

VH 8D1 set & VL 8D1 set

15. The binding protein according to one of the preceding claims, further comprising a human acceptor framework.

16. The binding protein according to claim 15, wherein said human acceptor framework comprises at least one amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 and 33.

17. The binding protein according to claim 16, comprising a set of framework sequences selected from the group consisting of the sets:

VH3-48 set (Seq ID NO: 15, 16 and 17)
VH3-33 set (SEQ ID NO: 21, 22 and 23)
VH3-23 set (SEQ ID NO: 24, 25 and 26)
each of which sets being combined with a further framework sequence, selected from
JH3 (SEQ ID NO:18),
JH4 (SEQ ID NO:19),
JH6 (SEQ ID NO:20);
or
selected from the group consisting of the sets
A18 set: (SEQ ID NO: 27, 28 and 29)
A17 set: (SEQ ID NO: 31, 32 and 33)
each of which sets being combined with a further framework sequence, selected from JK2 (SEQ ID NO:2)

18. The binding protein of any one of the preceding claims comprising at least one heavy chain variable domain selected from SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, and 43; and/or at least one light chain variable domain selected from SEQ ID NO: 44, 45, and 46.

19. The binding protein of claim 18, wherein said binding protein comprises two variable domains, wherein said two variable domains have amino acid sequences selected from :
SEQ ID NOs: 35 & 44 ; 36 & 44 ; 37 & 44 ; 38 & 44 ; 39 & 44 ; 40 & 44 ; 41 & 44 ; 42 & 44 ; 43 & 44 ;
SEQ ID NOs: 35 & 45 ; 36 & 45 ; 37 & 45 ; 38 & 45 ; 39 & 45 ; 40 & 45 ; 41 & 45 ; 42 & 45 ; 43 & 45 ;
SEQ ID NOs: 35 & 46 ; 36 & 46 ; 37 & 46 ; 38 & 46 ; 39 & 46 ; 40 & 46 ; 41 & 46 ; 42 & 46 ; 43 & 46 ;

20. The binding protein according to any one of the claim 15 to 19, wherein said human acceptor framework comprises at least one framework region amino acid substitution at a key residue, said key residue selected from the group consisting of:
a residue adjacent to a CDR;
a glycosylation site residue;
a rare residue;
a residue capable of interacting with a RGM epitope;
a residue capable of interacting with a CDR;
a canonical residue;
a contact residue between heavy chain variable region and light chain variable region;
a residue within a Vernier zone;
an N-terminal residue capable of paraglutamate formation; and
a residue in a region that overlaps between a Chothia-defined variable heavy chain CDR1 and a Kabat-defined first heavy chain framework.

21. The binding protein according to claim 20, wherein said key residue are selected from the group consisting

(heavy chain sequence position): 1, 5, 37, 48, 49, 88, 98
(light chain sequence position): 2, 4, 41, 51

22. The binding protein of any one of the preceding claims, wherein the binding protein is a consensus human variable domain.

23. The binding protein of any one of the claims 15 to 22, wherein said human acceptor framework comprises at least one framework region amino acid substitution, wherein the amino acid sequence of the framework is at least 65% identical to the sequence of said human acceptor framework and comprises at least 70 amino acid residues identical to said human acceptor framework.

24. The binding protein of any one of the preceding claims, wherein said binding protein comprises at least one (framework mutated) variable domain having an amino acid sequence selected from the group consisting of:
SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50;
SEQ ID NO: 51, 52, 53, and 54

25. The binding protein of claim 24, wherein said binding protein comprises two variable domains, wherein said two variable domains have amino acid sequences selected from the groups consisting of:
SEQ ID NOs: 47 & 44 ; 47 & 45 ; 47 & 46 ; 47 & 51 ; 47 & 52 ; 47 & 53 ; 47 & 54 ;
SEQ ID NOs: 48 & 44 ; 48 & 45 ; 48 & 46 ; 48 & 51 ; 48 & 52 ; 48 & 53 ; 48 & 54 ;
SEQ ID NOs: 49 & 44 ; 49 & 45 ; 49 & 46 ; 49 & 51 ; 49 & 52 ; 49 & 53 ; 49 & 54 ;
SEQ ID NOs: 50 & 44 ; 50 & 45 ; 50 & 46 ; 50 & 51 ; 50 & 52 ; 50 & 53 ; 50 & 54 ;

26. The binding protein of any one of the preceding claims, wherein said binding protein is capable of binding a target, selected from RGM molecules.

27. The binding protein of any one of the preceding claims capable of binding to human RGM A.

28. The binding protein of claim 27, having at least one of the following additional functional characteristics:
binding to rat RGM A,
binding to human RGM C,
binding to rat RGM C.

29. The binding protein of any one of the preceding claims, wherein the binding protein is capable of modulating a biological function of a target, selected from RGM molecules.

30. The binding protein of claim 29, wherein said binding protein modulates the ability of RGM to bind to at least one of its receptors.

31. The binding protein of claim 30, wherein said binding protein modulates at least one of the following interactions:
binding of human RGM A to human BMP-4.
binding of hRGM A to human Neogenin,
binding of hRGM C to human Neogenin,
binding of human RGM A to human BMP-2,

32. The binding protein of any one of the preceding claims, wherein said binding protein is capable of inhibiting an RGM biological activity.

33. The binding protein of claim 32, wherein the RGM molecule is RGM A.

34. The binding protein of claim 33, wherein the RGM A is selected from human, cynomolgus monkeys, rat, chick, frog, and fish.

35. The binding protein of any one of the preceding claims, wherein said binding protein has an on rate constant (k_{on}) to said target selected from the group consisting of: at least about $10^2 M^{-1}s^{-1}$; at least about $10^3 M^{-1}s^{-1}$; at least about $10^4 M^{-1}s^{-1}$; at least about $10^5 M^{-1}s^{-1}$; at least about $10^6 M^{-1}s^{-1}$, and at least about $10^7 M^{-1}s^{-1}$ as measured by surface plasmon resonance.

36. The binding protein of any one of the preceding claims, wherein said binding protein has an off rate constant (k_{off}) to said target selected from the group consisting of: at most about $10^{-2}s^{-1}$; at most about $10^{-3}s^{-1}$; at most about $10^{-4}s^{-1}$; at most about $10^{-5}s^{-1}$; and at most about $10^{-6}s^{-1}$, as measured by surface plasmon resonance.

37. The binding protein of any one of the preceding claims, wherein said binding protein has a dissociation constant (K_D) to said target selected from the group consisting of: at most about 10^{-7} M; at most about 10^{-8} M; at most about 10^{-9} M; at most about 10^{-10} M; at most about 10^{-11} M; at most about 10^{-12} M; and at most 10^{-13} M.

38. An antibody construct comprising a binding protein described in any one of the preceding claims, said antibody construct further comprising a linker polypeptide or an immunoglobulin constant domain.

39. The antibody construct according to claim 38, wherein said binding protein is selected from the group consisting of:
an immunoglobulin molecule,
a monoclonal antibody,
a chimeric antibody,
a CDR-grafted antibody,
a humanized antibody,
a Fab,
a Fab',
a F(ab')2,
a Fv,
a disulfide linked Fv,
a scFv,
a single domain antibody,
a diabody,
a multispecific antibody,
a dual specific antibody,
a dual variable domain immunoglobulin, and

a bispecific antibody.

40. The antibody construct according to any on of the claims 38 and 39, wherein said binding protein comprises a heavy chain immunoglobulin constant domain selected from the group consisting of;
a human IgM constant domain,
a human IgG1 constant domain,
a human IgG2 constant domain,
a human IgG3 constant domain,
a human IgG4 constant domain,
a human IgE constant domain,
a human IgD constant domain,
a human IgA1 constant domain
a human IgA2 constant domain
a human IgY constant domain and
and corresponding mutated domains.

41. The antibody construct according to any on of the claims 38 to 40, comprising an immunoglobulin constant domain having an amino acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO: 11, 12, 13 and 14

42. An antibody conjugate comprising an antibody construct described in any one of claims 38 to 41, said antibody conjugate further comprising an agent selected from the group consisting of; an immunoadhension molecule, an imaging agent, a therapeutic agent, and a cytotoxic agent.

43. The antibody conjugate according to claim 42, wherein said agent is an imaging agent selected from the group consisting of a radiolabel, an enzyme, a fluorescent label, a luminescent label, a bioluminescent label, a magnetic label, and biotin.

44. The antibody conjugate according to claim 43, wherein said imaging agent is a radiolabel selected from the group consisting of: ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, and ^{153}Sm.

45. The antibody conjugate according to claim 43, wherein said agent is a therapeutic or cytotoxic agent selected from the group consisting of; an anti-metabolite, an alkylating agent, an antibiotic, a growth factor, a cytokine, an anti-angiogenic agent, an anti-mitotic agent, an anthracycline, toxin, and an apoptotic agent.

46. The antibody construct according to any on of the claims 38 to 41, wherein said binding protein possesses a human glycosylation pattern.

47. The antibody conjugate according to any on of the claims 42 to 45, wherein said binding protein possesses a human glycosylation pattern.

48. The binding protein according to any one of the claims 1 to 37, wherein said binding protein exists as a crystal.

49. The antibody construct according to any one of the claims 38 to 41, wherein said antibody construct exists as a crystal.

50. The antibody conjugate according to any one of the claims 42 to 45, wherein said antibody construct exists as a crystal.

51. The binding protein according to claim 48, wherein said crystal is a carrier-free pharmaceutical controlled release crystal.

52. The antibody construct according to claim 49, wherein said crystal is a carrier-free pharmaceutical controlled release crystal.

53. The antibody conjugate according to claim 50, wherein said crystal is a carrier-free pharmaceutical controlled release crystal.

54. The binding protein according to claim 48, wherein said binding protein has a greater half life in vivo than the soluble counterpart of said binding protein.

55. The antibody construct according to claim 49, wherein said antibody construct has a greater half life in vivo than the soluble counterpart of said antibody construct.

56. The antibody conjugate according to claim 50, wherein said antibody conjugate has a greater half life in vivo than the soluble counterpart of said antibody conjugate.

57. The binding protein according to claim 48, wherein said binding protein retains biological activity.

58. The antibody construct according to claim 49, wherein said antibody construct retains biological activity.

59. The antibody conjugate according to claim 50, wherein said antibody conjugate retains biological activity.

60. An isolated nucleic acid encoding a binding protein amino acid sequence of any one of claims 1-37.

61. An isolated nucleic acid encoding an antibody construct amino acid sequence of any one of claims 38-41.

62. An isolated nucleic acid encoding an antibody conjugate amino acid sequence of any one of claims 42-45.

63. A vector comprising an isolated nucleic acid according to any one of claims 60 to 62.

64. The vector of claim 63 wherein said vector is selected from the group consisting of pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pHybE, and pBJ.

65. A host cell comprising a vector according to any one of claims 63 and 64.

66. The host cell according to claim 65, wherein said host cell is a prokaryotic cell.

67. The host cell according to claim 66, wherein said host cell is E.coli.

68. The host cell according to claim 67, wherein said host cell is a eukaryotic cell.

69. The host cell according to claim 68, wherein said eukaryotic cell is selected from the group consisting of protist cell, animal cell, plant cell and fungal cell.

70. The host cell according to claim 69, wherein said eukaryotic cell is an animal cell selected from the group consisting of; a mammalian cell, an avian cell, and an insect cell.

71. The host cell according to claim 69, wherein said host cell is selected from HEK Cells, CHO cells COS cells and yeast cells.

72. The host cell according to claim 71, wherein said yeast cell is *Saccharomyces cerevisiae*.

73. The host cell according to claim 70, wherein said host cell is an insect Sf9 cell.

74. A method of producing a protein capable of binding RGM, comprising culturing a host cell of any one of claims 65 to 73 in culture medium under conditions sufficient to produce a binding protein capable of binding RGM.

75. A protein produced according to the method of claim 74.

76. A composition for the release of a binding protein said composition comprising (a) a formulation, wherein said formulation comprises a crystallized product protein according to any one of claims 48 to 50, and an ingredient; and (b) at least one polymeric carrier.

77. The composition according to claim 76, wherein said polymeric carrier is a polymer selected from one or more of the group consisting of: poly (acrylic acid), poly (cyanoacrylates), poly (amino acids), poly (anhydrides), poly (depsipeptide), poly (esters), poly (lactic acid), poly (lactic-co-glycolic acid) or PLGA, poly (b-hydroxybutryate), poly (caprolactone), poly (dioxanone); poly (ethylene glycol), poly ((hydroxypropyl) methacrylamide, poly [(organo) phosphazene], poly (ortho esters), poly (vinyl alcohol), poly (vinylpyrrolidone), maleic anhydride- alkyl vinyl ether copolymers, pluronic polyols, albumin, alginate, cellulose and cellulose derivatives, collagen, fibrin, gelatin, hyaluronic acid, oligosaccharides, glycaminoglycans, sulfated polyeaccharides, blends and copolymers thereof.

78. The composition according to claim 76, wherein said ingredient is selected from the group consisting of albumin, sucrose, trehalose, lactitol, gelatin, hydroxypropyl-ß- cyclodextrin, methoxypolyethylene glycol and polyethylene glycol.

79. A method for treating a mammal comprising the step of administering to the mammal an effective amount of the composition according to any one of the claims 77 and 78.

80. A pharmaceutical composition comprising the product of any one of claims 1 to 59, and a pharmaceutically acceptable carrier.

81. The pharmaceutical composition of claim 80, wherein said pharmaceutically acceptable carrier functions as adjuvant useful to increase the absorption, or dispersion of said binding protein.

82. The pharmaceutical composition of claim 81, wherein said adjuvant is hyaluronidase.

83. The pharmaceutical composition of claim 82 further comprising at least one additional therapeutic agent for treating a disorder in which RGM activity is detrimental.

84. The pharmaceutical composition of claim 83, wherein said additional agent is selected from the group consisting of: Therapeutic agent, imaging agent, cytotoxic agent, angiogenesis inhibitors; kinase inhibitors; co-stimulation molecule blockers; adhesion molecule blockers; anti-cytokine antibody or functional fragment thereof; methotrexate; cyclosporin; rapamycin; FK506; detectable label or reporter; a TNF antagonist; an antirheumatic; a muscle relaxant, a narcotic, a non-steroid anti-inflammatory drug (NSAID), an analgesic, an anesthetic, a sedative, a local anesthetic, a neuromuscular blocker, an antimicrobial, an antipsoriatic, a corticosteriod, an anabolic steroid, an erythropoietin, an immunization, an immunoglobulin, an immunosuppressive, a growth hormone, a hormone replacement drug, a radiopharmaceutical, an antidepressant, an antipsychotic, a stimulant, an asthma medication, a beta agonist, an inhaled steroid, an epinephrine or analog, a cytokine, and a cytokine antagonist.

85. A method for reducing human RGM A activity comprising contacting human RGM A with the product of any one of claims 1 to 59 such that human RGM A activity is reduced.

86. A method for decreasing hRGM A binding to Neogenin receptor in a subject in need thereof, comprising the step of administering to the subject a product of any one of claims 1 to 59.

87. A method for decreasing hRGM A binding to bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 (BMP-2 and BMP-4) in a subject in need thereof, comprising the step of administering to the subject a product of any one of claims 1 to 59.

88. A method of treating a subject for a disorder associated with RGM A activity comprising the step of administering alone or in combination with other therapeutic agents a product of any one of claims 1 to 59.

89. A method for reducing RGM A activity in a subject suffering from a disorder in which RGM A activity is detrimental, comprising administering to the subject a prouct of any one of claims 1 to 59, alone or in combination with other therapeutic agents.

90. The method of claim 89, wherein the disorder comprises neurological diseases selected from the group comprising Amyotrophic Lateral Sclerosis, Brachial Plexus Injury, Brain Injury, including traumatic brain injury, Cerebral Palsy, Guillain Barre, Leukodystrophies, Multiple Sclerosis, Post Polio, Spina Bifida, Spinal Cord Injury, Spinal Muscle Atrophy, Spinal Tumors, Stroke, Transverse Myelitits; dementia, senile dementia, mild cognitive impairment, Alzheimer-related dementia, Huntington's chorea, tardive dyskinesia, hyperkinesias, manias, Morbus Parkinson, steel-Richard syndrome, Down's syndrome, myasthenia gravis, nerve trauma, vascular amyloidosis, cerebral hemorrhage I with amyloidosis, brain inflammation, acute confusion disorder, amyotrophic lateral sclerosis, glaucoma and Alzheimer's disease.

91. An isolated CDR of a binding protein as defined in any one of the claims 1 to 51.

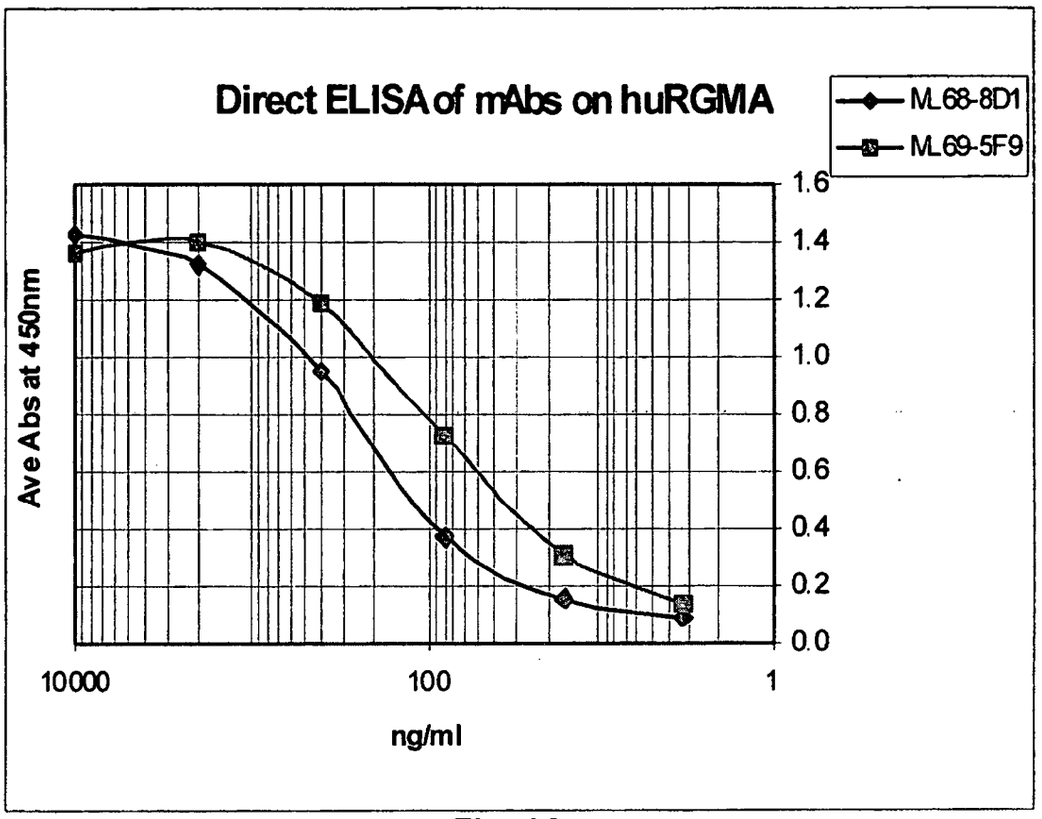

Direct ELISA of mAbs on huRGMA
ML68-8D1
ML69-5F9
Ave Abs at 450nm
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
10000
100
1
ng/ml

Fig. 1A

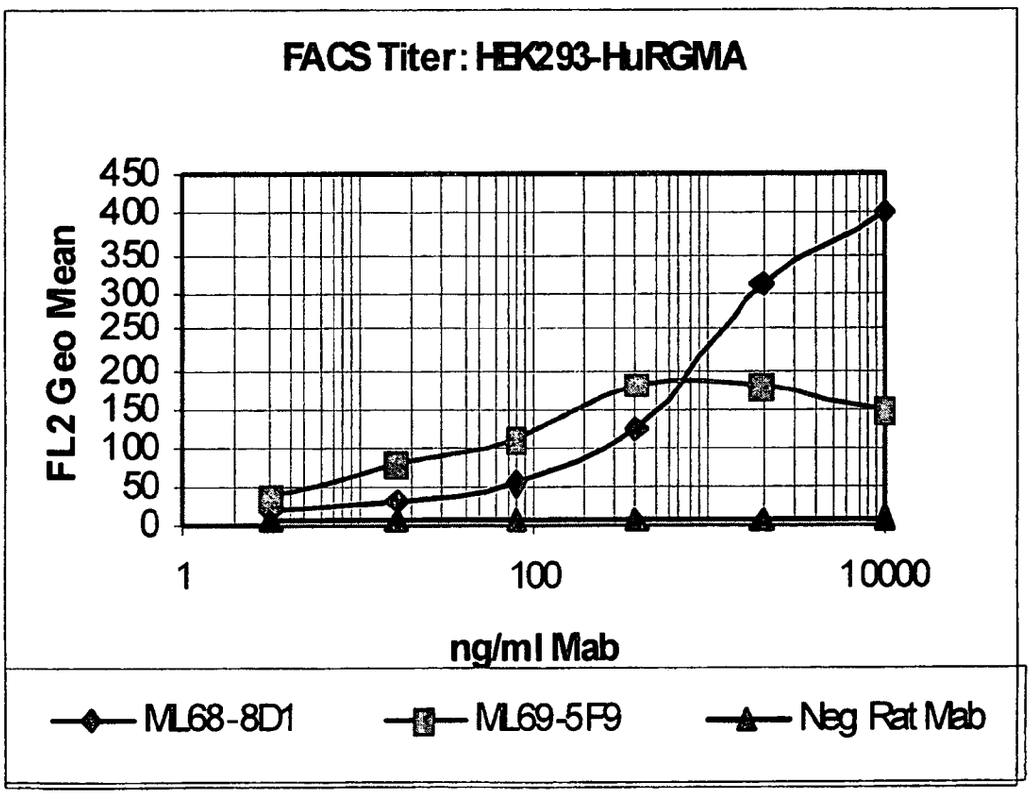

FACS Titer: HEK293-HuRGMA
FL2 Geo Mean
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
1
100
10000
ng/ml Mab
ML68-8D1
ML69-5F9
Neg Rat Mab

Fig. 1B

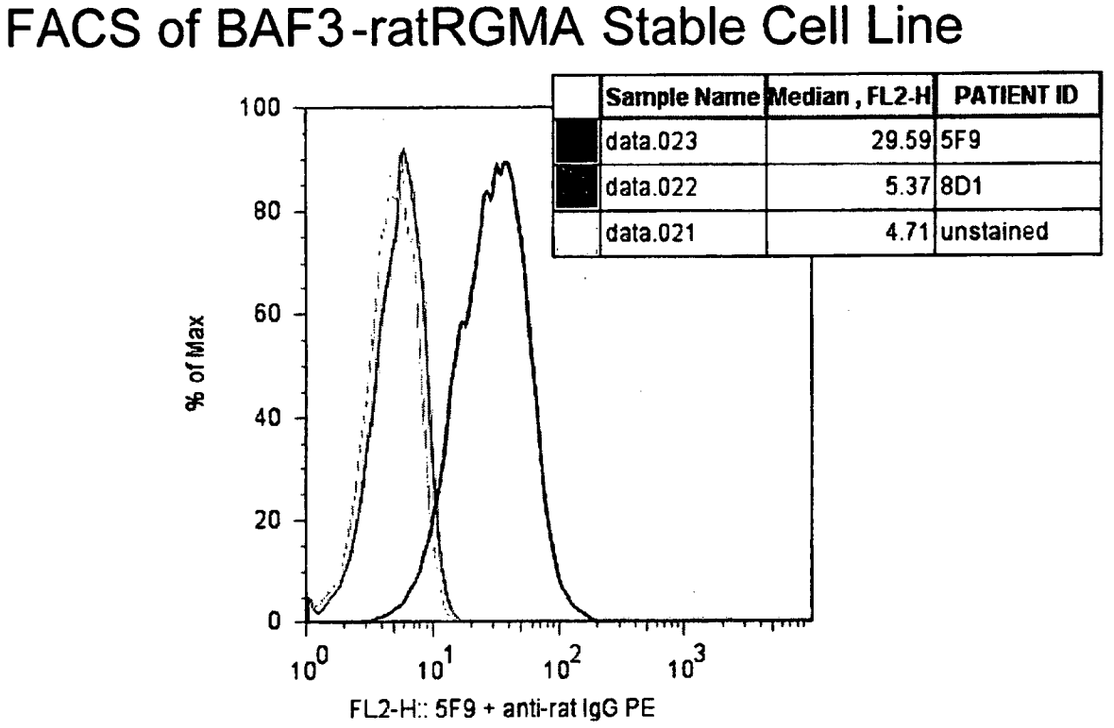

FACS of BAF3-ratRGMA Stable Cell Line
Sample Name
Median , FL2-H
PATIENT ID
data.023
29.59
5F9
data.022
5.37
8D1
data.021
4.71
unstained
% of Max
100
80
60
40
20
0
10^0
10^1
10^2
10^3
FL2-H:: 5F9 + anti-rat IgG PE

Fig. 1C

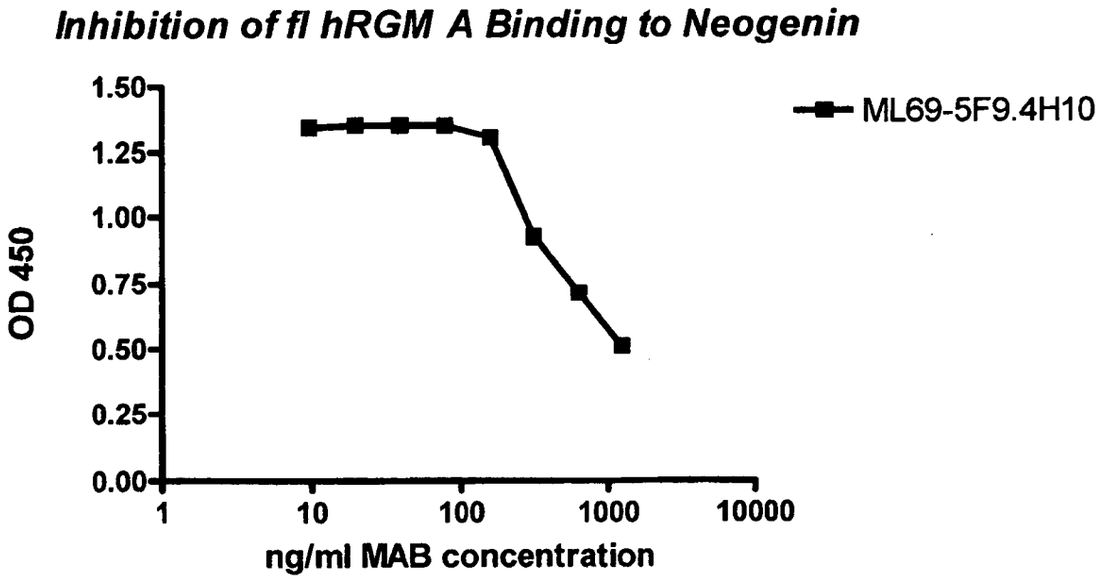

Inhibition of fl hRGM A Binding to Neogenin
ML69-5F9.4H10
OD 450
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
1
10
100
1000
10000
ng/ml MAB concentration

Fig. 2

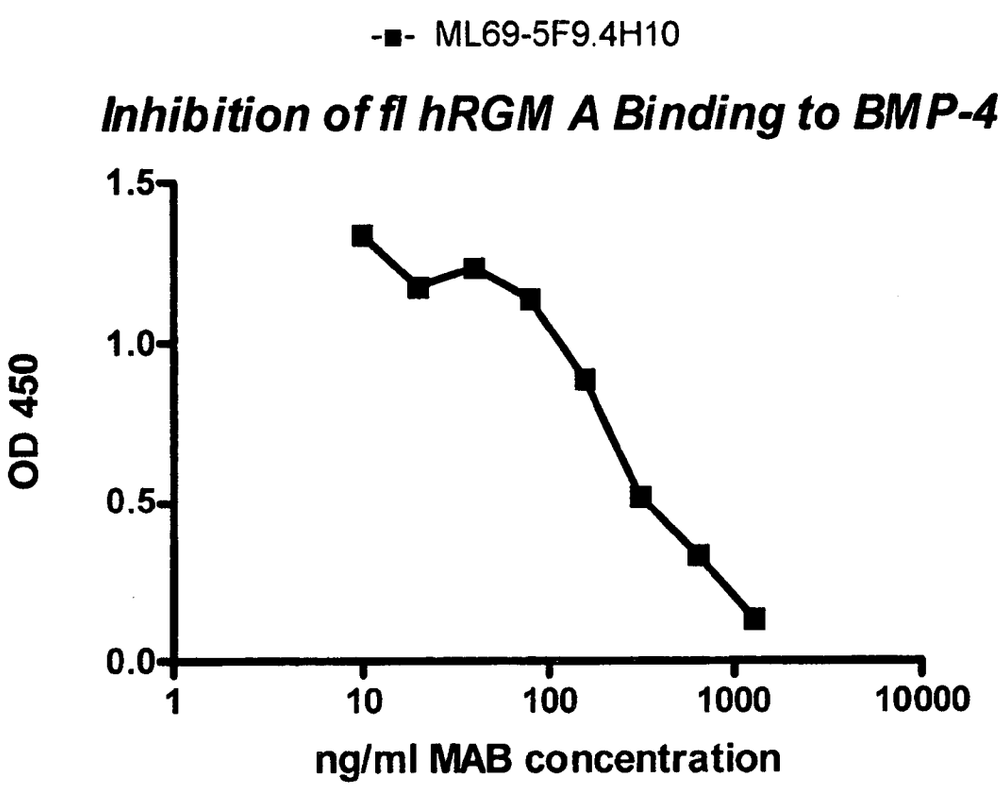

-■- ML69-5F9.4H10
Inhibition of fl hRGM A Binding to BMP-4
OD 450
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
10000
ng/ml MAB concentration

Fig. 3

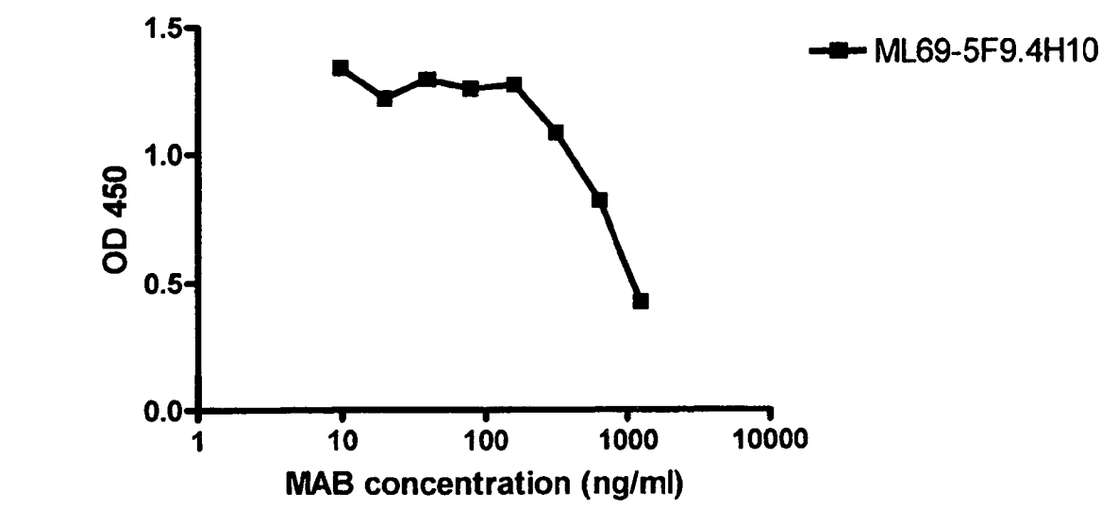

Inhibition of Fragment 0 binding to BMP-4 by MAB 5F9
ML69-5F9.4H10
OD 450
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
100
1000
10000
MAB concentration (ng/ml)

Fig. 4

Inhibition of binding of fc-conjugated, full length hRGM A to BMP-2

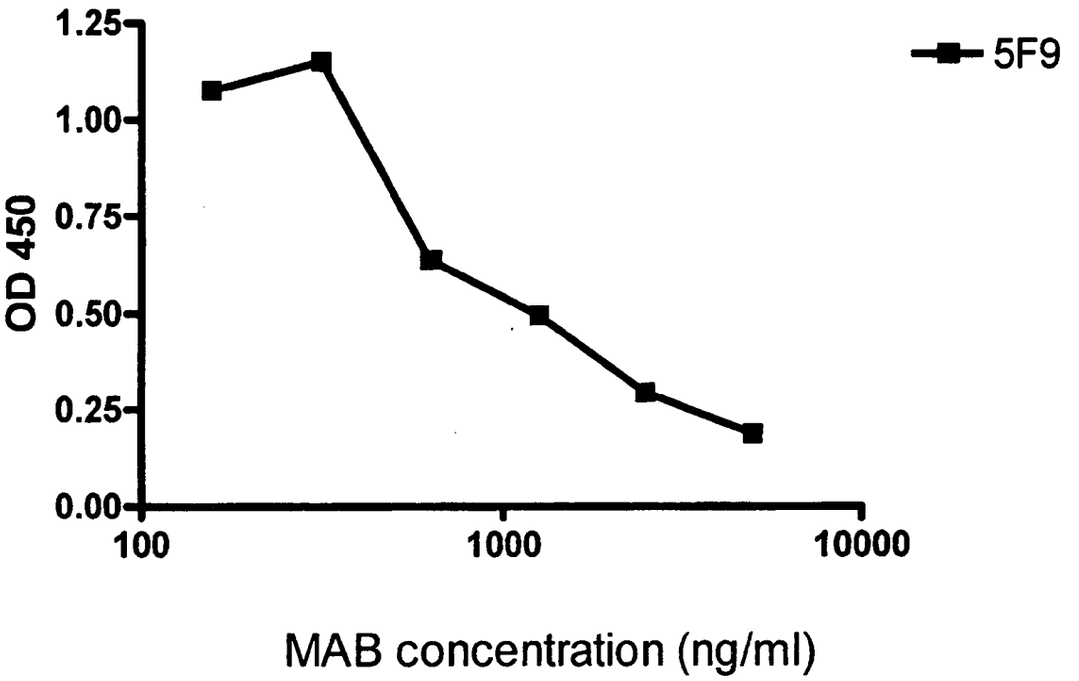


Fig. 5

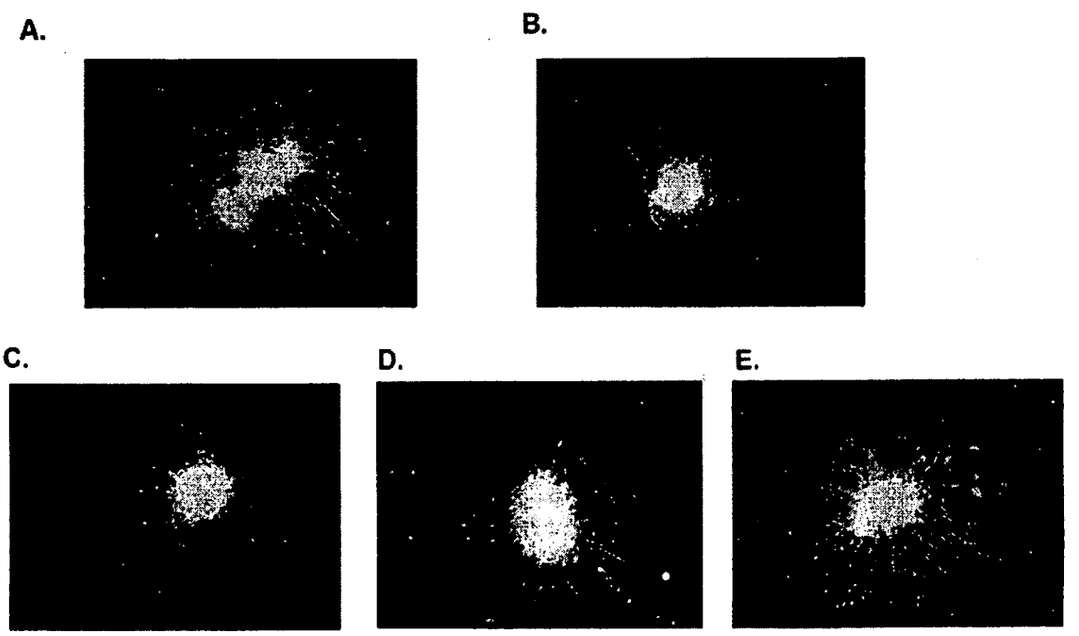


Fig. 6

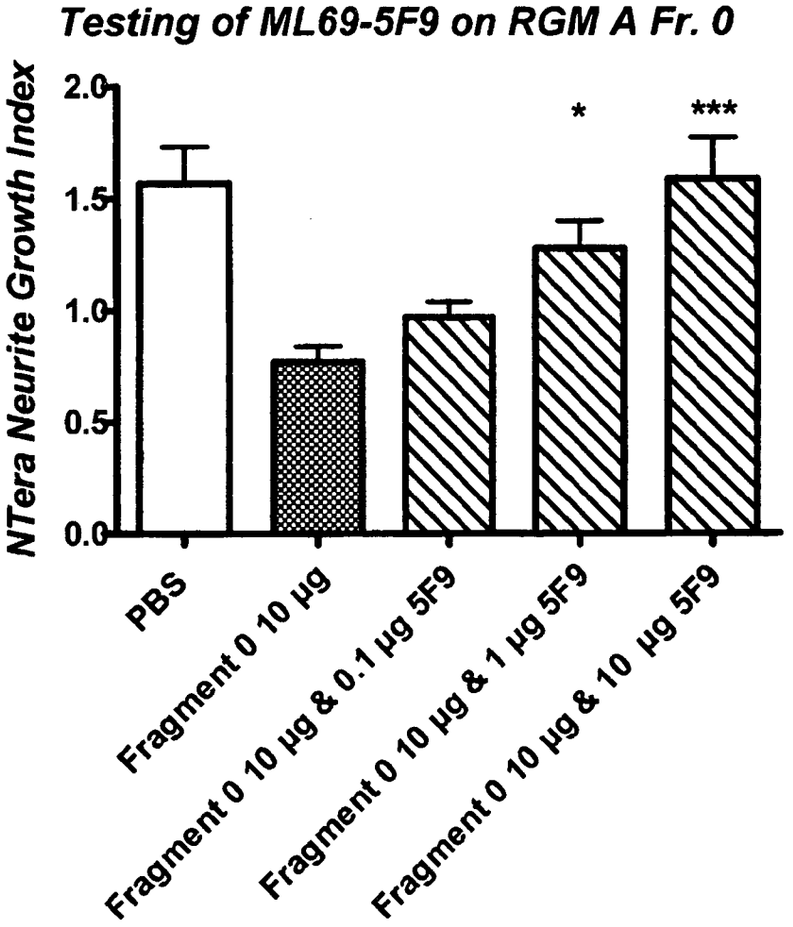

Testing of ML69-5F9 on RGM A Fr. 0
NTera Neurite Growth Index
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
***
PBS
Fragment 0 10 µg
Fragment 0 10 µg & 0.1 µg 5F9
Fragment 0 10 µg & 1 µg 5F9
Fragment 0 10 µg & 10 µg 5F9

Fig. 7

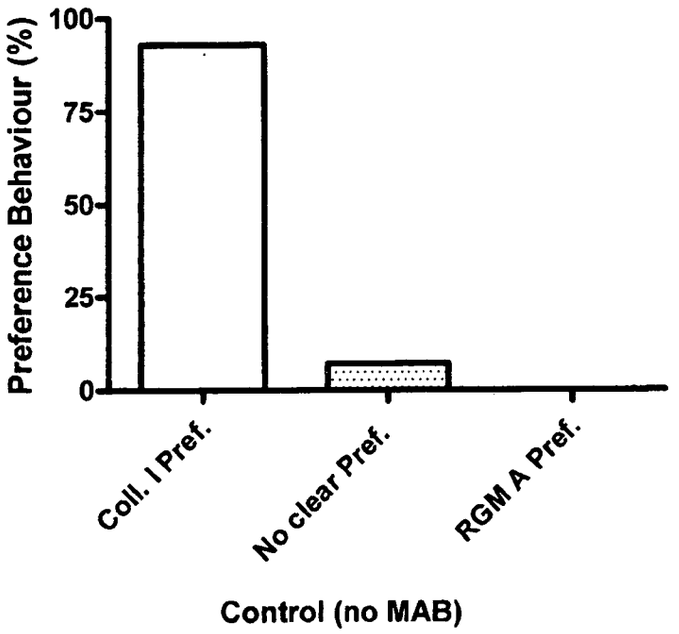

Preference Behaviour (%)
100
75
50
25
0
Coll. I Pref.
No clear Pref.
RGM A Pref.
Control (no MAB)

Fig. 8A

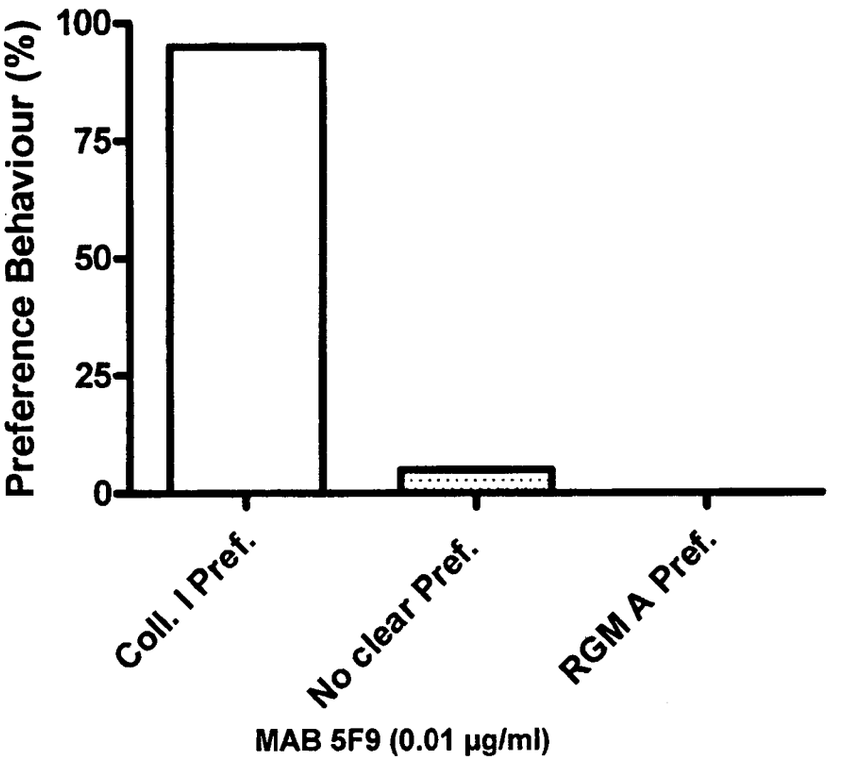

Preference Behaviour (%)
100
75
50
25
0
Coll. I Pref.
No clear Pref.
RGM A Pref.
MAB 5F9 (0.01 µg/ml)

Fig. 8B

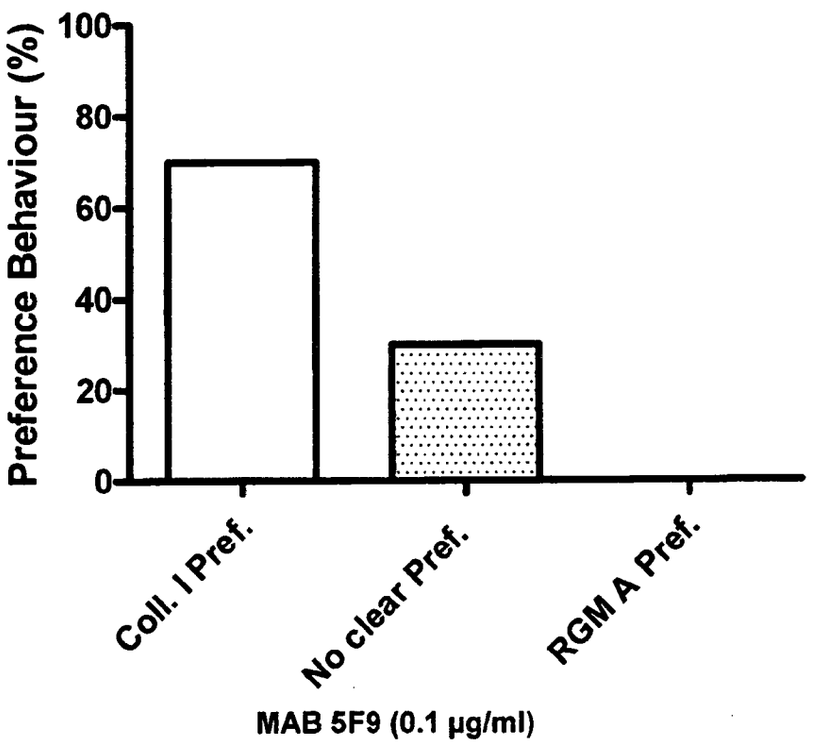

Preference Behaviour (%)
100
80
60
40
20
0
Coll. I Pref.
No clear Pref.
RGM A Pref.
MAB 5F9 (0.1 µg/ml)

Fig. 8C

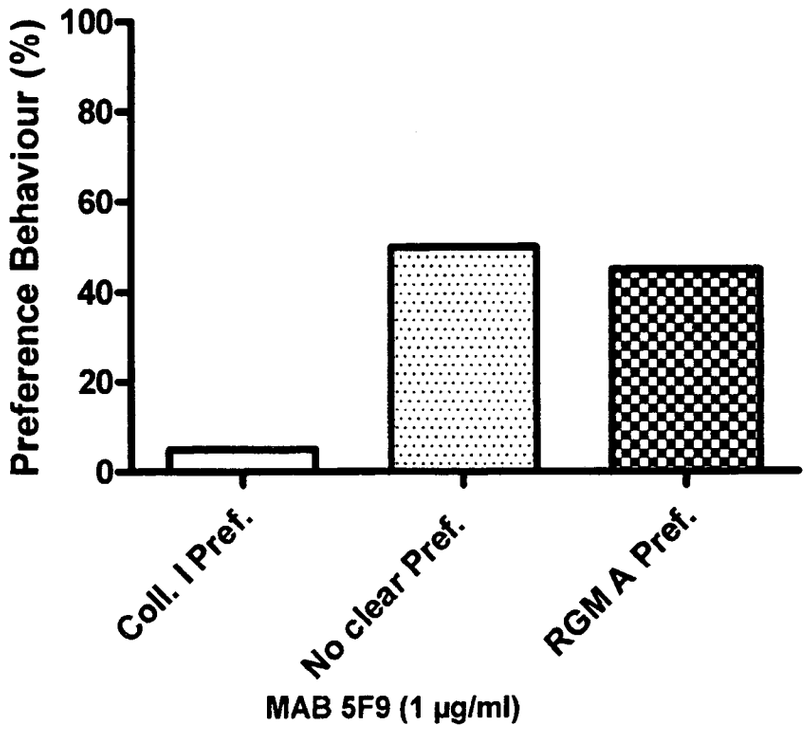

Preference Behaviour (%)
100
80
60
40
20
0
Coll. I Pref.
No clear Pref.
RGM A Pref.
MAB 5F9 (1 µg/ml)

Fig. 8D

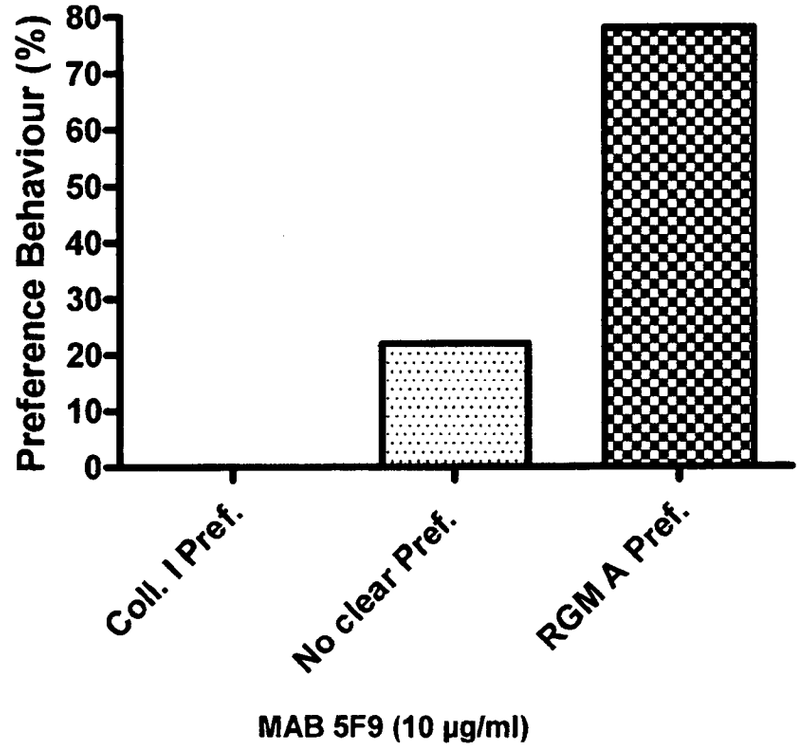

Preference Behaviour (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Coll. I Pref.
No clear Pref.
RGM A Pref.
MAB 5F9 (10 µg/ml)

Fig. 8E

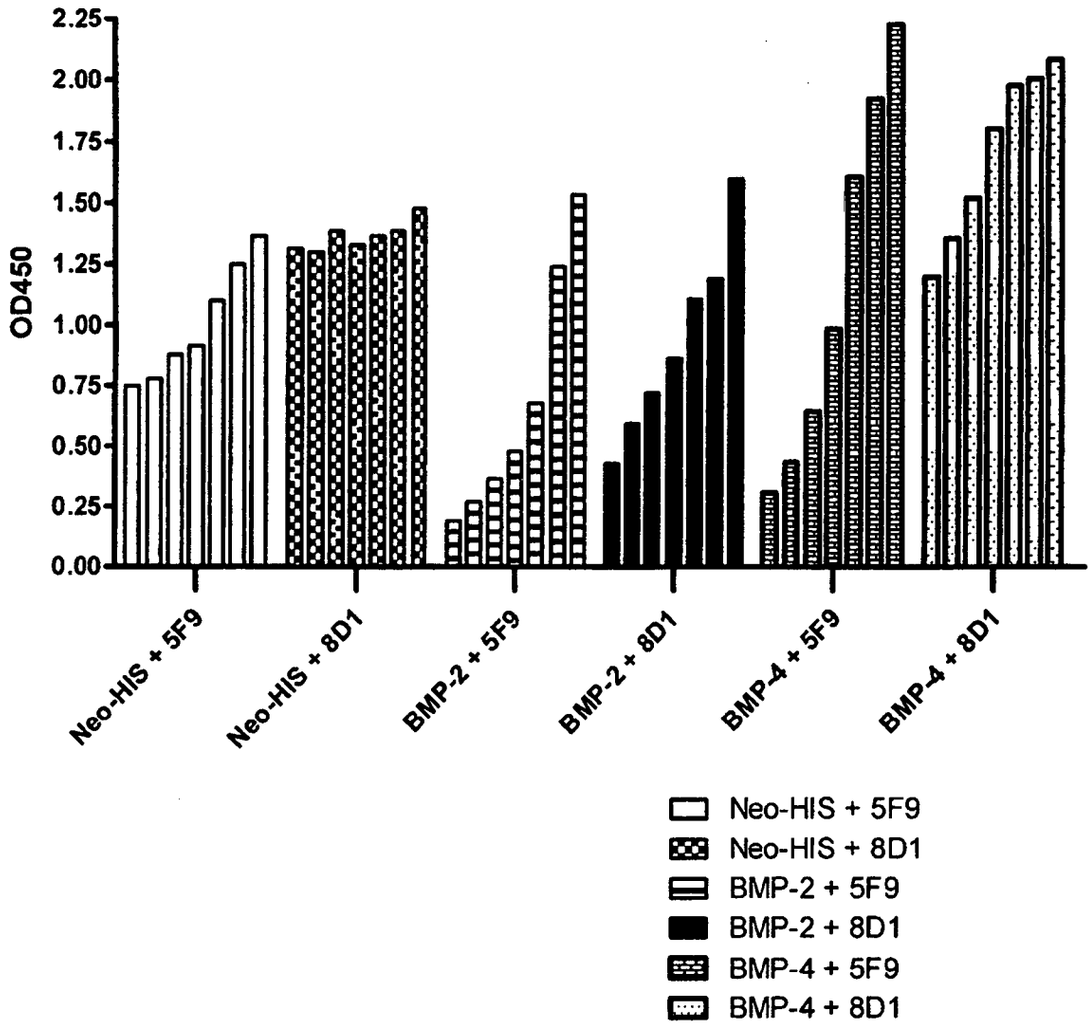
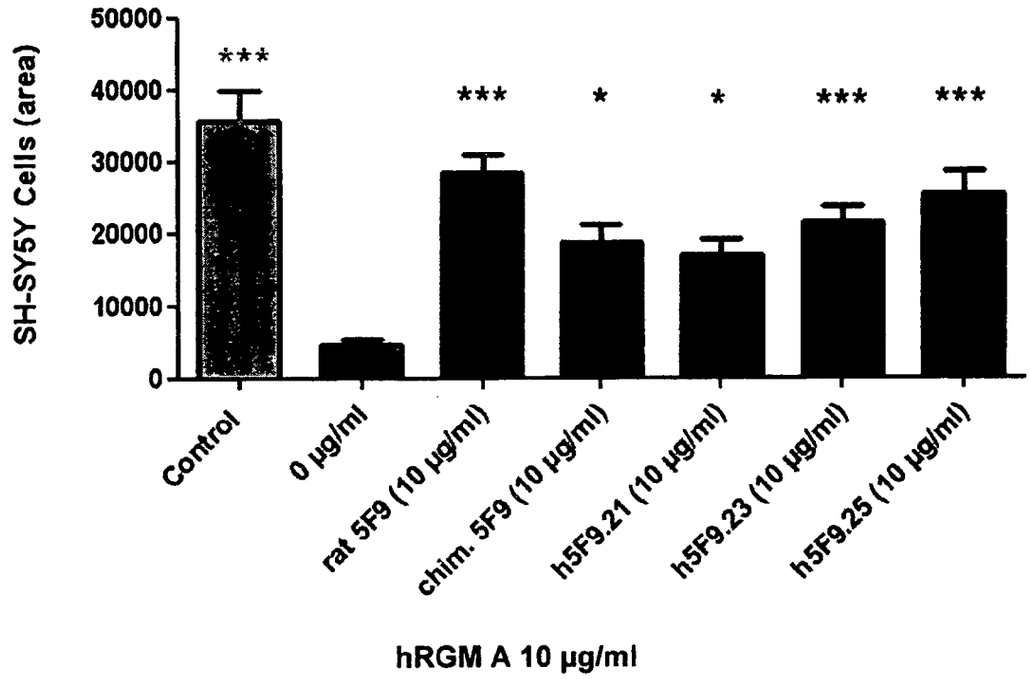

OD450
2.25
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Neo-HIS + 5F9
Neo-HIS + 8D1
BMP-2 + 5F9
BMP-2 + 8D1
BMP-4 + 5F9
BMP-4 + 8D1
Neo-HIS + 5F9
Neo-HIS + 8D1
BMP-2 + 5F9
BMP-2 + 8D1
BMP-4 + 5F9
BMP-4 + 8D1

Fig. 9

Chemotaxis Assay (no EGF): Testing of rat, chimeric, humanized 5F9, n = 2



* p < 0.05: significance vs. 5F9 0 µg/ml
*** p < 0.001: significance vs. 5F9 0 µg/ml
*** p < 0.001: significance vs. 5F9 0 µg/ml

Fig. 10

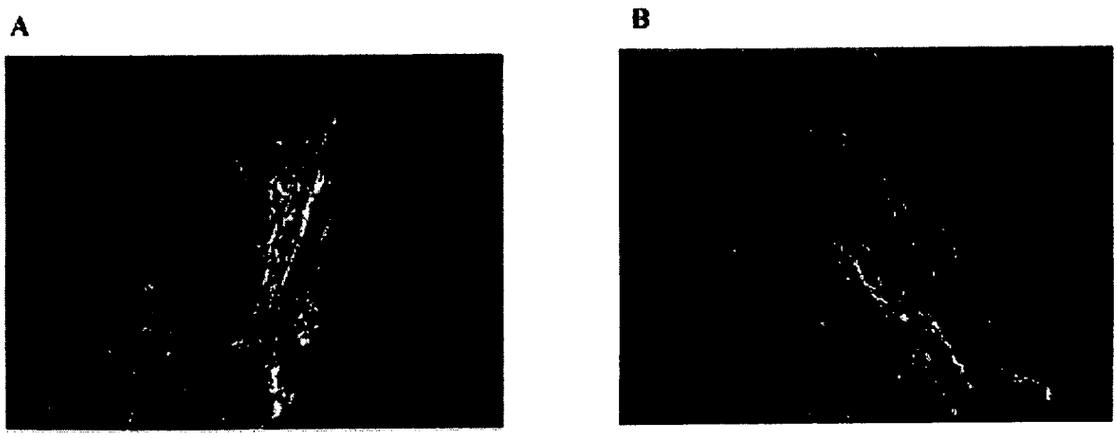
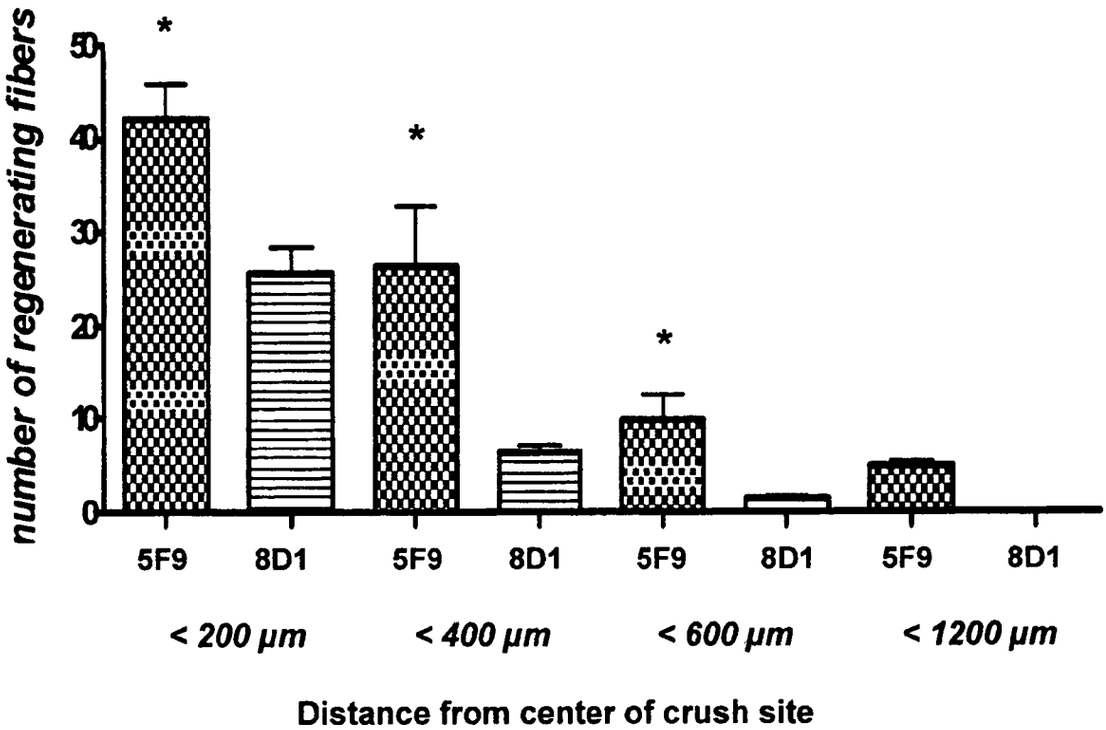


Fig. 11


number of regenerating fibers
50
40
30
20
10
0
*
*
*
5F9
8D1
5F9
8D1
5F9
8D1
5F9
8D1
< 200 µm
< 400 µm
< 600 µm
< 1200 µm
Distance from center of crush site

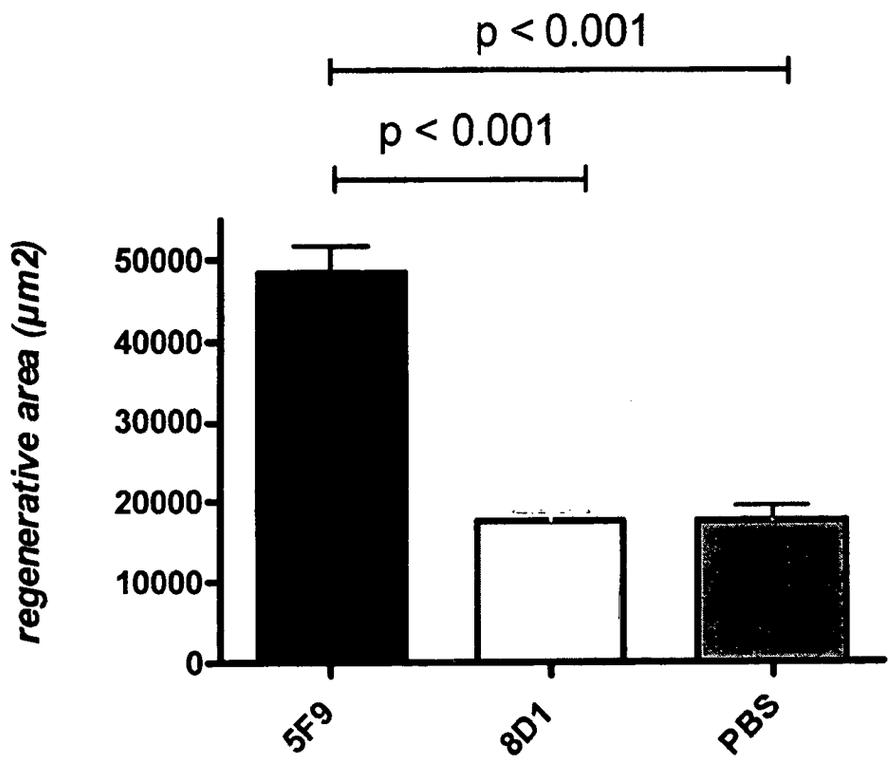

p < 0.001
p < 0.001
regenerative area (µm2)
50000
40000
30000
20000
10000
0
5F9
8D1
PBS

Fig. 12

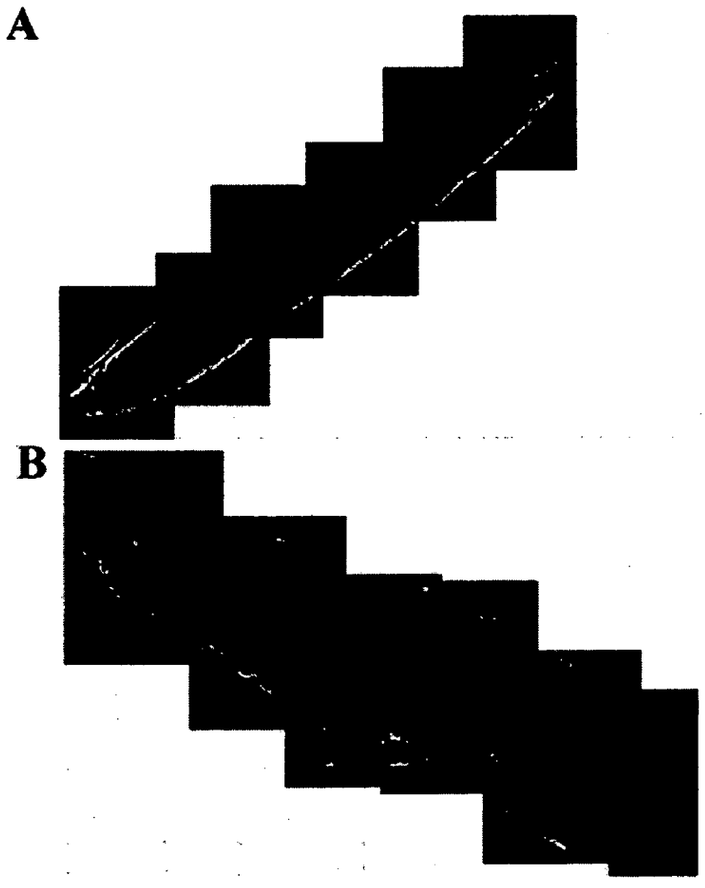


Fig. 13

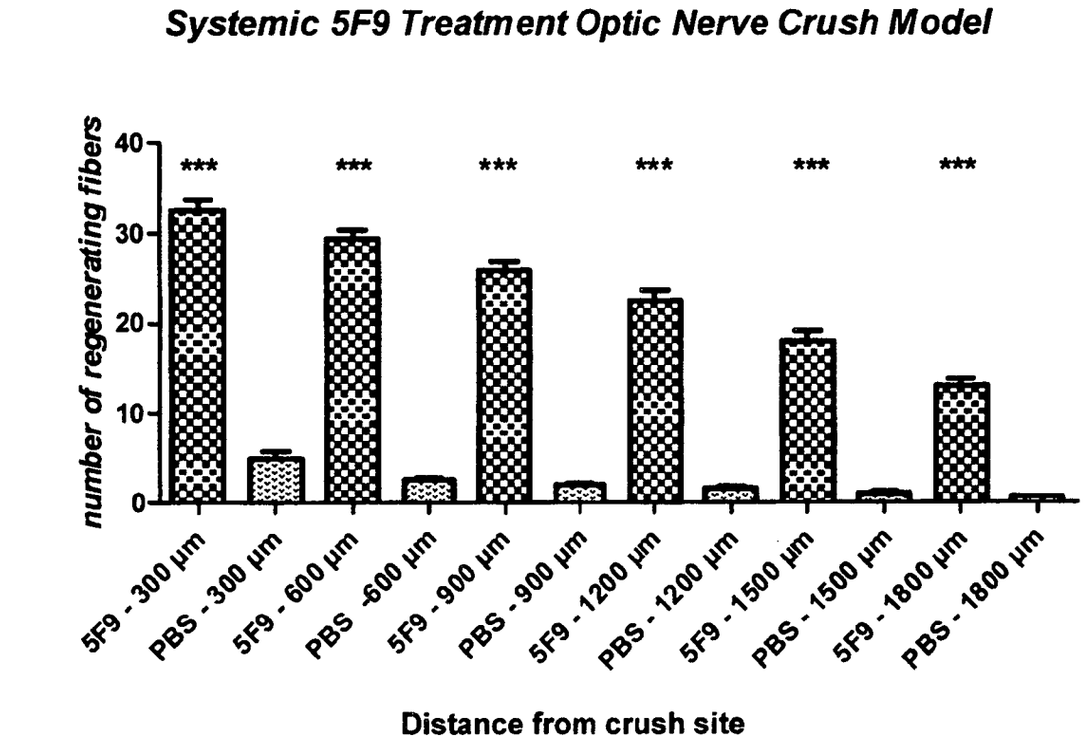


Fig. 14A

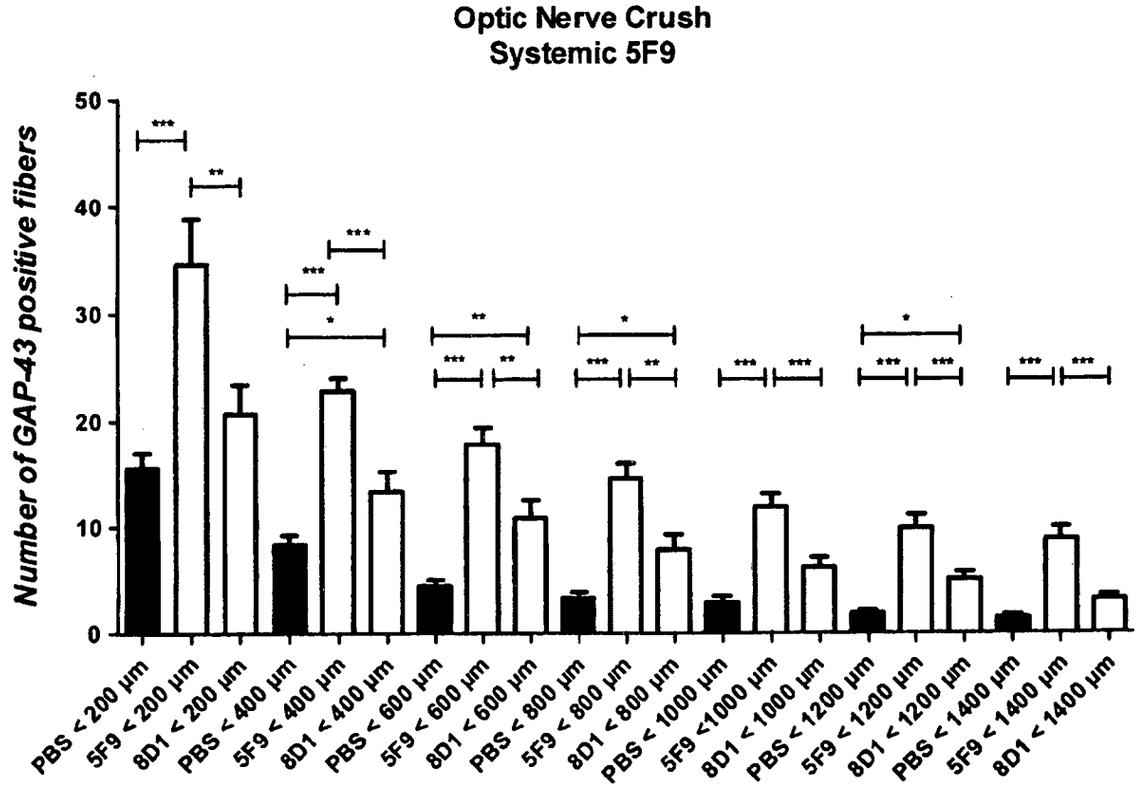


Fig. 14B

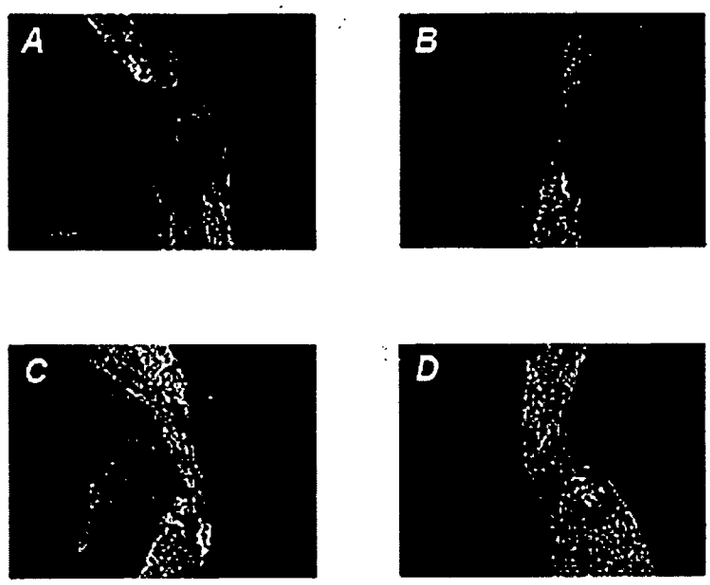

A
B
C
D

Fig. 15

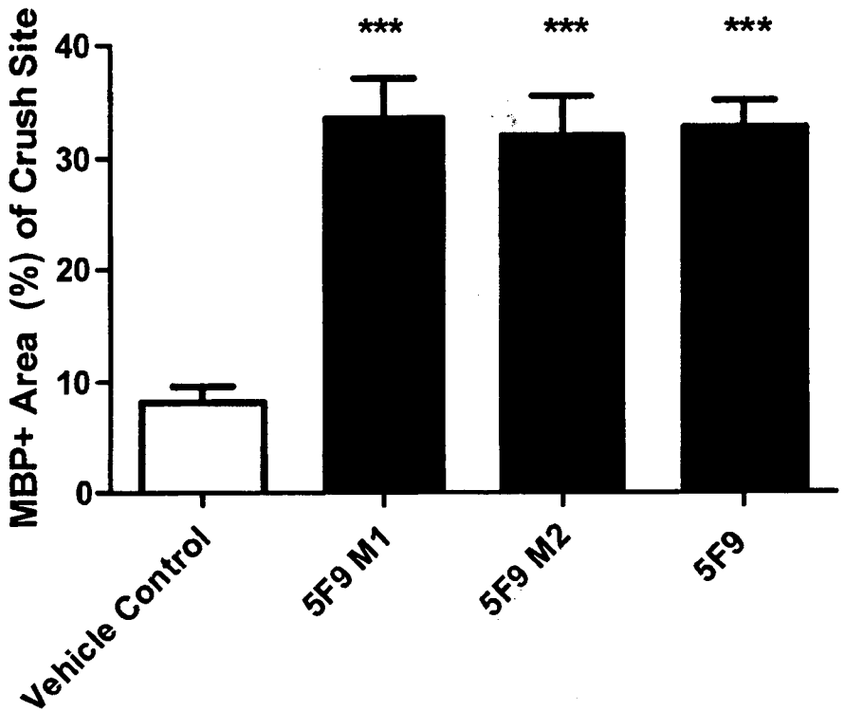

MBP+ Area (%) of Crush Site
40
30
20
10
0
***
***
***
Vehicle Control
5F9 M1
5F9 M2
5F9

Fig. 16

000153

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/001437

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/22 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HATA KATSUHIKO ET AL: "RGMa inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury." THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY 10 APR 2006, vol. 173, no. 1, 10 April 2006 (2006-04-10), pages 47-58, XP002529131 ISSN: 0021-9525 the whole document	1-91
Y	KYOTO ET AL: "Synapse formation of the cortico-spinal axons is enhanced by RGMa inhibition after spinal cord injury" BRAIN RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1186, 23 October 2007 (2007-10-23), pages 74-86, XP022374699 ISSN: 0006-8993 the whole document	1-91

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
4 June 2009	18/06/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Hix, Rebecca

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/001437

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/062852 A (ABBOTT LAB [US]; ABBOTT GMBH & CO KG [DE]; BARGHORN STEFAN [DE]; EBERT) 7 June 2007 (2007-06-07) SEQ ID NO:40: 100% identity in 330aa overlap with SEQ ID NOS 11 & 12	1-91
A	RAJAGOPALAN SRIKANTH ET AL: "Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule" NATURE CELL BIOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 6, no. 8, 1 August 2004 (2004-08-01), pages 756-762, XP002424999 ISSN: 1465-7392 the whole document	
A	HAREL NOAM Y ET AL: "Can regenerating axons recapitulate developmental guidance during recovery from spinal cord injury?" NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE, vol. 7, no. 8, August 2006 (2006-08), pages 603-616, XP002529132 ISSN: 1471-0048 the whole document	
A	LAURA MARIE CAMUS ET AL: "Molecular Evolution of Hemojuvelin and the Repulsive Guidance Molecule Family" JOURNAL OF MOLECULAR EVOLUTION, SPRINGER-VERLAG, NE, vol. 65, no. 1, 25 June 2007 (2007-06-25), pages 68-81, XP019538398 ISSN: 1432-1432 the whole document	
P,A	SCHAFFAR GREGOR ET AL: "LIM-only protein 4 interacts directly with the repulsive guidance molecule A receptor Neogenin" JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 107, no. 2, October 2008 (2008-10), pages 418-431, XP002529133 ISSN: 0022-3042 the whole document	
P,X	SUDA M ET AL: "Peptides derived from repulsive guidance molecule act as antagonists" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 371, no. 3, 4 July 2008 (2008-07-04), pages 501-504, XP022670730 ISSN: 0006-291X [retrieved on 2008-04-29] the whole document	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2009/001437

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007062852 A	07-06-2007	AU 2006319358 A1	07-06-2007
		CA 2628703 A1	07-06-2007
		EC SP088462 A	30-06-2008
		EP 1954718 A2	13-08-2008
		JP 2009517057 T	30-04-2009
		KR 20080090408 A	08-10-2008

ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROTEÍNA RGM A Y SUS USOS

CAMPO TÉCNICO

En esta solicitud se describen proteínas que se unen a RGM A, particularmente anticuerpos monoclonales, y en particular, versiones humanizadas de anticuerpos con injertos de CDR, que tienen la capacidad de unirse a RGM A y prevenir la unión de las proteínas RGM al receptor RGM A y otras proteínas que se unen a RGM A, por lo que neutralizan la función de RGM A. Estos anticuerpos pueden ser útiles en el tratamiento de diversos estados, incluyendo, no taxativamente, la esclerosis múltiple, el traumatismo cerebral en mamíferos, las lesiones en la médula espinal, el accidente cerebrovascular, las enfermedades neurodegenerativas y la esquizofrenia.

ANTECEDENTES

La regeneración axonal posterior a una lesión, ataques inflamatorios o enfermedades neurodegenerativas en el sistema nervioso central de los mamíferos (SNC) casi siempre resulta imposible. El resultado depende del equilibrio entre la capacidad intrínseca de las fibras nerviosas del SNC de desarrollarse nuevamente y los factores inhibidores en el SNC. Estos factores están localizados en el microambiente de la lesión o el sitio donde se localiza el daño, y permiten que ocurra un nuevo desarrollo de manera activa, lo que resulta en la regeneración de los tractos de fibras lesionadas.

Se ha establecido que la mielina generada por los oligodendrocitos en el SNC y las cicatrices debidas a las lesiones son las estructuras no permisivas más relevantes para el desarrollo axonal en la primera fase de una lesión, ya que provocan el colapso del cono de crecimiento e inhiben el desarrollo de las neuritas, tanto in vitro como in vivo, lo que resulta en la inhibición directa del desarrollo de nuevos axones. Se han identificado las proteínas RGM como los factores de inhibición de mayor importancia en la mielina del SNC y el tejido axonal (Monnier et al., Nature 419: 392-395, 2002; Schwab et al., Arch. Neurol, 62: 1561-8, 2005a; Schwab et al. Eur. J. Neurosci. 21:1569-76, 2005 b; Hata et al. J. Cell Biol, 173:47-58, 2006; para hallar revisiones, véanse Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006; Yamashita et al. Curr. Opin. Neurobiol. 17: 29-34, 2007). Las proteínas RGM se hallan reguladas positivamente en los sitios donde han ocurrido daños o lesiones, en aquellos seres humanos que están agonizando debido a un traumatismo cerebral o una lesión isquémica (Schwab et al., Arch. Neurol. 62: 1561-8, 2005a), y se hallan reguladas positivamente en los sitios de las lesiones en ratas que presentan lesiones en la médula espinal (Schwab et al. Eur. J. Neurosci. 21:1569-76, 2005 b; Hata et al. J. Cell Biol, 173:47-58, 2006, para hallar revisiones, véanse Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006; Yamashita et al. Curr. Opin. Neurobiol. 17: 29-34, 2007). Además, los primeros datos obtenidos mediante el uso de muestras clínicas de pacientes con esclerosis múltiple y personas saludables permiten inferir que RGM A humana se halla regulada positivamente en el fluido cerebroespinal de pacientes que sufren MS (datos no presentados).

Para evaluar el potencial de regeneración-promoción de un anticuerpo policlonal específico para RGM A, se administraron los anticuerpos en un modelo de lesiones en la médula espinal entre moderadas y severas, donde se transectó aproximadamente 60% de la médula espinal a nivel torácico 9/10. En el examen histológico se observó que esta lesión había cortado todas las fibras dorsales y laterales del tracto corticospinal. El anticuerpo policlonal específico para RGM A administrado de manera local, a través de una bomba durante dos semanas, indujo la regeneración a larga distancia de las fibras nerviosas lesionadas (Hata et al., J. Cell Biol. 173:47-58, 2006).

Cientos de fibras se extendieron más allá del sitio de la lesión, y las fibras más largas se regeneraron más de 10 mm más allá de la lesión, mientras que no se observaron fibras en regeneración en localizaciones distales respecto de la lesión en los animales tratados con el anticuerpo control. La recuperación funcional de las ratas tratadas con el anticuerpo contra RGM A se vio mejorada significativamente, en comparación con las ratas sometidas a una lesión espinal y tratadas con el anticuerpo control, lo que permite demostrar que RGM A es un inhibidor potente de la neurorregeneración y un blanco valioso para estimular la recuperación en indicaciones caracterizadas por daños en los axones o lesiones en las fibras nerviosas (Hata et al., J. Cell Biol. 173:47-58, 2006; Kyoto et al. Brain Res. 1186: 74-86, 2007). Además, la neutralización de la proteína RGM A con un anticuerpo policlonal bloqueador de la función no solamente estimuló el desarrollo de las fibras nerviosas dañadas en las ratas sometidas a lesiones espinales, sino que también mejoró la formación de sinapsis, lo que permitió que se formaran nuevos circuitos neuronales o se restauraran los circuitos neuronales dañados (Kyoto et al. Brain Res. 1186: 74-86, 2007).

La familia del gen *rgm* abarca tres genes diferentes. Dos de ellos, *rgm a* y *b*, se expresan en el SNC de los mamíferos y dan lugar a las proteínas RGM A y RGM B, mientras que el tercer miembro, *rgm c*, se expresa en la periferia (Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006), donde RGM C tiene una función importante en el metabolismo del hierro. In vitro, RGM A inhibe el desarrollo de las neuritas al unirse a la neogenina, que ha sido identificada como un receptor de RGM (Rajagopalan et al. Nat Cell Biol.: 6(8), 756-62, 2004). La neogenina fue descripta por primera vez como una proteína que se une a netrina (Keino-Masu et al. Cell, 87(2):175-85, 1996). Este es un descubrimiento importante, debido a que se ha informado que la unión de la netrina-1 a la neogenina o su receptor relacionado estrechamente, DCC (suprimido en el cáncer colorrectal), estimula el desarrollo de las neuritas en vez de inhibirlo (Braisted et al. J. Neurosci. 20: 5792-801, 2000). Por consiguiente, el bloqueo de RGM A libera la inhibición del crecimiento mediada por RGM al permitir que la neogenina se una a su ligando estimulador del crecimiento de las neuritas, la netrina. Sobre la base de estas observaciones, puede asumirse que la neutralización de RGM A será superior a la neutralización de la neogenina en modelos de lesiones en la médula espinal humana. Además de la unión de RGM A a la neogenina y la inhibición del crecimiento de las

neuritas, la unión de RGM A o B a las proteínas morfogenéticas óseas BMP-2 y BMP-4 podría representar otro obstáculo para una neurorregeneración y una recuperación funcional exitosas (Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006).

En la técnica existe la necesidad de anticuerpos mejorados capaces de unirse a RGM A, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que bloquee RGM A y evite la interacción entre RGM A y su receptor y/o sus proteínas de unión, es decir, la neogenina, BMP-2, BMP-4.

En esta solicitud se provee (a) la generación de un anticuerpo monoclonal neutralizador contra RGM A que inhibe selectivamente la unión de RGM A a su receptor, la neogenina, y a las proteínas morfogenéticas óseas 2 y 4 (BMP-2, BMP-4), y (b) la generación de un anticuerpo monoclonal neutralizador contra RGM A que inhibe selectivamente la unión de RGM A a las proteínas morfogenéticas óseas 2 y 4 (BMP-2, BMP-4). Se espera que los anticuerpos monoclonales neutralizadores de la presente invención estimulen el nuevo desarrollo de fibras nerviosas lesionadas o dañadas, y la formación de sinapsis funcionales en las fibras nerviosas en regeneración, ya que uno de los anticuerpos monoclonales neutralizadores de la presente invención parece transformar la naturaleza inhibitoria de RGM A en una condición donde las células neuronales prefieren migrar y desarrollarse en un sustrato de RGM A, y no en un sustrato permisivo, tal como el colágeno I. Además, este anticuerpo es capaz de inducir la regeneración a larga distancia en un modelo de lesión del nervio óptico en rata in vivo, y también potencia la remielinización de fibras nerviosas lesionadas y en regeneración.

Por ende, se espera que los anticuerpos monoclonales neutralizadores de la presente invención promuevan la regeneración neuronal y el nuevo desarrollo de las conexiones neuronales dañadas o rotas en el SNC humano dañado e inflamado, por ejemplo, en la esclerosis múltiple, después de lesiones agudas en la médula espinal o traumatismo cerebral, o en enfermedades neurodegenerativas, tales como, por ejemplo, la corea de Huntington, la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Alzheimer.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

De acuerdo con un aspecto, en la presente invención se provee una proteína de unión que se disocia de RGM A humana (hRGM A) con una K_D de 1×10^{-7} M o menos, y una constante k_{off} de 1×10^{-2} s^{-1} o menos, ambas determinadas por resonancia de plasmón superficial.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se relaciona con una proteína de unión, tal como, por ejemplo, una proteína de unión que presenta las características cinéticas anteriores, se une a RGM A humana y neutraliza la actividad de inhibición del desarrollo de las neuritas de RGM A humana, lo cual puede determinarse con un ensayo in vitro convencional, tal como, por ejemplo, el ensayo de desarrollo de neuronas NTera que se describirá en el ejemplo 3 más adelante.

La invención también se relaciona con una proteína de unión como se definió con anterioridad, que tiene al menos una de las siguientes características funcionales adicionales:

unión a RGM A de rata,

unión a RGM C humana, y

unión a RGM C de rata.

En particular, la proteína de unión que se describe en la presente documentación modula la capacidad de RGM de unirse a al menos uno de sus receptores.

En particular, esta proteína de unión se une al dominio de unión de un receptor de RGM A humana. Se han identificado los dominios de unión a RGM A de los extremos N y C del receptor. Las realizaciones particulares de las proteínas de unión de la invención se unen al dominio de unión del extremo N del receptor de RGM A, como lo ilustra la inhibición de la unión entre un fragmento N-terminal de hRGM A, tal como, por ejemplo, 47-168, y moléculas receptoras, tales como la neogenina y BMP-4. Dicho fragmento N-terminal de hRGM A puede tener una longitud total de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 150, o entre aproximadamente 30 y aproximadamente 122 residuos de aminoácidos. A modo de ejemplo no limitativo, puede mencionarse el fragmento 0 (que corresponde a los residuos N-terminales 47-168) de hRGM A, que se describe en la presente documentación, o cualquier fragmento de unión al receptor más corto.

En particular, dicha proteína de unión modula, preferiblemente inhibe al menos una de las siguientes interacciones:

unión de RGM humana A a BMP-4 humana,

unión de hRGM A a la neogenina humana,

unión de hRGM C a la neogenina humana,

unión de RGM A humana a BMP-2 humana.

De acuerdo con una realización particular, la proteína de unión definida en la presente documentación es un anticuerpo humanizado.

La proteína de unión descripta con anterioridad puede tener un dominio de unión a antígeno, y dicha proteína de unión puede ser capaz de unirse a un epitope de una molécula RGM, donde dicho dominio de unión a antígeno comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

GTTPDY	(SEQ ID Nº 59),
FQATHDPLT	(SEQ ID Nº 62),
ARRNEYYGSSFFDY	(SEQ ID Nº 65),
LQGYIPPRT	(SEQ ID Nº 68), y

secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50% con una de dichas secuencias.

En otra realización, presente invención se relaciona con una proteína de unión que comprende un dominio de unión a antígeno, donde dicha proteína de unión es capaz de unirse a un epitope de una molécula RGM, donde dicho dominio de unión a antígeno

comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

GTTPDY	(SEQ ID Nº 59),
FQATHDPLT	(SEQ ID Nº 62),
ARRNEYYGSSFFDY	(SEQ ID Nº 65),
LQGYIPPRT	(SEQ ID Nº 68), y

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

Por ejemplo, dicha proteína de unión puede comprender dos de dichas CDR, tal como, por ejemplo, SEQ ID Nº 59 y 62, o SEQ ID Nº 65 y 68, donde al menos una de dichas CDR puede haber sido modificada y tiene una identidad de secuencia de al menos 50%, tal como, por ejemplo, al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95%, con una de dichas secuencias.

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

En otra realización, se provee una proteína de unión donde dicha al menos una CDR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

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

En una realización particular, dicha proteína de unión comprende al menos 3 CDR que se seleccionan entre un conjunto de CDR de dominios variables que consiste en

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

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

En particular, cada una de las modificaciones mencionadas con anterioridad puede generarse mediante la adición, la supresión, o en particular, la sustitución de uno o varios aminoácidos, o combinaciones de las anteriores.

En otra realización, la proteína de unión comprende al menos dos conjuntos de CDR de dominios variables.

En particular, dichos al menos dos conjuntos de CDR de dominios variables se seleccionan del grupo que consiste en

Conjunto VH 5F9 y Conjunto VL 5F9, y

Conjunto VH 8D1 y Conjunto VL 8D1.

La proteína de unión de acuerdo con la invención comprende además un marco aceptor humano.

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

En particular, la proteína de unión de la invención puede comprender al menos un conjunto de secuencias de marco seleccionado del grupo que consiste en los siguientes conjuntos:

(1) Conjunto VH3-48 (SEQ ID Nº 15, 16 y 17)

Conjunto VH3-33 (SEQ ID Nº 21, 22 y 23)

Conjunto VH3-23 (SEQ ID Nº 24, 25 y 26),

cada uno de los cuales está combinado con otra secuencia de marco seleccionada entre

JH3 (SEQ ID Nº 18),

JH4 (SEQ ID Nº 19),

JH6 (SEQ ID Nº 20);

o

(2) se selecciona del grupo que consiste en los siguientes conjuntos:

Conjunto A18: (SEQ ID Nº 27, 28 y 29)

Conjunto A17: (SEQ ID Nº 31, 32 y 33),

cada uno de los cuales está combinado con otra secuencia de marco seleccionada entre JK2 (SEQ ID Nº 2).

De acuerdo con realizaciones particulares, la proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes comprende al menos un dominio variable de la cadena pesada con un injerto de CDR seleccionado entre SEQ ID Nº 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 y 43, y/o al menos un dominio variable de la cadena liviana con un injerto de CDR seleccionado entre SEQ ID Nº 44, 45 y 46.

Más particularmente, la proteína de unión de la invención comprende una combinación de dos dominios variables, donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos que se seleccionan entre

SEQ ID Nº 35 y 44, 36 y 44, 37 y 44, 38 y 44, 39 y 44, 40 y 44, 41 y 44, 42 y 44, 43 y 44;
SEQ ID Nº 35 y 45, 36 y 45, 37 y 45, 38 y 45, 39 y 45, 40 y 45, 41 y 45, 42 y 45, 43 y 45;
SEQ ID Nº 35 y 46, 36 y 46, 37 y 46, 38 y 46, 39 y 46, 40 y 46, 41 y 46, 42 y 46, 43 y 46.

En otra realización de la invención, el marco aceptor humano de dicha proteína de unión comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido clave en dicha región del marco, donde dicho residuo clave se selecciona del grupo que consiste en

un residuo adyacente a una CDR;

un residuo de un sitio de glicosilación;

un residuo raro;

un residuo capaz de interactuar con un epitope de RGM;

un residuo capaz de interactuar con una CDR;

un residuo canónico;

un residuo de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena liviana;

un residuo en una zona Vernier;

un residuo en el extremo N capaz de formar paraglutamato, y

un residuo en una región de superposición entre una cadena pesada variable CDR1, tal como la define Chotia, y el primer marco de una cadena pesada, tal como la define Kabat.

En particular, dichos residuos clave se seleccionan del grupo que consiste en

(posición de la secuencia de la cadena pesada): 1, 5, 37, 48, 49, 88, 98;

(posición de la secuencia de la cadena liviana): 2, 4, 41, 51.

En una realización particular, la proteína de unión de la invención es o comprende un dominio variable consenso humano.

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

De acuerdo con realización particular, la proteína de unión de la invención comprende al menos un dominio variable de marco mutado que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

SEQ ID Nº 47, 48, 49, 50 (domino VH); y/o

seleccionada del grupo que consiste en

SEQ ID Nº 51, 52, 53 y 54 (domino VL).

En particular, dicha proteína de unión comprende dos dominios variables opcionalmente mutados, donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos que se seleccionan de los grupos que consisten en

SEQ ID Nº 47 y 44, 47 y 45, 47 y 46, 47 y 51, 47 y 52, 47 y 53, 47 y 54;
SEQ ID Nº 48 y 44, 48 y 45, 48 y 46, 48 y 51, 48 y 52, 48 y 53, 48 y 54;
SEQ ID Nº 49 y 44, 49 y 45, 49 y 46, 49 y 51, 49 y 52, 49 y 53, 49 y 54;
SEQ ID Nº 50 y 44, 50 y 45, 50 y 46, 50 y 51, 50 y 52, 50 y 53, 50 y 54.

Las proteínas de unión de la invención descriptas en la presente documentación pueden unirse a al menos un blanco seleccionado entre moléculas RGM.

En particular, pueden unirse a RGM A humana, y opcionalmente al menos otra molécula RGM de origen humano, u originada en monos macacos, ratas, pollos, anfibios o peces.

Por ejemplo, pueden unirse adicionalmente a RGM A de rata, RGM C humana y/o RGM C de rata.

En particular, la proteína de unión de la invención puede modular, en particular, puede neutralizar o inhibir una función biológica de un blanco seleccionado entre las moléculas RGM definidas con anterioridad.

En particular, la proteína de unión de la invención modula, en particular, disminuye la capacidad de RGM de unirse a al menos uno de sus receptores, tal como, por ejemplo, la neogenina, y las BMP, tales como BMP-2 y BMP-4.

Por ejemplo dicha proteína de unión modula, en particular, disminuye, y preferiblemente inhibe al menos una de las siguientes interacciones:

unión de RGM humana A a BMP-4 humana,

unión de hRGM A a la neogenina humana,

unión de hRGM C a la neogenina humana,

unión de RGM A humana a BMP-2 humana.

Las proteínas de unión con distintas combinaciones de características funcionales, que en consecuencia, presentan otros perfiles funcionales, tal como se describe en la presente documentación, también se hallan dentro del alcance de la invención. A continuación se detallan ejemplos no limitativos de estos perfiles:

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

Por ejemplo, el perfil 1 es satisfecho por el anticuerpo 5F9, como se lo provee en la presente invención, y los derivados de éste descriptos en la presente documentación.

Por ejemplo, el perfil 2 es satisfecho por el anticuerpo 8D1, como se lo provee en la presente invención, y los derivados de éste descriptos en la presente documentación.

En particular, una proteína de unión de la invención es capaz de inhibir al menos una actividad biológica de RGM, en particular, RGM A, donde dicha RGM A se selecciona entre RGM A humana, de monos macacos, ratas, pollos, anfibios y peces.

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

(a) una constante de activación (k_{on}) con relación a dicho blanco seleccionada del grupo que consiste en al menos aproximadamente 10^2 $M^{-1}s^{-1}$, al menos aproximadamente 10^3 $M^{-1}s^{-1}$, al menos aproximadamente 10^4 $M^{-1}s^{-1}$, al menos aproximadamente 10^5 $M^{-1}s^{-1}$, al menos aproximadamente 10^6 $M^{-1}s^{-1}$, y al menos aproximadamente 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, medida por resonancia de plasmón superficial,

(b) una constante de desactivación (k_{off}) con relación a dicho blanco seleccionada del grupo que consiste en a lo sumo aproximadamente 10^{-2} s^{-1}, a lo sumo aproximadamente 10^{-3} s^{-1}, a lo sumo aproximadamente 10^{-4} s^{-1}, a lo sumo aproximadamente 10^{-5} s^{-1}, y a lo sumo aproximadamente 10^{-6} s^{-1}, medida por resonancia de plasmón superficial, o

(c) una constante de disociación (K_D) con relación a dicho blanco seleccionada del grupo que consiste en a lo sumo aproximadamente 10^{-7} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-8} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-9} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-10} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-11} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-12} M, y a lo sumo 10^{-13} M.

De acuerdo con otro aspecto, en la presente invención se provee una construcción de anticuerpos que comprende una proteína de unión descripta con anterioridad, donde dicha construcción de anticuerpos comprende además un polipéptido conector o un dominio constante de inmunoglobulina.

Dicha construcción de anticuerpos o dicha proteína de unión de la invención pueden seleccionarse del grupo que consiste en una molécula de inmunoglobulina, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con un injerto de CDR, un anticuerpo humanizado, un Fab, un Fab', un F(ab')2, un Fv, un Fv con enlaces disulfuro, un scFv, un anticuerpo de un solo dominio, un diacuerpo, un anticuerpo multispecífico, un anticuerpo de especificidad doble, una inmunoglobulina con dos dominios variables y un anticuerpo biespecífico.

En una construcción de anticuerpos de acuerdo con la invención, dicha proteína de unión comprende un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en

un dominio constante de la IgM humana,

un dominio constante de la IgG1 humana,

un dominio constante de la IgG2 humana,

un dominio constante de la IgG3 humana,

un dominio constante de la IgG4 humana,
un dominio constante de la IgGE humana,
un dominio constante de la IgGD humana,
un dominio constante de la IgGA1 humana,
un dominio constante de la IgGA2 humana,
un dominio constante de la IgGY humana, y
los dominios constantes mutados correspondientes.

En particular, una construcción de anticuerpos de acuerdo con la invención comprende un dominio constante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 11, 12, 13 y 14.

De acuerdo con otro aspecto, en la presente invención se provee un conjugado de anticuerpos que comprende una construcción de anticuerpos descripta en la presente documentación, donde dicho conjugado de anticuerpos comprende además un agente seleccionado del grupo que consiste en una molécula de inmunoadhesión, un agente para el diagnóstico por imágenes, un agente terapéutico y un agente citotóxico, cada uno de los cuales está conjugado, por ejemplo, unido de manera covalente a dicha proteína de unión.

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

Por ejemplo, dicho agente es un agente terapéutico o citotóxico seleccionado del grupo que consiste en un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente antiangiogénico, un agente antimitótico, una antraciclina, una toxina y un agente apoptótico.

De acuerdo con otra realización, la proteína de unión de la invención descripta en la presente documentación posee un patrón de glicosilación humano.

Además, las proteínas de unión, las construcciones de anticuerpos y los conjugados de anticuerpos de acuerdo con la invención pueden existir como cristales (en forma cristalina) que preferiblemente retienen la actividad biológica.

En particular, dicho cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada libre de vehículo. Teniendo en cuenta dicha forma cristalina, la proteína de unión, la construcción de anticuerpos o el conjugado de anticuerpos pueden tener una vida media in vivo más prolongada que su contraparte soluble correspondiente.

En otro aspecto de la presente invención, se provee un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína de unión, una secuencia de aminoácidos de una construcción de anticuerpos y una secuencia de aminoácidos de un conjugado de anticuerpos, como se las describe en la presente documentación.

La invención también se relaciona con un vector que comprende un ácido nucleico aislado, como se describe en la presente documentación. En particular, el vector se selecciona del grupo que consiste en pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV y pBJ.

La invención también se relaciona con una célula huésped que comprende dicho vector. En particular, dicha célula huésped es una célula procariota, tal como, por ejemplo, *E. coli*, o una célula eucariota, y puede seleccionarse del grupo que consiste en una célula protista, una célula animal, una célula vegetal y una célula fúngica. En particular, dicha célula eucariota es una célula animal seleccionada del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula de ave y una célula de insecto. Preferiblemente, dicha célula huésped se selecciona entre células HEK, células CHO, células COS y células de levadura. La levadura puede ser *Saccharomyces cerevisiae*, y dicha célula de insecto puede ser una célula Sf9.

En la invención también se provee un método para producir una proteína capaz de unirse a RGM, que comprende cultivar una célula huésped, tal como se la define en la presente documentación, en un medio de cultivo, bajo condiciones apropiadas para producir una proteína de unión capaz de unirse a RGM.

La invención también se relaciona con una proteína producida de acuerdo con dicho método.

En la invención también se provee una composición para la liberación de una proteína de unión, donde dicha composición comprende

(a) una formulación, donde dicha formulación comprende un producto proteico cristalizado, como se lo define en la presente documentación, y un ingrediente; y

(b) al menos un vehículo polimérico.

Dicho vehículo polimérico puede ser uno o más polímeros seleccionados del grupo que consiste en poli (ácido acrílico), poli (cianoacrilatos), poli (aminoácidos), poli (anhídridos), poli (depsipéptido), poli (ésteres), poli (ácido láctico), poli (ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli (b-hidroxibutriato), poli (caprolactona), poli (dioxanona), poli (etilenglicol), poli ((hidroxipropil) metacrilamida, poli [(órgano) fosfazeno], poli (orto ésteres), poli (alcohol vinílico), poli (vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico y alquil vinil éter, polioles pluronic, albúmina, alginatos, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, y mezclas y copolímeros de los anteriores.

Dicho ingrediente puede seleccionarse del grupo que consiste en albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil-□-ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilegnlicol.

De acuerdo con otro aspecto, en la presente invención se provee un método para tratar un mamífero que comprende el paso de administrarle al mamífero una cantidad eficaz de la composición definida en la presente documentación.

De acuerdo con otro aspecto, en la presente invención se provee una composición farmacéutica que comprende el producto (en particular, una proteína de unión, una

construcción o un conjugado, como se describió con anterioridad), y un vehículo aceptable para el uso farmacéutico.

Dicho vehículo aceptable para el uso farmacéutico puede funcionar como un coadyuvante útil para incrementar la absorción o la dispersión de dicha proteína de unión. Por ejemplo, dicho coadyuvante es hialuronidasa.

De acuerdo con otra realización, dicha composición farmacéutica comprende además al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno donde la actividad de RGM es perjudicial. Por ejemplo, dicho agente se selecciona del grupo que consiste un agente terapéutico, un agente para el diagnóstico por imágenes, un agente citotóxico, un inhibidor de la angiogénesis, un inhibidor de quinasa, un bloqueador de una molécula de co-estimulación, un bloqueador de una molécula de adhesión, un anticuerpo anti-citoquina o un fragmento funcional de éste, metotrexato, ciclosporina, rapamicina, FK506, una marca o una señal detectable, un antagonista del TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, una droga antiinflamatoria no esteroidal (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un agente antimicrobiano, un antipsoriático, un corticosteriode, un anabólico esteroidal, una eritropoyetina, un agente de inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, una droga para el reemplazo de una hormona, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalable, una epinefrina o un análogo, una citoquina, y un antagonista de citoquina.

La presente invención también se relaciona con un método para reducir la actividad de la RGM A que comprende poner en contacto RGM A humana con al menos un producto (en particular, una proteína de unión, una construcción o un conjugado, como se describió con anterioridad), con el fin de reducir la actividad de al menos una RGM A humana.

La presente invención también se relaciona con un método para disminuir la unión de hRGM A a su receptor, la neogenina, en un sujeto que lo necesita, que comprende el paso de administrarle al sujeto un producto de la invención (en particular, una proteína de unión, una construcción o un conjugado, como se describió con anterioridad).

La presente invención también se relaciona con un método para disminuir la unión de hRGM A a la proteína morfogenética ósea 2 y/o la proteína morfogenética ósea 4 (BMP-2 y BMP-4) en un sujeto que lo necesita, que comprende el paso de administrarle al sujeto un producto de la invención (en particular, una proteína de unión, una construcción o un conjugado, como se describió con anterioridad).

La presente invención también se relaciona con un método para tratar un sujeto afectado por un trastorno asociado con la actividad de RGM A, que comprende el paso de administrar un producto de la invención (en particular, una proteína de unión, una construcción o un conjugado, como se describió con anterioridad), solo o en combinación con otros agentes terapéuticos.

La presente invención también se relaciona con un método para reducir la actividad de RGM A en un sujeto afectado por un trastorno donde la actividad de RGM A es perjudicial, que comprende administrarle al sujeto un producto de la invención (en particular, una proteína de unión, una construcción o un conjugado, como se describió con anterioridad), solo o en combinación con otros agentes terapéuticos.

Dicho trastorno preferiblemente comprende enfermedades neurológicas seleccionadas del grupo que comprende la esclerosis lateral amiotrófica, la lesión del plexo braquial, la lesión cerebral, incluyendo la lesión cerebral traumática, la parálisis cerebral, el síndrome de Guillain Barre, la leucodistrofia, la esclerosis múltiple, el síndrome posterior a la poliomielitis, la espina bífida, las lesiones en la médula espinal, la atrofia muscular espinal, los tumores espinales, el accidente cerebrovascular, la mielitis transversal, la demencia, la demencia senil, la alteración cognitiva leve, la demencia relacionada con la enfermedad de Alzheimer, la corea de Huntington, la disquinesia tardía, la hiperquinesia, la manía, el morbo de Parkinson, el síndrome de Steel-Richard, el síndrome de Down, la miastenia grave, el traumatismo nervioso, la amiloidosis vascular, la hemorragia cerebral con amiloidosis, la inflamación cerebral, el trastorno de confusión aguda, la esclerosis lateral amiotrófica, el glaucoma y la enfermedad de Alzheimer.

A continuación se detallarán otros aspectos particulares de la invención.

Una proteína de unión aislada que interactúa específicamente con al menos un epitope de una proteína hRGM A;

donde dicha proteína aislada es un anticuerpo monoclonal neutralizador, o un fragmento de unión a antígeno de éste;

donde dicho fragmento de unión a antígeno comprende un dominio VH y un dominio VL;

donde dicho anticuerpo neutralizador disminuye la capacidad de hRGM A de unirse a dicho receptor;

donde dicho anticuerpo neutralizador es capaz de inhibir la actividad biológica de hRGM A;

donde dicho anticuerpo reconoce un receptor de RGM Ha seleccionado entre los receptores humanos, de monos macacos, ratas, pollos, anfibios y peces;

donde dicho anticuerpo reconoce una proteína RGM A que comparte 90% de homología con la secuencia de aminoácidos SEQ ID Nº 2;

donde dicha proteína RGM A es codificada por un ácido nucleico que comparte 90% de homología con la secuencia de ácido nucleico SEQ ID Nº 1;

donde dicho anticuerpo tiene al menos 90% de identidad de secuencia a nivel de los aminoácidos con una secuencia que comprende una región variable de la cadena pesada (región VH) que comprende la secuencia de SEQ ID Nº 9 ó 34, o una versión de dicha región VH humanizada y opcionalmente sometida a mutaciones adicionales;

donde dicho anticuerpo tiene al menos 90% de identidad de secuencia a nivel de los aminoácidos con una secuencia que comprende una región variable de la cadena liviana

(región VL) que comprende la secuencia de SEQ ID Nº 10, o una versión de dicha región VL humanizada y opcionalmente sometida a mutaciones adicionales;

donde dicho anticuerpo se une a hRGM A, donde el anticuerpo está glicosilado;

donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo de ratón, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo quimérico, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo humanizado, o un fragmento de unión a antígeno de a anticuerpo quimérico;

donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un fragmento de unión a antígeno seleccionado del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')2 y un fragmento Fv;

donde dicho anticuerpo monoclonal se une específicamente a al menos un epitope de hRGM A, donde dicho anticuerpo monoclonal es el anticuerpo monoclonal secretado por una línea de células de hibridomas que se describe en la presente documentación;

donde la unión de dicho anticuerpo monoclonal resulta en la inactivación de la interacción de hRGM A con su receptor;

donde dicha línea de células de hibridomas produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a al menos un epitope de hRGM A;

donde dicha línea de células de hibridomas se selecciona del grupo que consiste en líneas de células de hibridomas humanos, de ratón, rata, oveja, cerdo, ganado bovino, cabra y caballo; o

donde la unión de dicho anticuerpo monoclonal resulta en la inactivación de hRGM A;

donde dicha línea de células de hibridomas produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a al menos un epitope de hRGM A;

donde dicha línea de células de hibridomas se selecciona del grupo que consiste en líneas de células de hibridomas humanos, de ratón, rata, oveja, cerdo, ganado bovino, cabra y caballo;

donde dicho anticuerpo monoclonal neutralizador, o el fragmento de unión a antígeno de éste, tiene al menos una característica seleccionada del grupo que consiste en

a) unión a RGM A de mamífero con una afinidad en el rango de nM o menor;

b) antagonismo funcional de la actividad de RGM A en un ensayo de desarrollo de neuritas *in vitro*, con una eficacia µM, nM, o menor;

c) inducción de brotación en el modelo de compresión del nervio óptico *in vivo*;

d) inducción de brotación en el modelo de lesión en la médula espinal *in vivo*;

e) alivio de lesiones experimentales en la médula espinal *in vivo* al mejorar el desarrollo regenerativo de las fibras nerviosas lesionadas; o

f) alivio de lesiones experimentales en la médula espinal *in vivo* al promover la formación de sinapsis.

Un ácido nucleico aislado que codifica dicho anticuerpo monoclonal neutralizador o fragmento de unión a antígeno.

Un vector que comprende dicho ácido nucleico aislado;
donde dicho vector se selecciona del grupo que consiste en pcDNA; pTT; pTT3; pEFBOS; pBV; pJV; pHybE y pBJ.

Una célula huésped transformada con dicho vector, donde la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en una célula protista, una célula animal, una célula vegetal y una célula fúngica;
donde la célula animal es una célula de mamífero seleccionada del grupo que comprende HEK293, CHO y COS.

Una célula huésped transformada con el vector de acuerdo con la reivindicación 24, donde la célula huésped es una célula eucariota.

Un método para producir una proteína de unión que se une hRGM A, que comprende cultivar una célula huésped en un medio de cultivo, bajo condiciones apropiadas para producir una proteína de unión que se une a hRGM A.

Una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno, y un vehículo aceptable para el uso farmacéutico.

Un método para disminuir la unión de hRGM A a su receptor, la neogenina, en un sujeto que lo necesita, que comprende el paso de administrarle al sujeto dicho anticuerpo.

Un método para disminuir la unión de hRGM A a la proteína morfogenética ósea 2 y la proteína morfogenética ósea 4 (BMP-2 y BMP-4) en un sujeto que lo necesita, que comprende el paso de administrarle al sujeto dicho anticuerpo.

Un método para tratar un sujeto afectado por un trastorno asociado con la actividad de RGM A, que comprende el paso de administrar dicho anticuerpo, solo o en combinación con otros agentes terapéuticos.

Un método para reducir la actividad de RGM A en un sujeto afectado por un trastorno donde la actividad de RGM A es perjudicial, que comprende administrarle al sujeto dicho anticuerpo, solo o en combinación con otros agentes terapéuticos;
donde dicho anticuerpo comprende al menos una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID Nº 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 y 43;
donde dicho anticuerpo comprende al menos una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID Nº 44, 45 y 46;
donde dicho anticuerpo está modificado adicionalmente con entre 1 y 5 mutaciones en una secuencia VH o VL;
donde las mutaciones en dicho anticuerpo se seleccionan entre mutaciones en la región del marco y mutaciones en los residuos de Vernier y la interfase VH/VL.

Cualquier mención o referencia a SEQ ID Nº 34, tal como se la describe en la presente documentación, se aplica de manera análoga a SEQ ID Nº 9.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

En la **Figura 1A** se ilustra la unión de los anticuerpos monoclonales a hRGM A en un ensayo de ELISA.

En la **Figura 1B** se ilustra la unión de los anticuerpos monoclonales a hRGM A expresada en células HEK 293.

En la **Figura 1C** se ilustra la unión de los anticuerpos monoclonales a RGM A de rata expresada en células HEK 293.

En la **Figura 2** se ilustra la unión de RGM A completa a la neogenina. El anticuerpo monoclonal 5F9 inhibe la unión de hRGM A completa unida a fc a la neogenina.

En la **Figura 3** se ilustra la unión de RGM A completa a BMP-4. El anticuerpo monoclonal 5F9 inhibe la unión del fragmento de hRGM A completa unida a fc (47- 422) a BMP-4.

En la **Figura 4** se ilustra la unión del fragmento 0 de RGM A a BMP-4. El anticuerpo monoclonal 5F9 inhibe la unión de del fragmento 0 de RGM A unida a fc (47-168) a BMP-4.

En la **Figura 5** se ilustra la unión de RGM A completa a BMP-2. El anticuerpo monoclonal 5F9 inhibe la unión del fragmento de RGM A completa unida a fc (47-422) a BMP-2.

La **Figura 6** es una combinación de microfotografías donde se ilustra la neutralización de un fragmento de RGM A por el anticuerpo monoclonal 5F9 en un ensayo de desarrollo de neuritas en células NTera. El anticuerpo monoclonal 5F9 neutraliza la actividad de inhibición del desarrollo de un fragmento inhibidor potente de hRGM A conjugado con fc en ensayos de desarrollo de neuritas con agregados NTera humanos. (A) Cultivo control, desarrollo de neuronas NTera en laminina, (B) en un sustrato de laminina-fragmento de hRGM A (47-168), (C-E) en un sustrato de laminina-fragmento de hRGM A (47-168), en presencia de 0,1 µg/ml del anticuerpo monoclonal 5F9 (C), 1 µg/ml del anticuerpo monoclonal 5F9 (D), 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal 5F9 (E).

En la **Figura 7** se ilustran análisis cuantitativos del ensayo NTera 2. El anticuerpo monoclonal 5F9 neutraliza de una manera dependiente de la dosis la actividad de inhibición del desarrollo de un fragmento inhibidor potente de hRGM A conjugado con fc (fragmento 0, 47-168) en ensayos de desarrollo de neuritas con agregados NTera humanos.

En la **Figura 8** se ilustran análisis cuantitativos del ensayo en bandas SH-SY5Y. El anticuerpo monoclonal 5F9 neutraliza la repulsión inducida por bandas de membrana que consisten en RGM A humana completa sobre células neuronales humanas SH-SY5Y. En ausencia del anticuerpo monoclonal 5F9 (A) o en presencia de concentraciones bajas del anticuerpo monoclonal, las neuronas SH-SY5Y prefieren evitar las bandas de RGM A. Este comportamiento es revertido al incrementar las concentraciones del anticuerpo monoclonal 5F9 (B a D). Con la concentración máxima de anticuerpo monoclonal (10 µg/ml) (E), las neuronas SH-SY5Y presentan una preferencia marcada por las badas de RGM A, en comparación con las bandas de colágeno I.

En la **Figura 9** se resume el análisis cuantitativo de las características de unión de los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1. Los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1 se evalúan en distintas concentraciones en ensayos de unión con hRGM A-neogenina, hRGM A-BMP-2 y hRGM A-BMP-4.

En la **Figura 10** se ilustra la actividad de neutralización de la actividad quimiorrepulsiva de hRGM A de los anticuerpos 5F9 humanizados (h5F9.21, h5F9.23, h5F9.25) en un ensayo de quimiotaxis SH-SY5Y.

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

En la **Figura 12 A** y la **Figura 12 B** se ilustran análisis cuantitativos de la aplicación local de 5F9 en un modelo animal de lesión del nervio óptico. (A) 5F9, pero no el anticuerpo monoclonal control 8D1, incrementó significativamente la cantidad de fibras positivas para GAP-43 en regeneración. Se observaron significativamente más fibras ($p < 0,05$) en los animales tratados con 5F9 a distancias de 200 µm, 400 µm y 600 µm, y a 1200 µm, solamente se observan fibras en los animales tratados con 5F9, pero no en los animales control. (B) 5F9 incrementó significativamente el área positiva para GAP-43 en el sitio donde se produjo la lesión en el nervio óptico, en comparación con el anticuerpo control 8D1 y el control con vehículo PBS. El área de crecimiento regenerativo (área positiva para GAP-43) se midió usando el software Axiovision (Zeiss).

En la **Figura 13** se ilustra la actividad neurorregenerativa in vivo de una aplicación sistémica de 5F9 en un modelo animal de lesión del nervio óptico. Los animales se trataron con 5F9 el día 0 y el día 21, con 2 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. Se administró el anticuerpo o el vehículo por vía intraperitoneal o intravenosa. Imágenes compuestas de los nervios ópticos de las ratas. En los animales tratados con 5F9 (A), muchas fibras positivas para GAP-43 se extienden más allá del sitio de compresión, en contraste con los animales control tratados con PBS (B). El sitio de compresión está localizado en el margen izquierdo, y las fibras en regeneración han sido coloreadas con un anticuerpo contra GAP-43. Se observan muchas fibras en el borde superior e inferior del nervio óptico en los animales tratados con 5F9, pero no en los animales que recibieron PBS.

En la **Figura 14 A** y la **Figura 14 B** se ilustran los ácido nucleico cuantitativos de la aplicación sistémica de 5F9 en un modelo animal de lesión del nervio óptico.

En la **Figura 15** se ilustra la actividad de remielinización in vivo de la aplicación sistémica de 5F9 en un modelo animal de lesión del nervio óptico. Los animales se trataron con 5F9 el día 0 y el día 21, con 2 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. Se

administró el anticuerpo o el vehículo por vía intraperitoneal o intravenosa. Imágenes compuestas de los nervios ópticos de las ratas. La mielinización se visualiza usando un anticuerpo dirigido contra la proteína básica de la mielina, MBP, usada como marcador. Los sitios de compresión se localizan en el medio de los nervios compuestos, y el área está libre en los animales control tratados con vehículo (A y B). En los animales tratados con 5F9 (C y D), se observan muchas estructuras positivas para MBP en el área media (centro de compresión) de los nervios ópticos.

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En esta invención se describen proteínas de unión a RGM A, más específicamente, anticuerpos monoclonales contra RGM A, en especial, anticuerpos monoclonales contra RGM A humanizados que se unen a RGM A, o porciones de unión a antígeno de éstos. Diversos aspectos de esta solicitud se relacionan con anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, y con composiciones farmacéuticas que los comprenden, así como con ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células huésped para producir dichos anticuerpos y fragmentos. En la invención también se incluyen métodos para usar los anticuerpos de esta solicitud para detectar RGM A humana; neutralizar RGM humana y/o la actividad de RGM A humana, tanto *in vivo* como *in vitro*, y regular la expresión genética.

1. Definiciones generales

A menos que se los defina de otro modo en la presente documentación, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención tienen los significados que comúnmente les dan aquellos entrenados en la técnica. El significado y el alcance de los términos debería estar claro; sin embargo, en el caso en que haya una ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en la presente documentación tienen prioridad sobre cualquier definición de diccionario o extrínseca. Además, a menos que lo requiera de otro modo el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades, y los términos plurales incluirán las formas singulares. En esta solicitud, el uso de "o" denota "y/o", a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluyendo", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitativo. También, los términos tales como "elemento" o "componente" abarcan los elementos y los componentes que constituyen una unidad, y los elementos y los componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

En general, las nomenclaturas usadas en conexión el cultivo de células y tejidos, la biología molecular, la inmunología, la microbiología, la genética y la química y la hibridización de proteínas y ácidos nucleicos descriptas en la presente documentación, y los procedimientos correspondientes, son aquellos bien conocidos y de uso común en la técnica. Los métodos y los procedimientos de la presente invención generalmente se

llevan a cabo de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se describen en esta memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y los procedimientos de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como comúnmente se los lleva a cano en la técnica o como se describe en la presente documentación. Las nomenclaturas usadas en conexión con los procedimientos de laboratorio y los procesos de química analítica, la química de síntesis orgánica y la química farmacéutica descriptas en la presente documentación, y los procedimientos correspondientes, son aquellos bien conocidos y de uso común en la técnica. Se usan técnicas convencionales para la síntesis química, los análisis químicos, las preparaciones farmacéuticas, la formulación, la administración y el tratamiento de los pacientes.

Para que la presente invención pueda ser comprendida con mayor facilidad, a continuación se describirán términos seleccionados.

El término "polipéptido", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se usan indistintamente con el término polipéptido, y también hacen referencia a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteínas y análogos de polipéptidos de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

El término "proteína aislada" o "polipéptido aislado" hace referencia a una proteína o un polipéptido que, en virtud de su origen o la fuente de la que deriva, no está asociado con los componentes con los que se asocia y que lo acompañan en su estado nativo; se halla sustancialmente libre de otras proteínas de la misma especie; es expresado por una célula de una especie diferente; o no aparece en la naturaleza. Por consiguiente, un polipéptido que es sintetizado por medios químicos o es sintetizado en un sistema celular diferente de la célula en la que se origina naturalmente estará "aislado" de los componentes con los que se halla asociado en la naturaleza. Una proteína también puede liberarse sustancialmente de los componentes con los que se halla asociada en la naturaleza si se la aísla usando procedimientos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

El término "recuperar", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia al proceso de liberar sustancialmente una especie química, tal como un polipéptido, de los componentes con los que se halla asociada en la naturaleza, aislándola, por ejemplo, por medio de procedimientos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

El término "RGM A humana" (abreviado en la presente documentación como hRGM A), como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a una glicoproteína anclada con glicosilfosfatidil-inositol (gpi) de 450 aminoácidos, la cual fue descripta por primera vez como un repelente del desarrollo de las neuritas o un inhibidor

del crecimiento de las neuritas durante el desarrollo de proyecciones topográficas (Stahl et al Neuron 5: 735-43, 1990; Mueller, en Molecular Basis of Axon Growth and Nerve Pattern Formation, editado por H. Fujisawa, Japan Scientific Societies Press, 215-229, 1997). La familia del gen *rgm* abarca tres genes diferentes. Dos de ellos, *rgm a* y *b*, se expresan en el SNC de los mamíferos y dan lugar a las proteínas RGM A y RGM B, mientras que el tercer miembro, *rgm c*, se expresa en la periferia (Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006), donde tiene una función importante en el metabolismo del hierro. Las proteínas RGM humanas tienen una identidad de secuencia de 43%-50%; la homología de aminoácidos entre las RGM A humana y de rata es de 89%. Las proteínas RGM humanas no comparten una homología de secuencia significativa con cualquier otra proteína conocida. Son proteínas ricas en prolina que contienen una región RGD, presentan homología estructural con el dominio del factor de Von-Willebrand, y son cortadas en el aminoácido N-terminal 168 por una proteasa desconocida para obtener la proteína funcionalmente activa (Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006).

In vitro, RGM A inhibe el desarrollo de las neuritas en concentraciones picomolares al unirse a la neogenina, que ha sido identificada como el receptor de RGM (Rajagopalan et al. Nat Cell Biol.: 6(8), 756-62, 2004). La neogenina fue descripta por primera vez como una proteína que se une a netrina (Keino-Masu et al. Cell, 87(2):175-85, 1996), pero su afinidad por la netrina (K_d 2 nM) es un orden de magnitud inferior a su afinidad por RGM (K_d 0,2 nM) (Rajagopalan et al. Nat Cell Biol.: 6(8), 756-62, 2004). Este es un descubrimiento importante, debido a que se ha informado que la unión de la netrina-1 a la neogenina o su receptor relacionado estrechamente, DCC (suprimido en el cáncer colorrectal), estimula el desarrollo de las neuritas en vez de inhibirlo (Braisted et al. J. Neurosci. 20: 5792-801, 2000).

Además de la unión de RGM A a la neogenina y la inhibición del crecimiento de las neuritas, la unión de RGM A o B a las proteínas morfogenéticas óseas BMP-2 y BMP-4 podría representar otro obstáculo para una neurorregeneración y una recuperación funcional exitosas (Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006). Se ha informado que ambas clases de proteínas (neogenina y las BMP) transducen la señal de inhibición del crecimiento de las neuritas de RGM A a través de dos vías de transducción de señales completamente diferentes e independientes. Usualmente, la expresión de estas proteínas BMP es relativamente baja en la mayoría de las regiones del SNC adulto, pero se han descripto incrementos rápidos en la expresión y la acumulación de algunas BMP (por ejemplo, BMP-2, BMP-6, BMP-7) en respuesta a lesiones y daños (Lai et al., Neuroreport 8: 2691-94, 1997; Martinez et al. Brain Res. 894: 1-11, 2001; Hall y Miller, J. Neurosci. Res. 76: 1-8, 2004; Setoguchi et al., Exp. Neurol. 189: 33-44, 2004). Además, en un modelo de esclerosis múltiple, el modelo de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), BMP-4, BMP-6 y BMP-7 presentaron una regulación positiva en médula espinal de ratón (Ara et al., J. Neurosci.Res. 86: 125-

35, 2008). Se ha informado que BMP-2 inhibe el crecimiento de las neuritas al unirse a RGM A en la superficie de las células, los receptores de BMP I y II, y al activar directamente la LIM-quinasa (Matsuura et al. Biochem Biophys Res Commun., 360: 868-73, 2007), por lo que se espera que el bloqueo de la interacción entre RGM A y BMP-2 permitirá incrementar aún más la recuperación funcional posterior a una lesión en el SNC.

Como se mencionó con anterioridad, las ratas con lesiones en la médula espinal y los seres humanos con lesiones cerebrales presentan acumulaciones masivas de RGM celular en el sitio de la lesión, y el patrón de coloración de RGM A en ratas en el sitio de la lesión espinal es muy similar a la coloración general del anticuerpo RGM en seres humanos, lo que permite inferir que la mayor parte de la coloración general de RGM en los seres humanos está relacionada con la localización de RGM A, pero no la localización de RGM B (Schwab et al., Arch. Neurol, 62: 1561-8, 2005a; Schwab et al. Eur. J. Neurosci. 21:1569-76, 2005 b; Hata et al. J. Cell Biol, 173:47-58, 2006). En el cerebro humano saludable, la coloración general de RGM (inmunorreactividad de RGM A y B) se detectó en las fibras de la materia blanca, los oligodendrocitos, el pericarion de unas pocas neuronas, algunos músculos lisos vasculares y unas pocas células endoteliales. No se observó coloración en los astrocitos. El patrón de coloración de RGM en el cerebro humano adulto saludable es muy similar al patrón de coloración observado en las médulas espinales de ratas adultas (Schwab et al. Eur. J. Neurosci. 21:1569-76, 2005 b; Hata et al. J. Cell Biol. 173:47-58, 2006).

Sobre la base de la acumulación de RGM A en los sitios de las lesiones en el cerebro y las lesiones en la médula espinal, y debido a su actividad de inhibición del crecimiento celular, se espera que la proteína presente actividad de inhibición del crecimiento de las neuritas, por lo que su neutralización por anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de éstos, que se unan a al menos un epitope de la RGM A humana, resulte en un desarrollo mejorado de las fibras nerviosas lesionadas y una mejora de la recuperación funcional en indicaciones caracterizadas por lesiones en las fibras nerviosas y acumulación de RGM.

A menos que se indique lo contrario, el término "RGM A" también abarca moléculas RGM A aisladas u obtenidas de otras especies, tales como, por ejemplo, roedores, tales como ratones o ratas. Específicamente, la molécula derivada de rata se denomina "RGM A de rata" en la presente documentación.

Tabla 1. Lista de secuencias de de moléculas relacionadas con RGM A

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

La "actividad biológica", como se la usa en la presente documentación, hace referencia a todas las propiedades biológicas inherentes de RGM A, como se la define en la presente documentación.

Los términos "unión específica" o "unirse específicamente", como se los usa en la presente documentación con relación a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, denotan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o un "epitope", como se define a continuación) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en vez de a las proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epitope "A", la presencia de una molécula que contiene el epitope A (o A libre, sin marcar) en una reacción que contenga "A" marcado y el anticuerpo reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

El término "anticuerpo", como se lo usa en la presente documentación, es una referencia amplia a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) compuesta por cuatro cadenas de polipéptidos: dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante o derivación de ésta que retenga las características esenciales de unión a epitopes de una molécula de Ig. Estos formatos de anticuerpos mutantes, variantes o derivados son conocidos en la técnica. A continuación se describirán realizaciones no limitativas de dichos formatos. Se dice que un anticuerpo es "capaz de unirse a" una molécula si es capaz de reaccionar específicamente con la molécula, de modo que la molécula se una al anticuerpo.

Un "anticuerpo monoclonal", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a una preparación de moléculas de anticuerpos que comparten secuencias de aminoácidos comunes para la cadena pesada y la cadena liviana, en contraste con las

preparaciones de anticuerpos "policlonales", las cuales contienen una mezcla de distintos anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales pueden generarse con diversas tecnologías novedosas, tales como la presentación de fagos, bacterias, levaduras o ribosomas, y también con métodos clásicos, por ejemplo, los anticuerpos derivados de hibridomas (por ejemplo, un anticuerpo secretado por un hibridoma preparado con tecnología de hibridomas, tal como la metodología convencional de Kohler y Milstein ((1975) Nature 256:495-497).

En un anticuerpo completo, cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada HCVR o VH en la presente documentación) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana está compuesta por una región variable de dicha cadena liviana (abreviada LCVR o VL en la presente documentación) y una región constante de dicha cadena liviana. La región constante de la cadena liviana consiste en un dominio CL. Las regiones VH y VL pueden dividirse adicionalmente en regiones hipervariables, conocidas como regiones de determinación de la complementariedad (CDR), y separadas por regiones conservadas conocidas como regiones de marco (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG 1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

El término "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo"), como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, hRGM A). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede ser llevada a cabo por fragmentos de un anticuerpo completo. Estas realizaciones de anticuerpos también pueden tener formatos biespecíficos, de especificidad doble o multiespecíficos, es decir, pueden unirse específicamente a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados por el término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos entre sí en la región bisagra a través de un enlace disulfuro; (iii) un fragmento Fd, que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv, que consiste en los dominios FL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546, Winter et al., publicación PCT WO 90/05144 A1, incorporada en la presente documentación a modo de referencia), que comprende un solo dominio variable; y (vi) una región de determinación de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, a saber, VL y VH, están codificados por genes separados,

pueden conectarse uno con otro usando un conector sintético que les permita prepararlos como una sola cadena de proteína, donde las regiones VL y VH se apareen para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); véanse, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85:5879-5883). Estos anticuerpos de cadena simple también quedan incluidos dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes y biespecíficos donde los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena de polipéptido, pero usando un conector que es demasiado corto para que los dos dominios se combinen en la misma cadena, que lo que se fuerza el apareamiento de dichos dominios con dominios complementarios de una cadena diferente y la formación de dos sitios de unión a antígeno (véanse, por ejemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123). Estas porciones de unión a anticuerpos son conocidas en la técnica (Kontermann y Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

El término "anticuerpo construido", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un polipéptido que comprende una o más porciones de unión a antígeno de la invención, unidas a un polipéptido conector o un dominio constante de inmunoglobulina. Los polipéptidos conectores comprenden dos o más residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, y se usan para unir una o más porciones de unión a antígeno. Estos conectores peptídicos son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123). Un dominio constante de inmunoglobulina hace referencia a un dominio constante de una cadena pesada o liviana. Las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de la cadena pesada y la cadena liviana de la IgG humana son conocidas en la técnica y se representan en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de dominios constantes de la cadena pesada y dominios constantes de la cadena liviana de la IgG humana

Proteína	**Identificador de secuencia**	Secuencia
		12345678901234567890123456789 0
Región constante de Ig gamma-1	**SEQ ID Nº 11**	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALG CLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK

Proteína	**Identificador de secuencia**	Secuencia
		123456789012345678901234567890
Región constante mutante de Ig gamma-1	**SEQ ID Nº 12**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
Región constante de Ig Kappa	**SEQ ID Nº 13**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTH QGLSSPVTKSFNRGEC
Región constante de Ig Lambda	**SEQ ID Nº 14**	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT PSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTH EGSTVEKTVAPTECS

Adicionalmente, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de éste, puede ser parte de moléculas de inmunoadhesión más grandes, formadas mediante la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o la porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos. Los ejemplos de estas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de la estreptavidina para preparar una molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una marca de polihistidina C-terminal para preparar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Las porciones de los anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y $F(ab')_2$, pueden prepararse a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Más aún, los anticuerpos, las porciones de anticuerpos y las moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse usando técnicas de ADN recombinante, como se describe en la presente documentación.

Un "anticuerpo aislado", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hRGM A está sustancialmente libre de los anticuerpos que se unen a antígenos distintos de hRGM A). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une a hRGM A puede reaccionar con otros antígenos, tales como moléculas RGM A de otras especies. Más aún, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o sustancias químicas.

El término "anticuerpo humano", como se lo usa en la presente documentación, incluye anticuerpos que tiene regiones variables y constantes derivadas de secuencias de secuencias 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 que han sido introducidas por mutagénesis al azar o con especificidad de sitio in vitro, o por mutaciones somáticas in vivo), por ejemplo, en las CDR, y en particular, en CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se lo usa en la presente documentación, no incluye anticuerpos donde se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como el ratón, en secuencias de regiones de marco humanas.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se lo usa en la presente documentación, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos que se expresan usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped (lo que se describirá más adelante), los anticuerpos aislados de una biblioteca de combinación de anticuerpos humanos recombinantes (Hoogenboom H.R., (1997) *TIB Tech.* 15:62-70; Azzazy H., y Highsmith W.E., (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445; Gavilondo J.V., y Larrick

J.W. (2002) *BioTechniques* 29:128-145; Hoogenboom H., y Chames P. (2000) *Immunology Today* 21:371-378), los anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, Taylor, L. D., et al. (1992) *Nucl.* Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., y Green L.L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13:593-597; Little M. et al (2000) *Immunology Today* 21:364-370), o los anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que comprenda la separación específica de secuencias de genes de inmunoglobulina humana para obtener otras secuencias de ADN. Estos anticuerpos humanos recombinantes tendrán regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en determinadas realizaciones, estos anticuerpos humanos recombinantes son sometidos a una mutagénesis *in vitro* (o cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*), por lo que las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien derivan y están relacionadas con secuencias VH y VL de la línea germinal, pueden no existir en el repertorio de anticuerpos de la línea germinal humana *in vivo* bajo condiciones naturales.

El término "anticuerpo quimérico" hace referencia a anticuerpos que contienen secuencias de la región variable de las cadenas pesada y liviana de una especie, y secuencias de la región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de las cadenas pesada y liviana unidas a regiones constantes humanas. El anticuerpo quimérico puede producirse con técnicas recombinantes de biología molecular, o puede ensamblarse mediante una conjugación física.

El término "anticuerpo con una CDR injertada" hace referencia a anticuerpos que comprenden secuencias de regiones variables de las cadenas pesada y liviana de una especie, pero cuyas secuencias de una o más regiones CDR de VH y/o VL han sido reemplazadas por secuencias CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de las cadenas pesada y liviana murinas, donde una o más de las CDR murinas (por ejemplo, CDR3) han sido reemplazadas por secuencias CDR humanas.

Los términos "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "nomenclatura de Kabat" se usan indistintamente en la presente documentación. Estos términos, que son reconocidos en la técnica, hacen referencia a un sistema para numerar los residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno de éste (Kabat *et al.* (1971) *Ann. NY Acad, Sci.* 190:382-391, y Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH 91-3242). Para la región variable de la cadena pesada, la región hipervariable se extiende entre las posiciones de los aminoácidos 31 a 35 para CDR1, entre las posiciones de los aminoácidos 50 a 65 para CDR2, y entre las posiciones de los aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de la cadena liviana, la región hipervariable se extiende

entre las posiciones de los aminoácidos 24 a 34 para CDR1, entre las posiciones de los aminoácidos 50 a 56 para CDR2, y entre las posiciones de los aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

Como se los usa en la presente documentación, los términos "aceptor" y "anticuerpo aceptor" hacen referencia al anticuerpo o la secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones de marco. En algunas realizaciones, el término "aceptor" hace referencia a la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos del anticuerpo que proporciona o codifica las regiones constantes. En aún otra realización, el término "aceptor" hace referencia a la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos del anticuerpo que proporciona o codifica una o más de las regiones de marco y las regiones constantes. En una realización específica, el término "aceptor" hace referencia a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de un anticuerpo que proporciona o codifica al menos 80%, preferiblemente, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones de marco. De acuerdo con esta realización, un aceptor puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 10 residuos de aminoácidos que no aparecen en una o más posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una región de marco aceptora y/o una región constante aceptora, por ejemplo, puede derivar o puede obtenerse a partir de un anticuerpo de la línea germinal, un gen de un anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (por ejemplo, anticuerpos bien conocidos en la técnica, anticuerpos en desarrollo, o anticuerpos disponibles comercialmente).

Como se lo usa en la presente documentación, el término "CDR" hace referencia a la región de determinación de la complementariedad dentro de las secuencias variables de un anticuerpo. Para cada una de las regiones variables, hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena liviana, que se denominan CDR1, CDR2 y CDR3. El término "conjunto de CDR", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un grupo de tres CDR que aparecen en una sola región variable y permiten la unión al antígeno. Los límites exactos de estas CDR han sido definidos en distintos términos de acuerdo con distintos sistemas. El sistema descripto por Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no solamente provee un sistema de numeración no ambiguo de los residuos que puede aplicarse a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también provee límites precisos para los residuos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse CDR Kabat. Chotia y sus colegas (Chotia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) y Chotia et al., Nature 342:877-883 (1989)) descubrieron que determinadas sub-porciones dentro de las CDR Kabat adoptan conformaciones casi idénticas del esqueleto peptídico, a pesar de su gran diversidad a nivel de la secuencia de aminoácidos. Estas sub-porciones se denominaron L1, L2 y L3, o H1, H2 y H3, donde "L"

y "H" hacen referencia a las regiones de la cadena liviana y la cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR Chotia, y tienen límites que se superponen con las CDR Kabat. Otros límites que definen CDR que se superponen con las CDR de Kabat han sido descriptos por Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) y MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996)). Aún otras definiciones de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas anteriores, pero aún así se superponen con las CDR Kabat, aunque pueden estar acortadas o alargadas a la luz de las predicciones o los descubrimientos experimentales de residuos o grupos de residuos particular, o aún CDR completas, que no afectan significativamente la unión al antígeno. En los métodos usados en la presente documentación pueden emplearse CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque en realizaciones preferidas se usan CDR definidas de acuerdo con Kabat o Chotia.

Como se lo usa en la presente documentación, el término residuo "canónico" hace referencia a un residuo en una CDR o un marco que define una estructura canónica de CDR particular, como lo definen Chotia et al. (J. Mol. Biol. 196:901-907 (1987); Chotia et al., J. Mol. Biol. 227:799 (1992), ambos incorporados en la presente documentación a modo de referencia). De acuerdo con Chotia et al., las porciones críticas de las CDR de muchos anticuerpos tienen conformaciones del esqueleto peptídico casi idénticas, a pesar de su gran diversidad a nivel de la secuencia de aminoácidos. Cada estructura canónica especifica principalmente un conjunto de ángulos de torsión del esqueleto peptídico para un segmento contiguo de residuos de aminoácidos que forman un rizo.

Como se los usa en la presente documentación, los términos "donante" y "anticuerpo donante" hacen referencia a un anticuerpo que proporciona una o más CDR. En una realización preferida, el anticuerpo donante es un anticuerpo de una especie diferente del anticuerpo del que se obtienen o derivan las regiones de marco. En el contexto de un anticuerpo humanizado, el término "anticuerpo donante" hace referencia a un anticuerpo no humano que proporciona una o más CDR.

Como se lo usa en la presente documentación, el término "marco" o "secuencia de marco hace referencia a las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Como la definición exacta de una secuencia CDR puede determinarse usando distintos sistemas, el significado de una secuencia de marco está sujeto a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDR (CDR-L1, L2 y L3 de la cadena liviana, y CDR-H1, H2 y H3 de la cadena pesada) también dividen las regiones de marco en la cadena liviana y la cadena pesada en cuatro sub-regiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, donde CDR1 está localizada entre FR1 y FR2, CDR2 está localizada entre FR2 y FR3, y CDR3 está localizada entre FR3 y FR4. Sin especificar las sub-regiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región de marco, tal como la han definido otros, representa las FR combinadas en la región variable de una sola cadena de inmunoglobulina de ocurrencia natural. Como se la usa en la presente documentación,

una FR representa una de las cuatro sub-regiones, y las FR representan dos o más de las cuatro sub-regiones que constituyen una región de marco.

En la técnica se conocen secuencias aceptoras de la cadena pesada y la cadena liviana humanas. En una realización de la invención, las secuencias aceptoras de la cadena pesada y la cadena liviana humanas se seleccionan entre las secuencias que se describen en la tabla 3 y la tabla 4. En dichas tablas se detallan distintas combinaciones de las secuencias de marco humanas FR1 a FR4.

Tabla 3. Secuencias aceptoras de la cadena pesada humana

SEQ ID Nº	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
15	VH3-48/JH3 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
16	VH3-48/JH3 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
17	VH3-48/JH3 FR3	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
18	VH3-48/JH3 FR4	WGQGTMVTVSS
15	VH3-48/JH4 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
16	VH3-48/JH4 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
17	VH3-48/JH4 FR3	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
19	VH3-48/JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
15	VH3-48/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
16	VH3-48/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
17	VH3-48/JH6 FR3	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
20	VH3-48/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
21	VH3-33/JH3 FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
22	VH3-33/JH3 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
23	VH3-33/JH3 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
18	VH3-33/JH3 FR4	WGQGTMVTVSS
21	VH3-33/JH4 FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
22	VH3-33/JH4 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
23	VH3-33/JH4 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
19	VH3-33/JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
21	VH3-33/JH6 FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
22	VH3-33/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVA

Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda

Patente De Invención

10-117825

Tomo: 2/2

SEQ ID Nº	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
23	VH3-33/JH6 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAR
20	VH3-33/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
24	VH3-23/JH3 FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF S
25	VH3-23/JH3 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
26	VH3-23/JH3 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAK
18	VH3-23/JH3 FR4	WGQGTMVTVSS
24	VH3-23/JH4 FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF S
25	VH3-23/JH4 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
26	VH3-23/JH4 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAK
19	VH3-23/JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
24	VH3-23/JH6 FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF S
25	VH3-23/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
26	VH3-23/JH6 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAK
20	VH3-23/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS

Tabla 4. Secuencias aceptoras de la cadena liviana humana

SEQ ID Nº	Región de la proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890 12
27	A18/JK2 FR1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC
28	A18/JK2 FR2	WYLQKPGQSPQLLIY
29	A18/JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYC
30	A18/JK2 FR4	FGQGTKLEIKR
31	A17/JK2 FR1	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
32	A17/JK2 FR2	WFQQRPGQSPRRLIY
33	A17/JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYC
30	A17/JK2 FR4	FGQGTKLEIKR

Como se lo usa en la presente documentación, el término "gen de anticuerpo de la línea germinal" o "fragmento de gen" hace referencia a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han pasado por el proceso de maduración que resulta en la redisposición genética y la mutación, cuyo fin es la expresión de una inmunoglobulina particular (véanse, por ejemplo, Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001)). Una de las ventajas proporcionadas por las diversas realizaciones de la presente invención deriva del descubrimiento de que los genes de anticuerpos de la línea germinal tienen mayores probabilidades que los genes de genes maduros de conservar estructuras esenciales en su secuencia de aminoácidos que son propias de los individuos de la especie, por lo que es menos probable sean reconocidos como extraños cuando se los use con fines terapéuticos en dicha especie.

Como se lo usa en la presente documentación, el término residuos "clave" hace referencia a determinados residuos dentro de la región variable que tienen un impacto mayor sobre la especificidad y/o la afinidad de unión de un anticuerpo, en particular, un anticuerpo humanizado. Un residuo clave incluye, no taxativamente, uno o más de los siguientes: un residuo que se halla adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (puede ser un sitio de N u O-glicosilación), un residuo raro, un residuo capaz de interactuar con el antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo canónico, un residuo de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena liviana, un residuo en la zona de Vernier, y un residuo en una región

donde se superpone una CDR1 de cadena pesada definida por Chotia y un marco de la primera cadena pesada definida por Kabat.

El término "anticuerpo humanizado", en general, hace referencia a anticuerpos que contienen secuencias de la región variable de las cadenas pesada y liviana de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, pollo, camélidos, ovejas o cabras), pero donde al menos una parte de la secuencia VH y/o VL ha sido alterada para que sean más "similares a humanos", es decir, para que sean más similares a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo con una CDR injertada donde las secuencias CDR humanas han sido insertadas en secuencias VH y VL no humanas para reemplazar las secuencias CDR no humanas correspondientes.

En particular, como se lo usa en la presente documentación, el término "anticuerpo humanizado" hace referencia específicamente a un anticuerpo, o una variante, un derivado, un análogo o un fragmento de éste, que se une de forma inmunoespecífica a un antígeno de interés, y que comprende una región de marco (FR) que sustancialmente tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región de determinación de la complementariedad (CDR) que sustancialmente tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Como se lo usa en la presente documentación, el término "sustancialmente", en el contexto de una CDR, hace referencia a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80%, preferiblemente al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la CDR de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado sustancialmente comprende la totalidad de al menos uno, y típicamente dos dominios variables (Fab, Fab', F(ab') 2, FabC, Fv), donde la totalidad o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana (es decir, el anticuerpo donante), y la totalidad o sustancialmente todas las regiones de marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina human. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene la cadena liviana y 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 solamente contiene una cadena liviana humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena pesada humanizada. En realizaciones específicas, un anticuerpo humanizado solamente contiene un dominio variable humanizado de una cadena liviana y/o una cadena pesada humanizada.

El anticuerpo humanizado puede seleccionarse entre cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgY, IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo, no taxativamente, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede

comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y los dominios constantes particulares pueden seleccionarse con el fin de optimizar las funciones efectoras deseadas usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

No es necesario que las regiones de marco y CDR de un anticuerpo humanizado correspondan con precisión a las secuencias progenitoras; por ejemplo, la CDR del anticuerpo donante o el marco consenso puede haber sido mutada mediante la sustitución, la inserción y/o la supresión de al menos un residuo de aminoácido, de modo que el residuo de la CDR o el marco en dicho sitio no corresponde al anticuerpo donante o al marco consenso. Sin embargo, en una realización preferida, estas mutaciones no son extensas. Comúnmente, al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente, al menos 90%, y más preferiblemente, al menos 95% de los residuos del anticuerpo humanizado corresponderán a los de las secuencias de las FR y CDR progenitoras. Como se lo usa en la presente documentación, el término "marco consenso" hace referencia a la región del marco en la secuencia de la inmunoglobulina consenso. Como se lo usa en la presente documentación, el término "secuencia de inmunoglobulina consenso" hace referencia a la secuencia formada con los aminoácidos de ocurrencia más frecuente (o nucleótidos) en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1987). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que aparece con mayor frecuencia en dicha posición en la familia. Cuando dos aminoácidos aparecen con igual frecuencia, cualquiera de ellos puede incluirse en la secuencia consenso.

Como se la usa en la presente documentación, la zona "Vernier" hace referencia a un subconjunto de residuos del marco que pueden ajustar la estructura de la CDR y ajustaría con precisión para que se una al antígeno como, lo describen Foote y Winter (1992, J. Mol. Biol. 224:487-499, que se incorpora en la presente documentación a modo de referencia). Los residuos de la zona Vernier forman una capa que queda debajo de las CDR, y pueden afectar la estructura de las CDR y la afinidad del anticuerpo.

El término "inhibición de la unión" de RGM a uno de sus receptores, como se lo usa en la presente documentación, abarca la reducción parcial (tal como, por ejemplo, de aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, o más) o completa de dicha actividad de unión al receptor. Dicha "inhibición de la unión" puede determinarse con cualquier método apropiado disponible en la técnica, preferiblemente con cualquier método mencionado en la presente documentación a modo de ejemplo, tal como los ensayos de unión basados en ELISA.

Como se lo usa en la presente documentación, el término "neutralización" hace referencia a la neutralización de la actividad biológica de una proteína blanco, cuando una proteína de unión se une específicamente a la proteína blanco. La neutralización puede ser el resultado de los distintos modos de unión de dicha proteína con el blanco. Por ejemplo, la neutralización puede ser provocada por la unión de la proteína de unión en

una región del blanco que no afecta la unión del receptor a la molécula blanco. Como alternativa, la unión de una proteína de unión puede resultar en un bloqueo de la unión del receptor al blanco, donde este bloqueo finalmente neutraliza la actividad de la proteína blanco. Cada uno de estos mecanismos puede tener lugar de acuerdo con la invención. Preferiblemente, una proteína de unión neutralizadora es un anticuerpo neutralizador, cuya unión a hRGM A resulta en la neutralización de una actividad biológica de hRGM A. Preferiblemente, la proteína de unión neutralizadora se une a hRGM A y reduce una actividad biológica de hRGM A al menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, o más. La neutralización de una actividad biológica de hRGM A por una proteína de unión neutralizadora puede determinarse midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica de hRGM A bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la neutralización de hRGM A revierte la inhibición en un ensayo de desarrollo neuronal NTera (véase el Ejemplo 3 más adelante). En el ensayo de desarrollo de neuritas NTera se evalúa la inhibición del desarrollo de las neuritas. En ausencia de una proteína RGM A o un fragmento de ésta, y en presencia del sustrato estimulador del desarrollo laminina, los agregados de neuronas NTera presentan una red extensa y densa de neuritas en desarrollo. RGM A o los fragmentos de RGM A inhiben el desarrollo de las neuritas, lo que resulta en neuritas más cortas y en menor cantidad. Los antagonistas que bloquean la función de RGM A, o los anticuerpos monoclonales, tales como el anticuerpo monoclonal 5F9, neutralizan la potente actividad de inhibición del desarrollo de las neuritas del fragmento de la cadena liviana de hRGM A conjugado con fc (aminoácidos 47-168) de la proteína RGM A humana en ensayos de desarrollo de neuritas con agregados de neuronas humanas diferenciadas NTera, lo que resulta en un incremento marcado en la longitud y la cantidad de neuritas.

Un "anticuerpo monoclonal neutralizador", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a una preparación de moléculas de anticuerpos que, al unirse a un antígeno específico, pueden competir e inhibir la unión del ligando natural de dicho antígeno. En una realización particular de esta solicitud, los anticuerpos neutralizadores de la presente invención pueden competir con RGM A por la unión a la neogenina y/o BMP-2 y BMP-4, lo que permite prevenir la actividad biológica o la función de RGM A. En particular, los anticuerpos neutralizadores de la presente invención pueden unirse a RGM A y prevenir la unión a la neogenina y/o a BMP2 y/o BMP-4, y pueden prevenir la actividad biológica o la función de RGM A. El término "actividad" incluye actividades tales como la especificidad de unión/afinidad de un anticuerpo por un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-hRGM A que se une a un antígeno de RGM A, y/o la potencia de neutralización de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-hRGM A, cuya unión a hRGM A inhibe la actividad biológica de hRGM A, por ejemplo, como puede determinarse en un ensayo de unión de hRGM A a neogenina, un ensayo de unión de hRGM A a BMP-2 o un ensayo de unión de hRGM A a BMP-4, como se describirá en la sección experimental más adelante. Puede establecerse que la actividad biológica de

RGM A regula la migración celular. Un ejemplo especial de la migración celular es el crecimiento de las neuritas, que se ve impedido o inhibido por las proteínas RGM A. Además, se ha demostrado que las proteínas RGM modulan la actividad de las proteínas BMP. En los ejemplos en la presente documentación se describe por un lado una actividad potenciadora sinérgica de las proteínas RGM sobre la vía de las BMP, y por otro, una actividad de inhibición de las proteínas RGM sobre la vía de las BMP, la cual es importante para la regulación del metabolismo del hierro, la regeneración de huesos y cartílagos, y en el SNC; para la remielinización y la regeneración.

El término "epitope" o "determinante antigénico" incluye cualquier determinante polopeptídico capaz de establecer una unión específica con una inmunoglobulina o un receptor de células T. En determinadas realizaciones, los epitopes determinantes incluyen agrupaciones superficiales de moléculas con actividad química, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilos o sulfonilos, y en determinadas realizaciones, pueden tener características específicas en su estructura tridimensional y/o características de carga específicas. Un epitope es una región de un antígeno donde se une un anticuerpo. En determinadas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce de forma preferencial su antígeno blanco en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

El término "resonancia de plasmón superficial", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un fenómeno óptico que permite analizar las interacciones bioespecíficas a tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas en una matriz biosensora, por ejemplo, usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia, y Piscataway, NJ). Para hallar descripciones adicionales, véanse Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., *et al.* (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; y Johnnson, B., *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

El término "K_{on}", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a la constante de velocidad de activación para la asociación de un anticuerpo con el antígeno para formar el complejo de anticuerpo/antígeno, como es conocido en la técnica.

El término "K_{off}", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a la constante de velocidad de desactivación para la disociación de un anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno, como es conocido en la técnica.

El término "Kd", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, como es conocido en la técnica.

El término "proteína de unión marcada", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a una proteína con una marca incorporada que permite identificar la proteína de unión. Preferiblemente, la marca es una marca detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión de porciones biotiniladas a un polipéptido, donde dichas porciones pueden ser detectadas por avidina

marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o una actividad enzimática que puede ser detectada por medios métodos ópticos o colorimétricos). Los ejemplos de marcas para polipéptidos incluyen, no taxativamente, los que se indican a continuación: radioisótopos o radionucleidos (por ejemplo, ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho o ^{153}Sm); marcas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, lantánidos fosforados), marcas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcas quimioluminiscentes; grupos biotinilo; epitopes polipeptídicos predeterminados reconocidos por una marca secundaria (por ejemplo, secuencias de pares de cierres de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios que se unen a metales, marcas de epitopes); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio.

El término "anticuerpo conjugado" hace referencia a una proteína de unión, tal como un anticuerpo, unida a una segunda porción química, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término "agente" se utiliza en la presente documentación para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto obtenido a partir de materiales biológicos. Preferiblemente, los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, no taxativamente, toxinas pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracin diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de éstos.

Los términos "cristal" y "cristalizado", como se los usa en la presente documentación, hacen referencia a un anticuerpo o una porción de unión a antígeno de éste que existe en forma de un cristal. Los cristales son una forma de materia en estado sólido que es diferente de otras formas, tales como el estado sólido amorfo o el estado líquido cristalino. Los cristales están compuestos por disposiciones de átomos, iones o moléculas tridimensionales, repetitivas y regulares (por ejemplo, proteínas, tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (por ejemplo, complejos de antígenos/anticuerpos). Estas disposiciones tridimensionales siguen relaciones matemáticas bien comprendidas en el campo. La unidad fundamental, o bloque de construcción, que se repite en un cristal, se denomina unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que satisface una simetría cristalográfica dada y bien definida provee la "célula individual" del cristal. La repetición de la célula individual por repeticiones regulares en las tres dimensiones provee el cristal. Véanse Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2ª edición, pp. 20 1-16, Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, (1999).

El término "polinucleótido", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos, o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término

incluye formas de ADN de cadena simple y doble, pero preferiblemente es ADN de cadena doble.

El término "polinucleótido aislado", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un polinucleótido (por ejemplo, genómico, basado en ADNc o de origen sintético, o alguna combinación de éstos) que, en virtud de su origen, no está asociado con la totalidad o una porción de un polinucleótido con el que dicho "polinucleótido aislado" se hallaría en la naturaleza, está unido a un polinucleótido con el que no está unido en la naturaleza, o no aparece en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

El término "vector", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que designa un rizo de ADN circular de cadena doble con el que pueden unirse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, que permite unir segmentos de ADN adicionales al genoma viral. Determinados vectores son capaces de replicarse en forma autónoma en la célula huésped en la que han sido introducidos (por ejemplo, los vectores bacterianos con un origen de replicación en bacterias y los vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped al introducirse en ella, por lo que se replican junto con el genoma del huésped. Más aún, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes con los que están unidos operativamente. Estos vectores se conocen en la presente documentación como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión útiles para los procedimientos de ADN recombinante comúnmente toman la forma de plásmidos. En esta solicitud, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector de uso más común. Sin embargo, la invención pretende incluir estas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), que tienen funciones equivalentes.

El término "unido operativamente" hace referencia a una yuxtaposición donde los componentes descriptos se hallan en una relación que les permite funcionar de la manera deseada. Una secuencia control "unida operativamente" a una secuencia codificante está ligada de modo tal que la expresión de la secuencia codificante se obtiene bajo condiciones compatibles con las secuencias control. Las secuencias "unidas operativamente" incluyen secuencias de control de la expresión que se hallan contiguas al gen de interés y secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de la expresión", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para obtener la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que están unidas. Las secuencias de control de la expresión incluyen

secuencias apropiadas para el inicio de la transcripción, la terminación, secuencias promotoras y potenciadoras; señales eficaces para el procesamiento del ARN, tales como secuencias de separación y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de las proteínas; y cuando se lo desea, secuencias que mejoran la secreción de las proteínas. La naturaleza de estas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped. En procariotas, estas secuencias de control generalmente incluyen promotores, sitios de unión a ribosomas y secuencias de terminación de la transcripción. En eucariotas, en general, estas secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" incluye componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias directrices y secuencias que son asociados de fusión.

La "transformación", como se la define en la presente documentación, hace referencia a cualquier proceso con el cual el ADN exógeno ingresa en una célula huésped. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales, usando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede basarse en cualquier método conocido para insertar secuencias de ácidos nucleicos extrañas en células huésped procariotas o ecuariotas. El método se selecciona sobre la base de la célula huésped a transformar, y puede incluir, no taxativamente, la infección viral, la electroporación, la lipofección y el bombardeo de partículas. Estas células "transformadas" incluyen células transformadas de forma estable, donde el ADN insertado puede replicarse como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma del huésped. También incluyen células que expresan de forma transitoria el ADN o el ARN insertado por períodos de tiempo limitados.

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a la célula en la que se introduce ADN exógeno. Ha de comprenderse que estos términos no solamente hacen referencia a la célula sujeto particular, sino a la progenie de dicha célula. Como es posible que ocurran modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, de hecho, esta progenie puede no ser idéntica a la célula progenitora, pero aún se incluye dentro del término "célula huésped", tal como se lo usa en la presente documentación. Preferiblemente, las células huésped incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas entre cualquiera de los reinos de la vida. Las células eucariotas preferidas incluyen células protistas, fúngicas, vegetales y animales. Más preferiblemente, las células huésped incluyen, no taxativamente, células procariotas de la línea de *E. coli*; las líneas de células de mamíferos CHO, HEK 293 y COS; la línea de células de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Pueden emplearse técnicas convencionales para la síntesis de ADN recombinante y oligonucleótidos, y para cultivo y la transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y los procedimientos de purificación pueden llevarse a cabo de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes, de maneras conocidas en la técnica o como se describe en la presente documentación. Las técnicas y los procedimientos mencionados en general pueden llevarse a cabo se acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica, y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se describen en toda la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: *A Laboratory Manual* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), cuyo contenido se incorpora en la presente documentación a modo de referencia para cualquier propósito.

Un "organismo transgénico", como es conocido en la técnica y como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un organismo que tiene células que contienen un transgen, donde el transgen introducido en el organismo (o cualquier ancestro del organismo) expresa un polipéptido que no se expresa naturalmente en el organismo. Un "transgen" es una construcción de ADN que se integra de forma estable y operativa en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un organismo transgénico, donde dirige la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos celulares o tejidos del organismo transgénico.

Los términos "regular" y "modular" se usan indistintamente, y como se los emplea en la presente documentación, hacen referencia a un cambio o una alteración en la actividad de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de hRGM A). La modulación puede ser un incremento o una disminución en la magnitud de una actividad o una función determinada de la molécula de interés. Los ejemplos de actividades y funciones de una molécula incluyen, no taxativamente, características de unión, actividad enzimática, activación de receptores celulares y transducción de señales.

Correspondientemente, el término "modulador", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o una función de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de hRGM A). Por ejemplo, un modulador puede provocar un incremento o una disminución en la magnitud de una actividad o una función determinada de una molécula, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del modulador. En algunas realizaciones, un modulador es un inhibidor que disminuye la magnitud de al menos una actividad o función de una molécula. El término "agonista", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca un incremento en la magnitud de una actividad o una función determinada, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del agonista. Los agonistas particulares de interés pueden incluir, no taxativamente, polipéptidos de hRGM A, o proteínas, ácidos nucleicos, hidratos

de carbono o cualquier otra molécula que se una a hRGM A. El término "antagonista", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca una disminución en la magnitud de una actividad o una función determinada de la molécula, en comparación con la magnitud de la actividad o la función que se observa en ausencia del antagonista. Los ejemplos de antagonistas incluyen, no taxativamente, proteínas, péptidos, anticuerpos, pepticuerpos, hidratos de carbono o pequeñas moléculas orgánicas, los pepticuerpos se describen, por ejemplo, en WO 01/83525. Los antagonistas de interés particulares incluyen aquellos que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica de hRGM A. Los antagonistas de hRGM A pueden incluir, no taxativamente, proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, o cualquier otra molécula que se una a hRGM A, como los anticuerpos monoclonales que interactúan con la molécula RGM A. Vale destacar que la interacción con RGM A puede resultar en la unión y la neutralización de otros ligandos/componentes de la membrana célula, y puede ser útil para obtener un funcionamiento aditivo o sinérgico contra varias enfermedades.

Como se lo usa en la presente documentación, el término "cantidad eficaz" hace referencia a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la severidad y/o la duración de un trastorno o uno o más de sus síntomas, prevenir el avance de un trastorno, provocar la regresión de un trastorno, prevenir la recurrencia, el desarrollo, el inicio o la progresión de uno o más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno, o potenciar o mejorar el o los efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico).

El término "muestra", como se lo usa en la presente documentación, se usa en su sentido más amplio. Una "muestra biológica", como se la usa en la presente documentación, incluye, no taxativamente, una cantidad de una sustancia de un organismo vivo o un organismo que estuvo vivo. Estos organismos vivos incluyen, no taxativamente, seres humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Estas sustancias incluyen, no taxativamente, sangre, suero, orina, fluido sinovial, células, órganos, tejidos, médula ósea, nódulos linfáticos y bazo.

2. Polipéptidos que se unen a hRGM A

La realización principal de esta solicitud comprende proteínas o polipéptidos aislados que se unen específicamente a al menos un epitope de una proteína RGM A. Las proteínas o los polipéptidos aislados que se unen específicamente a al menos un epitope de una proteína RGM A pueden inhibir la unión de RGM A a su receptor, la neogenina, y/o a las proteínas morfogenética óseas 2 y 4 (BMP-2, BMP-4).

La realización más preferida de esta solicitud comprende anticuerpos que se unen a RGM A y/o BMP-2 y/o BMP-4, o porciones de unión a antígeno o fragmentos de éstos.

Preferiblemente, los anticuerpos anti-RGM A de la presente invención presentan una capacidad elevada de reducir o neutralizar la actividad de RGM A, lo que puede

evaluarse, por ejemplo, con cualquiera de los diversos ensayos in vitro e in vivo conocidos en la técnica o descriptos en la presente documentación.

Más preferiblemente, esta solicitud se relaciona con anticuerpos monoclonales neutralizadores contra RGM A que previenen selectivamente la unión de RGM A a su receptor, la neogenina, y a las proteínas morfogenéticas óseas 2 y 4 (BMP-2, BMP-4), y con la generación de un anticuerpo monoclonal neutralizador contra RGM A que previenen selectivamente la unión de RGM A a sus correceptores, las proteínas morfogenéticas óseas 2 y 4 (BMP-2, BMP-4).

Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal neutralizador de esta solicitud es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. El término "anticuerpo humano" hace referencia a anticuerpos que tienen regiones variables y constantes que corresponden o derivan de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, véase Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH Nº 91-3242, 1991). Los anticuerpos humanos de esta solicitud, sin embargo, pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones que han sido introducidas por mutagénesis al azar o con especificidad de sitio in vitro, o por mutaciones somáticas in vivo), por ejemplo, en las CDR, y en particular, en CDR3.

En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos neutralizadores más preferidos de esta solicitud se mencionan en la presente documentación como mAb5F9 y mAb8D1, y los fragmentos de éstos que son anticuerpos funcionales, al igual que otros anticuerpos y fragmentos que son anticuerpos funcionales y presentan propiedades equivalentes a las de mAb5F9 y mAb8D1, tales como la afinidad de unión elevada por RGM A, con una cinética de disociación baja y una capacidad de neutralización alta, también forman parte de la presente invención. La afinidad de unión y la constante de disociación de un anticuerpo anti-RGM A de esta solicitud con relación a un polipéptido inmunogénico RGM A, o un fragmento de éste, pueden determinarse con cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la afinidad de unión puede medirse con ELISA competitivos, radioinmunoensayos, tecnología BIAcore o KinExA. La velocidad de disociación también puede medirse con tecnología BIAcore o KinExA. La afinidad de unión y la velocidad de disociación pueden medirse por resonancia de plasmón superficial, usando, por ejemplo, un dispositivo BIAcore.

Uno de los anticuerpos monoclonales preferidos de esta solicitud, el anticuerpo mAb5F9, tiene al menos 90% de identidad de secuencia a nivel de los aminoácidos con una secuencia que comprende una región variable de la cadena pesada (región VH) que comprende la secuencia de SEQ ID Nº 9 ó 34, y una región variable de la cadena liviana (región VL) que comprende la secuencia de SEQ ID Nº 10.

Los anticuerpos monoclonales aislados que interactúan con RGM A de esta solicitud también pueden ser una proteína de unión glicosilada, donde el anticuerpo o la porción de unión a antígeno de éste comprende uno o más residuos de hidratos de carbono. La producción nativa de proteínas *in vivo* puede incluir un procesamiento adicional, conocido como modificación postraduccional. En particular, pueden agregarse residuos de azúcares (glicosilo) en forma enzimática, un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes, que contienen cadenas laterales de oligosacáridos unidas en forma covalente, son conocidas como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. La glicosilación de las proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como de la célula huésped en la cual se expresa la proteína. Distintos organismos pueden producir enzimas de glicosilación diferentes (por ejemplo, glicosiltransferasas y glicosidasas), y pueden tener diferentes sustratos (azúcares nucleotídicos) disponibles. Debido a dichos factores, el patrón de glicosilación, y la composición de residuos glicosídicos, pueden diferir dependiendo del sistema huésped en el cual se expresa la proteína en particular. Entre los residuos glicosídicos útiles en la invención pueden incluirse, no taxativamente, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido síalico. Preferiblemente, la proteína de unión glicosilada comprende residuos glicosídicos que permiten obtener un patrón de glicosilación humano.

Los anticuerpos de esta solicitud comprenden una región constante de la cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, IgY o IgD. Aún más, el anticuerpo puede comprender una región constante de la cadena liviana, una región constante de la cadena liviana kappa o una región constante de la cadena liviana lambda. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena liviana kappa. Como alternativa, la porción de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena simple. Los reemplazos de residuos de aminoácidos en la porción Fc para alterar la función efectora del anticuerpo son conocidos en la técnica (Winter, *et al.* Patentes de los EEUU Nº 5648260, 5624821) La porción Fc de un anticuerpo es mediadora de diferentes funciones efectoras importantes, por ejemplo, la inducción de citoquinas, la ADCC, la fagocitosis, la citotoxicidad mediada por complemento (CDC), y la velocidad de eliminación/vida media de los anticuerpos y los complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para anticuerpos terapéuticos, pero en otros casos, pueden ser innecesarias o incluso perjudiciales, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Determinados isotipos de la IgG humana, en particular IgG1 e IgG3, son mediadores de la ADCC y la CDC a través de la unión a FcγRs y al complemento C1q, respectivamente. Los receptores Fc neonatales (FcRn) son componentes críticos en la determinación de la vida media en circulación de los anticuerpos. En aún otra realización, al menos un residuo de aminoácido es reemplazado en la región constante del anticuerpo, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo, de manera que estas funciones efectoras del anticuerpo resultan alteradas.

3. Generación de anticuerpos anti-hRGM A

3.1. General

Los anticuerpos de esta solicitud pueden generarse inmunizando un huésped apropiado (por ejemplo, vertebrados, incluyendo seres humanos, ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, ganado bovino, caballos, peces y anfibios, y huevos de aves, reptiles y peces). Para generar los anticuerpos de esta solicitud, se inmuniza el huésped con un polipéptido inmunogénico de RGM A de la invención, o un fragmento de éste. En la presente documentación, el término "inmunización" hace referencia al proceso que comprende la presentación de un antígeno a un repertorio inmune, el cual puede existir en un organismo natural, sin alteraciones genéticas, o puede provenir de un organismo transgénico, incluyendo aquellos modificados para que presenten un repertorio inmune humano artificial. De manera similar, una "preparación inmunogénica" es una formulación de antígeno que contiene coadyuvantes u otros aditivos que potenciarán la inmunogenicidad del antígeno.

La inmunización de los animales puede efectuarse con cualquier método conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1990. En la técnica se conocen métodos para inmunizar animales no humanos, tales como ratones, ratas, ovejas, carbas, ganado bovino y caballos. Véanse, por ejemplo, Harlow y Lane, y la Patente de los EEUU Nº 5994619. En una realización preferida, el antígeno de RGM A se administra con un coadyuvante para estimular la respuesta inmune. Estos coadyuvantes incluyen el coadyuvante completo o incompleto de Freund, RIBI (muramil dipéptidos) o ISCOM (complejos de inmunocoloración). Estos coadyuvantes pueden proteger el polipéptido de una dispersión rápida secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al huésped para que secrete factores quimiotácticos para los macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Preferiblemente, si se administra un polipéptido, el cronograma de inmunización comprenderá dos o más administraciones del polipéptido, distribuidas en un período de varias semanas.

Se contempla la posibilidad de inmunizar el animal huésped con el antígeno asociado con la membrana de una célula intacta o destruida, con el fin de identificar los anticuerpos de esta solicitud mediante la unión a un polipéptido inmunogénico de la invención. Una vez realizada la inmunización del animal huésped con el antígeno, es posible obtener anticuerpos del animal. Se obtiene suero que contiene anticuerpos del animal por exsanguinación o sacrificando el animal. El suero puede usarse tal como se lo obtiene del animal, puede obtenerse una fracción de inmunoglobulina del suero, o los anticuerpos pueden purificarse a partir del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidas de este modo son policlonales, por lo que tienen una serie heterogénea de propiedades.

3.2. Anticuerpos monoclonales anti-RGM A obtenidos usando tecnología de hibridomas

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando una amplia variedad de procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de éstas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando técnicas que comprenden hibridoma, incluyendo aquellas conocidas en la técnica y descriptas, por ejemplo, en Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición, 1988); Hammerling, et al., en Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (estas referencias se incorporan a modo de referencia en su totalidad). El término "anticuerpo monoclonal", como se lo usa en la presente documentación, no se limita a los anticuerpos producidos con tecnología de hibridomas. El término "anticuerpo monoclonal" hace referencia a un anticuerpo que deriva de un clon individual, que incluye cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no el método con el que se lo produce.

Los métodos para producir y buscar anticuerpos específicos usando tecnología de hibridomas son de uso común y bien conocidos en la técnica. En una realización, en la presente invención se proveen métodos para generar anticuerpos monoclonales, y también anticuerpos producidos con el método que comprende cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la invención, donde preferiblemente, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno de la invención con células de mieloma, y luego analizando los hibridomas que resultan de la fusión para hallar los clones de hibridomas que secretan un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la invención. Brevemente, es posible inmunizar ratones con un antígeno de RGM A. En una realización preferida, el antígeno de RGM A se administra con un coadyuvante para estimular la respuesta inmune. Estos coadyuvantes incluyen el coadyuvante completo o incompleto de Freund, RIBI (muramil dipéptidos) o ISCOM (complejos de inmunocoloración). Estos coadyuvantes pueden proteger el polipéptido de una dispersión rápida secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al huésped para que secrete factores quimiotácticos para los macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Preferiblemente, si se administra un polipéptido, el cronograma de inmunización comprenderá dos o más administraciones del polipéptido, distribuidas en un período de varias semanas.

Una vez que se detecta una respuesta inmune, por ejemplo, una vez que se detectan los anticuerpos específicos para el antígeno de RGM A en el suero del ratón, se cosecha el bazo del ratón y se aíslan esplenocitos. Después, los esplenocitos se fusionan de acuerdo con procedimientos bien conocidos a cualquier célula de mieloma apropiada, por ejemplo, células de la línea celular SP20, disponible en la ATCC. Los hibridomas se seleccionan y se clonan por dilución limitada. Después, los clones de hibridomas se evalúan con métodos conocidos en la técnica para determinar si hay células que secreten anticuerpos capaces de unirse a RGM A. Es posible generar fluido de ascites, que

generalmente contiene niveles elevados de anticuerpos, inmunizando los ratones con clones de hibridomas positivos.

En otra realización, los hibridomas inmortalizados productores de anticuerpos pueden prepararse a partir del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y las células B de bazo se fusionan a células de mieloma inmortalizadas, como es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*. En una realización preferida, las células de mieloma no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea de células no secretoras). Una vez completada la fusión y la selección con antibióticos, los hibridomas se analizan usando RGM A o una porción de ésta, o una célula que expresa RGM A. En una realización preferida, el análisis inicial se realiza usando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), preferiblemente un ELISA. Se proporciona un ejemplo de análisis ELISA en WO 00/37504, incorporada en la presente documentación a modo de referencia.

Los hibridomas productores de anticuerpos anti-RGM A se seleccionan, se clonan y se someten a un análisis adicional para determinar la presencia características deseables, incluyendo un crecimiento robusto del hibridoma, una producción elevada de anticuerpos, y la presencia de características deseables en dichos anticuerpos, como se describirá con mayor detalle más adelante. Los hibridomas pueden cultivarse y expandirse *in vivo* en animales singeneicos, en animales que carecen de sistema inmune, por ejemplo, ratones desnudos, o en un cultivo celular *in vitro*. Los métodos para seleccionar, clonar y expandir hibridomas son bien conocidos por aquellos entrenados en la técnica.

En una realización preferida, los hibridomas son hibridomas de ratón, como se describió con anterioridad. En otra realización preferida, los hibridomas se producen en un animal no humano, en una especie distinta del ratón, tal como la rata, la oveja, el cerdo, el ganado bovino o el caballo. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos, donde un mieloma no secretor humano se fusiona con una célula humana que expresa un anticuerpo anti-RGM A.

Los fragmentos de anticuerpos que reconocen epitopes específicos pueden generarse de acuerdo con técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')2 de la invención pueden producirse mediante el corte proteolítico de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')2). Los fragmentos F(ab')2 contienen la región variable, la región constante de la cadena liviana y el dominio CHI de la cadena pesada.

3.3. Anticuerpos monoclonales anti-RGM A obtenidos usando SLAM

En otro aspecto de la invención, se generan anticuerpos recombinantes a partir de linfocitos individuales aislados usando un procedimiento conocido en la técnica como el método de anticuerpos con linfocitos seleccionados (SLAM), como se describe en la Patente de los EEUU Nº 5627052, la Publicación PCT WO 92/02551, y Babcock, J.S. *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848. En este método, se analizan células

individuales que secretan anticuerpos de interés, por ejemplo, linfocitos derivados de cualquiera de los animales inmunizados descriptos con anterioridad, usando un ensayo en placas hemolíticas con especificidad por el antígeno, donde el antígeno de RGM A, una subunidad de RGM A o un fragmento de ésta, se une a eritrocitos de oveja usando un conector, tal como biotina, y se usa para identificar células individuales que secretan anticuerpos con especificidad por RGM A. Una vez identificadas las células que secretan los anticuerpos de interés, se rescatan moléculas de ADNc de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de las células por PCR con transcriptasa inversa, y estas regiones variables pueden expresarse posteriormente en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (por ejemplo, regiones constantes humanas), en células huésped de mamíferos, tales como células COS o CHO. Las células huésped transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, derivadas de linfocitos seleccionados *in vivo*, pueden someterse a análisis adicionales y a una selección posterior *in vitro*, por ejemplo, analizando las células transfectadas para aislar aquellas células que expresen anticuerpos contra RGM A. Además, las secuencias de inmunoglobulina amplificadas pueden manipularse *in vitro*, tal como con métodos de maduración por afinidad *in vitro* como los que se describen en la Publicación PCT WO 97/29131 y la Publicación PCT WO 00/56772.

3.4. Anticuerpos monoclonales anti-RGM A obtenidos usando animales transgénicos

En otra realización de la presente invención, los anticuerpos se producen inmunizando un animal no humano que comprende algunos o todos los loci de la inmunoglobulina humana con un antígeno de RGM A. En una realización preferida, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón modificada que comprende fragmentos grandes de loci de inmunoglobulina humana y presenta una producción de anticuerpos diferentes. Véanse, por ejemplo, Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994), y las Patentes de los EEUU Nº 5916771, 5939598, 5985615, 5998209, 6075181, 6091001, 6114598 y 6130364. Véanse también WO 91/10741, publicada el 25 de Julio de 1991, WO 94/02602, publicada el 3 de Febrero de 1994, WO 96/34096 y WO 96/33735, ambas publicadas el 31 de Octubre de 1996, WO 98/16654, publicada el 23 de Abril de 1998, WO 98/24893, publicada el 11 de Junio de 1998, WO 98/50433, publicada el 12 de Noviembre de 1998, WO 99/45031, publicada el 10 de Septiembre de 1999, WO 99/53049, publicada el 21 de Octubre de 1999, WO 00/09560, publicada el 24 de Febrero de 2000, y WO 00/037504, publicada el 29 de Junio de 2000. El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio de anticuerpos completamente humanos similar al de un ser humano adulto y genera anticuerpos monoclonales humanos con especificidad por el antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE contiene aproximadamente 80% del repertorio humano merced a la introducción de fragmentos YAC con la configuración de la línea germinal humana, con un tamaño en el orden de las megabases, que contienen loci de la cadena pesada humana y loci de la cadena liviana humana. Véanse Mendez et al.,

Nature Genetics 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998), cuyas descripciones se incorporan en la presente documentación a modo de referencia.

3.5. Anticuerpos monoclonales anti-RGM A obtenidos usando bibliotecas de anticuerpos recombinantes

También pueden usarse métodos *in vitro* para preparar los anticuerpos de la invención, donde se analiza una biblioteca de anticuerpos para identificar un anticuerpo que tiene la especificidad de unión deseada. Los métodos para analizar bibliotecas de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica, e incluyen los métodos que se describen, por ejemplo, en Ladner *et al.* Patente de los EEUU Nº 5223409; Kang *et al.* Publicación PCT Nº WO 92/18619; Dower *et al.* Publicación PCT Nº WO 91/17271; Winter *et al.* Publicación PCT Nº WO 92/20791; Markland *et al.* Publicación PCT Nº WO 92/15679; Breitling *et al.* Publicación PCT Nº WO 93/01288; McCafferty *et al.* Publicación PCT Nº WO 92/01047; Garrard *et al.* Publicación PCT Nº WO 92/09690; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; y Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982, la publicación de solicitud de patente de los EEUU 20030186374, y la Publicación PCT Nº WO 97/29131, cuyos contenidos se incorporan en la presente documentación a modo de referencia.

La biblioteca de anticuerpos recombinantes puede provenir de un sujeto inmunizado con RGM A, o con una porción de RGM A. Como alternativa, la biblioteca de anticuerpos recombinantes puede provenir de un sujeto sin tratar, es decir, uno que no ha sido inmunizado con RGM A, tal como una biblioteca de anticuerpos humanos de un sujeto humano que no ha sido inmunizado con RGM A humana. Los anticuerpos de la invención se seleccionan analizando la biblioteca de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende RGM A humana, con el fin de seleccionar aquellos anticuerpos que reconocen RGM A. Los métodos para efectuar estos procedimientos de análisis y selección son bien conocidos en la técnica, y pueden hallarse en las referencias citadas en el párrafo anterior. Para seleccionar los anticuerpos de la invención que tienen afinidades de unión particulares por hRGM A, tales como aquellos que se disocian de RGM A humana con una constante de desactivación particular, puede usarse el método conocido en la técnica de resonancia de plasmón superficial para seleccionar los anticuerpos que tienen la constante de desactivación deseada. Para seleccionar los anticuerpos de la invención que tienen una actividad de neutralización de hRGM A particular, tales como aquellos que presentan una IC_{50} particular, pueden usarse métodos convencionales conocidos en la técnica para determinar la inhibición de la actividad de hRGM A.

En un aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo aislado, o con una porción de unión a antígeno de éste que se une a RGM A humana. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizador. En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal.

Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención también pueden generarse usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, se presentan dominios de anticuerpos funcionales en la superficie de partículas de fagos que contienen las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, estos fagos pueden utilizarse para presentar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o una biblioteca de combinación de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés pueden seleccionarse o identificarse con un antígeno, por ejemplo, usando un antígeno marcado o un antígeno unido o capturado en una superficie sólida o una esfera. Los fagos usados en estos métodos típicamente son fagos filamentosos, e incluyen los dominios de unión fd y M13, expresados a partir de fagos con Fab, Fv o dominios de anticuerpos Fv estabilizados por enlaces disulfuro fusionados en forma recombinante al gen III o al gen VIII de proteínas del fago. Los ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos descriptos en Brinkman et al., *J. Inmunol. Methods* 182:41-50 (1995); Ames et al., *J. Inmunol. Métodos* 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Inmunol.* 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187 9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Inmunology* 57:191-280 (1994); la Solicitud PCT Nº. PCT/GB91/01134; las Publicaciones PCT WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401; y las Patentes de los EEUU Nº 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780 225, 5658727, 5733743 y 5969108, cada uno de los cuales se incorpora en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad.

Como se describe en las referencias anteriores, una vez seleccionados los fagos, las regiones codificantes del anticuerpo obtenidas de los fagos pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y pueden expresarse en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, levaduras y bacterias, por ejemplo, como se describirá con mayor detalle más adelante. Por ejemplo, también pueden emplearse procedimientos para la producción recombinante de fragmentos Fab, Fab' y $F(ab')_2$ donde se usan métodos conocidos en la técnica, tales como los que se describen en la Publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992); Sawai et al., *AJRI* 34:26-34 (1995); y Better et al., *Science* 240:1041-1043 (1988) (dichas referencias se incorporan a modo de referencia en su totalidad). Los ejemplos de procedimientos que pueden usarse para producir Fv de cadenas individuales y anticuerpos incluyen aquellos que se describen en las Patentes de

los EEUU Nº 4946778 y 5258498; Huston et al., *Métodos in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu et al., *PNAS* 90:7995-7999 (1993); y Skerra et al., *Science* 240:1038-1040 (1988).

Como alternativa al análisis de bibliotecas de anticuerpos recombinantes mediante la presentación en fagos, pueden aplicarse otras metodologías conocidas en la técnica para analizar grandes bibliotecas de combinación con el fin de identificar anticuerpos de especificidad doble de acuerdo con la invención. Un tipo de sistema de expresión alternativa es uno donde la biblioteca de anticuerpos recombinantes se expresa como fusiones de ARN-proteínas, como se describe en la Publicación PCT Nº WO 98/31700, por Szostak y Roberts, y en Roberts, R.W. y Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302. En este sistema, se crea una fusión covalente entre un ARNm y el péptido o la proteína que codifica mediante la traducción *in vitro* de ARNm sintéticos que contienen puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, en su extremo 3'. Por consiguiente, un ARNm específico puede enriquecerse a partir de una mezcla compleja de ARNm (por ejemplo, una biblioteca de combinación) sobre la base de las propiedades del péptido o la proteína codificada, por ejemplo, el anticuerpo o la porción de éste, tales como la unión del anticuerpo o la porción de éste al antígeno de especificidad doble. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o porciones de éstos, recuperadas del análisis de dichas bibliotecas, pueden expresarse por medios recombinantes como se describió con anterioridad (por ejemplo, en células huésped de mamífero), y más aún, pueden someterse a una maduración de afinidad adicional con procedimientos adicionales de análisis de fusiones de ARNm-péptidos en cuyas secuencias originales se han introducido mutaciones, o con otros métodos de maduración por afinidad *in vitro* de anticuerpos recombinantes, como se describió con anterioridad.

En otro abordaje, los anticuerpos de la presente invención también pueden generarse usando métodos de presentación en levaduras conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en levaduras, se usan métodos genéticos para unir dominios de anticuerpos a la pared celular de la levadura, de modo que sean presentados en la superficie de la levadura. En particular, estas levaduras pueden utilizarse para presentar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o una biblioteca de combinación de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). Los ejemplos de métodos de presentación en levaduras que pueden usarse para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos descriptos en Wittrup, et al., Patente de los EEUU Nº 6699658 incorporada en la presente documentación a modo de referencia.

4. Producción de anticuerpos recombinantes contra RGM A particulares de la inveción

Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse con cualquiera de una cantidad de procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la expresión puede efectuarse a partir de células huésped en las cuales se han transfectado uno o más vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y liviana de acuerdo con

procedimientos convencionales. Las diversas formas del término "transfección" abarcan una amplia variedad de procedimientos de uso común para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, y semejantes. Aunque es posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procariotas o eucariotas, es preferible la expresión de los anticuerpos en células aucariotas, y es más preferible en células huésped de mamíferos, ya que la probabilidad de que se ensamble y se secrete un anticuerpo plegado correctamente y con actividad inmunológica es mayor en dichas células eucariotas (y en particular, en células de mamíferos) que en las células eucariotas.

Las células huésped de mamíferos preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células CHO (incluyendo las células CHO dhfr$^-$ descriptas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, que se usan en combinación con un marcador de selección DHFR, como se describe, por ejemplo, en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que contienen genes que codifican el anticuerpo se introducen en células huésped de mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped hasta que el anticuerpo se expresa en dichas células huésped, o preferiblemente, el anticuerpo se secreta en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Después, los anticuerpos pueden aislarse del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales.

Del mismo modo, es posible usar células huésped para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Ha de comprenderse que las variaciones del procedimiento anterior se hallan dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifica fragmentos funcionales de la cadena liviana y/o la cadena pesada de un anticuerpo de esta invención. La tecnología de ADN recombinante también puede usarse para retirar una parte o la totalidad del ADN que codifica las cadena liviana y/o la cadena pesada que no es necesario para la unión con los antígenos de interés. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncadas también quedan incluidas dentro de los anticuerpos de la invención. Además, es posible producir anticuerpos bifuncionales, donde una cadena pesada y una cadena liviana son un anticuerpo de la invención, y la otra cadena pesada y la otra cadena liviana tienen especificidad por un antígeno diferente del antígeno de interés, por medio del cruzamiento de un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo, de acuerdo con métodos de cruzamiento químico convencionales.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno de éste, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica la cadena pesada del anticuerpo y la cadena liviana del

anticuerpo en células CHO dhfr⁻ a través de una transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo están unidos operativamente en cada caso a elementos reguladores, que consisten en el potenciador de CMV y el promotor AdMLP, con el fin de obtener niveles de transcripción elevados de los genes. El vector de expresión recombinante también contiene un gen DHFR, que permite seleccionar las células CHO dhfr⁻ transfectadas con el vector usando una selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformadas seleccionadas se cultivan de modo que se expresen las cadenas pesada y liviana del anticuerpo, y el anticuerpo intacto se aísla del medio de cultivo. Se usan técnicas convencionales de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar las transformantes, cultivar dichas células huésped y obtener el anticuerpo del medio de cultivo. Adicionalmente, en la invención se provee un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la invención, que comprende cultivar una célula huésped de la invención en un medio de cultivo apropiado hasta que se ha sintetizado un anticuerpo recombinante de la invención. Además, el método puede comprender aislar dicho anticuerpo recombinante del medio de cultivo.

4.1. Anticuerpos anti-RGM A

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

Tabla 5. Lista de secuencias de aminoácidos de regiones VH y VL de los anticuerpos anti-hRGM A 5F9 y 8D1

SEQ ID Nº	Región de la proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
34	**VH 5F9**		EVQLVESGGGLVQPGSSLKLSCVA SGFTFS**NYGMN**WIRQAPKKGLEWI G**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLEMNSLRSEDTAIYYCA K**GTTPDY**WGQGVMVTVSS
57	VH 5F9 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID Nº 34	**NYGMN**
58	VH 5F9 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID Nº 34	**MIYYDSSEKHYADSVKG**
59	VH 5F9 CDR-H3	Residuos 99-104 de SEQ ID Nº 34	**GTTPDY**
10	**VL 5F9**		DVVLTQTPVSLSVTLGDQASMSC**R SSQSLEYSDGYTFLE**WFLQKPGQS PQLLIY**EVSNRFS**GVPDRFIGSGSG TDFTLKISRVEPEDLGVYYC**FQATH DPLT**FGSGTKLEIKR
60	VL 5F9 CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID Nº 10	**RSSQSLEYSDGYTFLE**
61	VL 5F9 CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID Nº 10	**EVSNRFS**
62	VL 5F9 CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID Nº 10	**FQATHDPLT**

SEQ ID Nº	Región de la proteína		Secuencia
			12345678901234567890123456789 **0**
55	**VH 8D1**		EVQLQQSGPELVKPGTSVKMSCKT SGYTFT**SYVMH**WVKQKPGQGLEW I**GYIIPYNDNTKYNEKFKG**KATLTSD KSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYC**A** **RRNEYYGSSFFDY**WGQGTTLTVSS
63	VH 8D1 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID Nº 55	**SYVMH**
64	VH 8D1 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID Nº 55	**YIIPYNDNTKYNEKFKG**
65	VH 8D1 CDR-H3	Residuos 97-110 de SEQ ID Nº 55	**ARRNEYYGSSFFDY**
56	**VL 8D1**		DIQMTQSPASLSASLEEIVTITC**QAS** **QDIDNYLA**WYHQKPGKSPRLLIY**G** **ATNLAD**GVPSRFSGSRSGTQFSLK INRLQIEDLGIYYC**LQGYIPPRT**FGG GTKLELKR
66	VL 8D1 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID Nº 56	**QASQDIDNYLA**
67	VL 8D1 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID Nº 56	**GATNLAD**
68	VL 8D1 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID Nº 56	**LQGYIPPRT**

Las secuencias CDR aisladas de los anticuerpos anti-RGM A anteriores constituyen una nueva familia de proteínas de unión a RGM A, y han sido aisladas de acuerdo con esta invención. Para generar y seleccionar las CDR de la invención que

tienen una actividad de unión y/o neutralización de RGM A preferida con relación a hRGM A, pueden usarse métodos convencionales conocidos en la técnica para generar las proteínas de unión de la presente invención y evaluar las características de unión y/o neutralización de RGM A de dichas proteínas de unión, incluyendo, no taxativamente, los métodos que se describen específicamente en la presente documentación.

4.2. Anticuerpos quiméricos anti-RGM A

Un anticuerpo quimérico es una molécula donde las distintas porciones del anticuerpo derivan de animales de distintas especies, tales como los anticuerpos que tienen una región variable que deriva de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Inmunol. Métodos 125:191-202; Patentes de los EEUU Nº 5807715, 4816567 y 4816397, que se incorporan en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad. Además, pueden usarse procedimientos desarrollados para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855; Neuberger et al., 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314:452-454, que se incorporan en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad) que comprenden separar genes de una molécula de anticuerpo de ratón con una especificidad antigénica apropiada y combinarlos con genes de una molécula de anticuerpo humano con una actividad biológica apropiada.

En una realización, los anticuerpos quiméricos de la invención se producen reemplazando la región constante de la cadena pesada de los anticuerpos monoclonales murinos anti-RGM A humana que se describen en la presente documentación por una región constante de IgG1 humana.

4.3. Anticuerpos anti-RGM A con injertos de CDR

Los anticuerpos con injertos de CDR de la invención comprenden secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de un anticuerpo humano, donde se han reemplazado una o más de las regiones CDR de V_H y/o V_L por secuencias CDR de anticuerpos no humanos, tales como, por ejemplo, los anticuerpos murinos de la invención. Una secuencia de la región del marco de cualquier anticuerpo humano puede servir como molde para el injerto de CDR. Sin embargo, el reemplazo directo de cadenas en una de estas regiones de marco comúnmente resulta en una cierta pérdida de afinidad de unión al antígeno. Cuanto más homólogo es un anticuerpo humano al anticuerpo murino original, menor es la probabilidad de que la combinación de las CDR murinas con la región del marco humana introduzca distorsiones en las CDR que puedan reducir la afinidad. Entonces, es preferible que la región variable del marco humano seleccionada para reemplazar la región variable del marco murino, aparte de las CDR, tenga al menos a 65% de identidad de secuencia con la región variable del marco del anticuerpo murino. Es más preferible que las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDR,

tengan al menos 70% de identidad de secuencia. Es aún más preferible que las regiones variables humanas y murinas aparte de las CDR tengan al menos 75% de identidad de secuencia. Es más preferible que las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDR, tengan al menos 80% identidad de secuencia. En la técnica se conocen métodos para producir anticuerpos con injertos de CDR (Jones et al, Nature 321-525 (1986); US Pat. Nro. 5.225.539)

En una realización específica, en la invención se proveen anticuerpos con injertos de CDR con cadenas V_H y/o V_L como los que se describen en la tabla 6.

Tabla 6. Anticuerpos con injertos de CDR

SEQ ID Nº	Región de la proteína	Secuencia
		1234567890123456789012345678 9 0
35	**VH 5F9.1-GL**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA
(15)	(VH3-48/JH3 FR1)	SGFTFS**NYGMN**WVRQAPGKGLEW
(16)	(VH3-48/JH3 FR2)	VS**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR
(17)	(VH3-48/JH3 FR3)	DNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYC
(18)	(VH3-48/JH3 FR4)	AR**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
36	**VH 5F9.2-GL**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA
(15)	(VH3-48/JH4 FR1)	SGFTFS**NYGMN**WVRQAPGKGLEW
(16)	(VH3-48/JH4 FR2)	VS**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR
(17)	(VH3-48/JH4 FR3)	DNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYC
(19)	(VH3-48/JH4 FR4)	AR**GTTPDY**WGQGTLVTVSS
37	**VH 5F9.3-GL**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA
(15)	(VH3-48/JH6 FR1)	SGFTFS**NYGMN**WVRQAPGKGLEW
(16)	(VH3-48/JH6 FR2)	VS**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR
(17)	(VH3-48/JH6 FR3)	DNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYC
(20)	(VH3-48/JH6 FR4)	AR**GTTPDY**WGQGTTVTVSS
38	**VH 5F9.4-GL**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA
(21)	(VH3-33/JH3 FR1)	ASGFTFS**NYGMN**WVRQAPGKGLE
(22)	(VH3-33/JH3 FR2)	WVA**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTI
(23)	(VH3-33/JH3 FR3)	SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY
(18)	(VH3-33/JH3 FR4)	YCAR**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
39	**VH 5F9.5-GL**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA
(21)	(VH3-33/JH4 FR1)	ASGFTFS**NYGMN**WVRQAPGKGLE
(22)	(VH3-33/JH4 FR2)	WVA**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTI
(23)	(VH3-33/JH4 FR3)	SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY
(19)	(VH3-33/JH4 FR4)	YCAR**GTTPDY**WGQGTLVTVSS
40	**VH 5F9.6-GL**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA
(21)	(VH3-33/JH6 FR1)	ASGFTFS**NYGMN**WVRQAPGKGLE
(22)	(VH3-33/JH6 FR2)	WVA**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTI
(23)	(VH3-33/JH6 FR3)	SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY
(20)	(VH3-33/JH6 FR4)	YCAR**GTTPDY**WGQGTTVTVSS

SEQ ID Nº	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789 0
41	**VH 5F9.7-GL**	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA
(24)	(VH3-23/JH3 FR1)	SGFTFS**NYGMN**WVRQAPGKGLEW
(25)	(VH3-23/JH3 FR2)	VS**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR
(26)	(VH3-23/JH3 FR3)	DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
(18)	(VH3-23/JH3 FR4)	AK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
42	**VH 5F9.8-GL**	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA
(24)	(VH3-23/JH4 FR1)	SGFTFS**NYGMN**WVRQAPGKGLEW
(25)	(VH3-23/JH4 FR2)	VS**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR
(26)	(VH3-23/JH4 FR3)	DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
(19)	(VH3-23/JH4 FR4)	AK**GTTPDY**WGQGTLVTVSS
43	**VH 5F9.9-GL**	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA
(24)	(VH3-23/JH6 FR1)	SGFTFS**NYGMN**WVRQAPGKGLEW
(25)	(VH3-23/JH6 FR2)	VS**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR
(26)	(VH3-23/JH6 FR3)	DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
(20)	(VH3-23/JH6 FR4)	AK**GTTPDY**WGQGTTVTVSS
44	**VL 5F9.1-GL**	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC**RS**
(27)	(A18/JK2 FR1)	**SQSLEYSDGYTFLE**WYLQKPGQSP
(28)	(A18/JK2 FR2)	QLLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGSG
(29)	(A18/JK2 FR3)	TDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQATH**
(30)	(A18/JK2 FR4)	**DPLT**FGQGTKLEIKR
45	**VL 5F9.2-GL**	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RS**
(31)	(A17/JK2 FR1)	**SQSLEYSDGYTFLE**WFQQRPGQS
(32)	(A17/JK2 FR2)	PRRLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGS
(33)	(A17/JK2 FR3)	GTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQAT**
(30)	(A17/JK2 FR4)	**HDPLT**FGQGTKLEIKR
46	**VL 5F9.3-GL**	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RS**
(31)	(A17/JK2 FR1)	**SQSLEYSDGYTFLE**WYLQKPGQSP
(28)	(A18/JK2 FR2)	QLLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGSG
(29)	(A18/JK2 FR3)	TDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQATH**
(30)	(A18/JK2 FR4)	**DPLT**FGQGTKLEIKR

Las secuencias CDR derivadas del anticuerpo monoclonal 5F9 se indican en negrita. También se hace referencia a las secuencias de marco específicas (FR1 a FR4) al indicar los identificadores de secuencia correspondientes (véanse también las tablas 3 y 4)

4.4. Anticuerpos humanizados anti-RGM A

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que se unen al antígeno deseado y tienen una o más regiones de determinación de la complementariedad (CDR) de la especie no humana, y regiones de marco de una molécula de inmunoglobulina humana. Las secuencias de Ig humanas conocidas se describen, por ejemplo, en www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/inmunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Inmune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html; www.anticuerporesource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Inmunology.html.www.inmunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehimeu.acjp/.about.yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isacnet.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEPStart.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/linksl.html; www.recab.uni-hd.de/inmuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Webpages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/froducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html; Kabat et al., Sequences of Proteins of Inmunological Interest, Departamento de Salud de los EEUU (1983), cada uno de los cuales se incorpora por completo en la presente documentación a modo de referencia. Estas secuencias importadas pueden usarse para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la afinidad de unión, la velocidad de activación, la velocidad de desactivación, la avidez, la especificidad, la vida media o cualquier otra característica apropiada, como es conocido en la técnica.

Los residuos de la región del marco en las regiones del marco humano pueden reemplazarse por los residuos correspondientes de la CDR del anticuerpo donante para alterar, preferiblemente mejorar la unión al antígeno. Estas sustituciones en el marco se identifican con métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, preparando modelos de las interacciones entre las CDR y los residuos del marco, para identificar los residuos

del marco que son importantes para la unión al antígeno, y realizando comparaciones de secuencia para identificar residuos de marco inusuales en posiciones particulares (véanse, por ejemplo, Queen et al., Patente de los EEUU Nº 5585089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988), que se incorporan en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad). Los modelos tridimensionales de la inmunoglobulina se hallan disponibles y son conocidos por aquellos entrenados en la técnica. Hay programas informáticos disponibles que permiten ilustrar y presentar estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas representaciones permite analizar la participación de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de unión de la inmunoglobulina candidata a su antígeno. De este modo, pueden aislarse y combinarse residuos FR de secuencias consenso e importadas con el fin de obtener una característica deseada en el anticuerpo, tal como la afinidad de unión por uno o más antígenos blanco. En general, los residuos de las CDR tienen una influencia directa y más sustancial sobre la unión al antígeno. Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, tales como, no taxativamente, los que se describen en Jones et al., Nature 321:522 (1986); Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Inmunol. 151: 2296 (1993); Chotia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Inmunol. 151:2623 (1993), Padlan, Molecular Inmunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., PNAS 91:969-973 (1994); publicación PCT WO 91/09967, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592106; EP 519596, EP 239400, Patentes de los EEUU Nº 5565332, 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539, 4816567, cada una de las cuales se incorpora en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad, incluidas las referencias citadas en ellas.

5. Otras realizaciones de anticuerpos de la invención

5.1. Anticuerpos de fusión e inmunoadhesinas

En esta solicitud también se describe la preparación de un anticuerpo de fusión o una inmunoadhesina que comprende la totalidad o una porción de un anticuerpo contra RGM A de esta solicitud unido a otro polipéptido. En algunas realizaciones, solamente se une la región variable del anticuerpo contra RGM A a un polipéptido. En otras realizaciones, se une el dominio VH de un anticuerpo contra RGM A de esta solicitud a un primer polipéptido, mientras que el dominio VL del anticuerpo se une a un segundo polipéptido, el cual se asocia con el primer polipéptido de una manera tal que permite que los dominios VH y VL interactúen uno con otro para formar un sitio de unión a anticuerpos. En otras realizaciones, el dominio VH se separa del dominio VL con un conector que

permite la interacción entre los dominios VH y VL (véase la descripción de los anticuerpos de cadenas simples más adelante). Después, el anticuerpo compuesto por VH-conector-VL se une a un polipéptido de interés. El anticuerpo de fusión es útil para dirigir un polipéptido a una célula o un tejido donde se expresa RGM A. El polipéptido de interés puede ser un agente terapéutico, tal como una toxina, o puede ser un agente de diagnóstico, tal como una enzima que puede ser visualizada con facilidad, tal como la peroxidasa de rábano picante. Además, es posible crear anticuerpos de fusión donde haya dos (o más) anticuerpos de cadena simple unidos. Esto es útil cuando se desea crear un anticuerpo divalente o polivalente en una sola cadena de polipéptido, o si se desea crear un anticuerpo biespecífico.

En una realización, se provee una proteína de unión marcada donde se ha derivatizado o conectado un anticuerpo o una porción de anticuerpo de esta solicitud con otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido u otra proteína). Por ejemplo, una proteína de unión marcada de esta solicitud puede derivatizarse uniendo de manera funcional un anticuerpo o una porción de anticuerpo de esta solicitud (por medio de una unión química, una fusión genética, una asociación no covalente, o a través de otro medio) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como ácidos nucleicos, otros anticuerpos (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o un péptido que pueden mediar en la asociación del anticuerpo o la porción de anticuerpo con otra molécula (tal como la región nuclear de la estreptavidina o una marca de polihistidina).

Los agentes de detección útiles con los cuales puede derivatizarse un anticuerpo o una porción de anticuerpo de esta solicitud incluyen compuestos fluorescentes. Entre los ejemplos de agentes fluorescentes detectables se incluyen la fluoresceína, el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, el cloruro de 5-dimetilamina-1-napfalensulfonilo, la ficoeritrina, y semejantes. Un anticuerpo también puede derivatizarse con enzimas detectables, tales como la fosfatasa alcalina, la peroxidasa de rábano picante, la glucosa oxidasa, y semejantes. Cuando el anticuerpo se derivatiza con una enzima detectable, es detectado mediante el agregado de reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando se encuentra presente la peroxidasa de rábano picante como agente detectable, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina genera un producto de reacción con color, el cual es detectable. Un anticuerpo también puede derivatizarse con un ácido nucleico, biotina y detectarse a través de una medida indirecta de la unión de avidina o estreptavidina.

5.2. Anticuerpos de cadena simple

En esta solicitud se incluye un anticuerpo de cadena simple (scFv) que se une a una RGM A inmunogénica de la invención. Para producir el scFv, se une operativamente el ADN que codifica VH y VL a un ADN que codifica un conector flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser), de modo tal que las secuencias VH y VL pueden expresarse como una proteína de una sola cadena contigua, con las regiones VL

y VH unidas por un conector flexible (véanse, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-42 6; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; McCafferty et al., 30 Nature (1990) 34 8: 552- 554). El anticuerpo de cadena simple puede ser monovalente si se usa una sola VH y una sola VL, bivalente si se usan dos VH y dos VL, o polivalente, si se usan más VH y VL. A dos de los fragmentos scFv mencionados unidos por un conector se les da el nombre de "diacuerpo", y se trata de una forma que también está abarcada por la invención.

5.3. Anticuerpos biespecíficos

Adicionalmente, en esta solicitud se incluye un anticuerpo biespecífico, o un fragmento de unión a antígeno de éste, donde una especificidad es por un polipéptido inmunogénico de RGM A de esta solicitud. Por ejemplo, es posible generar un anticuerpo biespecífico que se una específicamente a un polipéptido inmunogénico de RGM A de la invención a través de un dominio de unión, y a una segunda molécula a través de un segundo dominio de unión. Además, es posible generar un anticuerpo de cadena simple que contiene más de una VH y una VL que se una específicamente a un polipéptido inmunogénico de la invención y a otra molécula que esté asociada con la atenuación del colapso del cono de crecimiento mediado por la mielina y la inhibición del desarrollo y la brotación de las neuritas. Estos anticuerpos biespecíficos pueden generarse usando procedimientos que son bien conocidos, por ejemplo, Fanger et al. Inmunol Methods 4: 72-81 (1994) y Wright y Harris, 20 (supra).

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

5.4. Anticuerpos derivatizados y marcados

Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de esta solicitud pueden derivatizarse o conectarse con otra molécula (por ejemplo, otro péptido u otra proteína). En general, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno se derivatizan de modo tal que la unión a un polipéptido inmunogénico de la invención no se ve afectada de manera adversa por la derivatización o la marca.

Por ejemplo, un anticuerpo o una porción de anticuerpo de esta solicitud pueden unirse funcionalmente (por medio de una unión química, una fusión genética, una asociación no covalente, o a través de otro medio) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un reactivo de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o un péptido que pueden mediar en la asociación del anticuerpo o la porción de anticuerpo con otra molécula (tal como la región nuclear de la estreptavidina o una marca de polihistidina). Adicionalmente, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de éste, puede ser parte de moléculas de inmunoadhesión más grandes, formadas mediante la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o la porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos diferentes. Los ejemplos de estas moléculas de

inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de la estreptavidina para preparar una molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov, *et al.* (1995) *Human Antibodies y Hibridomas* 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una marca de polihistidina C-terminal para preparar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, *et al.* (1994) Molecular Inmunology 31:1047-1058). Las porciones de los anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y $F(ab')_2$, pueden prepararse a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Más aún, los anticuerpos, las porciones de anticuerpos y las moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse usando técnicas de ADN recombinante.

Un anticuerpo derivatizado puede producirse combinando dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Los agentes de combinación apropiados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos con reactividades diferentes separados por un separador apropiado (por ejemplo el éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida), o aquellos que son homobifuncionales (por ejemplo, el suberato de disuccinimidilo). Estos conectores están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.

Un anticuerpo derivatizado también puede ser un anticuerpo marcado. Por ejemplo, los agentes de detección con los cuales puede derivatizarse un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención incluyen compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamin-1-naftalensulfonilo, ficoeritrina, lantánidos fosforados, y semejantes. Un anticuerpo también puede marcarse con enzimas que son útiles para detectarlo, tales como la peroxidasa de rábano picante, la galactosidasa, la luciferasa, la fosfatasa alcalina, la glucosa oxidasa, y semejantes. En aquellas realizaciones donde la marca es una enzima detectable, el anticuerpo se detecta agregando reactivos adicionales que son usados por la enzima para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante con peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina. Un anticuerpo también puede marcarse con biotina y detectarse mediante la medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina. Un anticuerpo también puede marcarse con un epitope polipeptídico predeterminado que será reconocido por una marca secundaria (por ejemplo, secuencias de pares de cierres de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios que se unen a metales, marcas de epitopes). Un anticuerpo contra RGM A o un fragmento de unión a antígeno de éste también pueden marcarse con un aminoácido radiomarcado. La radiomarca puede usarse para fines de diagnóstico y terapéuticos. El anticuerpo contra RGM A radiomarcado puede usarse con fines de diagnóstico, por ejemplo, para determinar los niveles del receptor de RGM A en un sujeto. Además, el anticuerpo contra RGM A radiomarcado puede usarse con fines terapéuticos, para tratar lesiones en la médula espinal.

Los ejemplos de marcas para polipéptidos incluyen, no taxativamente, los siguientes radioisótopos o radionucleidos ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, ^{153}Sm. Un anticuerpo contra RGM A o un fragmento de unión a antígeno de éste también pueden derivatizarse con un grupo químico, tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo de hidrato de carbono. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para incrementar la vida media en suero o incrementar la unión en el tejido. También, una marca para polipéptidos puede incluir un ácido nucleico, por ejemplo, ADN, para la detección por PCR o con el fin de potenciar la expresión genética, o ARNpi, para suprimir la expresión genética en las células o los tejidos que presentan RGM A.

La clase y la subclase de los anticuerpos contra RGM A pueden determinarse con cualquier método conocido en la técnica. En general, la clase y la subclase de un anticuerpo pueden determinarse usando anticuerpos que son específicos para una clase y una subclase de anticuerpos particulares. Estos anticuerpos están disponibles comercialmente. La clase y la subclase pueden determinarse por ELISA, Western Blot, y también con otras técnicas. Como alternativa, la clase y la subclase pueden determinarse secuenciando la totalidad o una porción de las cadenas pesada y/o liviana de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de diversas clases y subclases de inmunoglobulinas conocidas, y determinando la clase y la subclase de los anticuerpos.

5.5. Inmunoglobulinas con dos dominios variables

Las proteínas o las inmunoglobulinas de unión de dominio variable doble (DVD), tal como se las usa en la presente documentación, son proteínas de unión que comprenden dos o más sitios de unión a antígeno, y son proteínas de unión multivalentes, por ejemplo, divalentes y tetravalentes. En esta memoria descriptiva se usa el término "proteína de unión multivalente" para hacer referencia a una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión a antígeno. La proteína de unión multivalente preferiblemente se diseña para que tenga dos o más sitios de unión a antígeno, y generalmente no es un anticuerpo de origen natural. El término "proteína de unión multiespecífica" hace referencia a una proteína de unión con la capacidad de unir dos o más blancos relacionados o no relacionados. Dichos DVD pueden ser monoespecíficos, es decir, con la capacidad de unir un antígeno, o multiespecíficos, es decir, con la capacidad de unir dos o más antígenos. Las proteínas de unión DVD que comprenden dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos DVD de cadena liviana se conocen como una Ig DVD. Cada mitad de una Ig DVD comprende un polipéptido DVD de cadena pesada, y un polipéptido DVD de cadena liviana, y dos sitios de unión a antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena liviana, con la participación de un total de 6 CDR en la unión a antígeno por sitio de unión a antígeno. Las proteínas de unión DVD, y los métodos para preparar las proteínas de unión DVD, se describen en la Solicitud de Patente de los EEUU

Nº 11/507050, que se incorpora en la presente documentación a modo de referencia. En la presente invención se incluye una proteína de unión DVD que comprende proteínas de unión capaces de unirse a RGM A. Preferiblemente la proteína de unión DVD es capaz de unirse a RGM A y un segundo blanco. El segundo blanco se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos monoclonales con actividades antiinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12,IL-17, IL-18, IL-23, TNF alfa/beta, IFN-beta, gamma, LIF, OSM, CNTF, PF-4, proteína básica de las plaquetas (PBP), NAP-2, beta-TG, MIP-1, MCP2/3, RANTES, linfotactina), proteínas que median en el transporte (receptor de insulina, receptor de transferrina, receptor de trombina, receptor de leptina, receptor de LDL), otros anticuerpos monoclonales indicadores de neurorregeneración (NgR, Lingo, p75), CSPG (por ejemplo, NG-2, neurocán, brevicán, versicán, agrecán, ácido hialurónico, mAG, tenascina, NI-35, NI-250, IMP, perlecán, neurocán, fosfacán, nogo-A, OMGP, Sema4D, Sema 3A, efrina B3, efrina A2, efrina A5, MAG, EphA4, plexina B1, TROY, wnts, ryk rec., BMP-2, BMP-4, BMP-7), anticuerpos monoclonales con actividades de neuroprotección (EGF, EGFR, Sema 3), anticuerpos monoclonales anti-beta amiloides (por ejemplo, m266, 3D6 (bapineuzumab), anticuerpos monoclonales anti-globulómero 7C6), receptores y transportadores localizados en el SNC (receptores de serotonina, receptores de dopamina, DAT, Asc-1, GlyT1).

5.6. Anticuerpos con especificidad doble

En esta solicitud también se describe la tecnología de los "anticuerpos con especificidad doble". Los anticuerpos con especificidad doble pueden servir como agonistas, antagonistas, o ambos en distintas combinaciones. Los anticuerpos con especifidad doble son anticuerpos donde la cadena VH se une a un primer antígeno y la cadena VL se une a otro antígeno, como se describe, por ejemplo, en WO 2008082651.

5.7. Anticuerpos cristalizados

En otra realización de esta solicitud, se provee una proteína de unión cristalizada. El término "cristalizado", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un anticuerpo o una porción de unión a antígeno de éste que existe en forma de un cristal. Los cristales son una forma de materia en estado sólido que es diferente de otras formas, tales como el estado sólido amorfo o el estado líquido cristalino. Los cristales están compuestos por disposiciones de átomos, iones o moléculas tridimensionales, repetitivas y regulares (por ejemplo, proteínas, tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (por ejemplo, complejos de antígenos/anticuerpos). Estas disposiciones tridimensionales siguen relaciones matemáticas bien comprendidas en el campo. La unidad fundamental, o bloque de construcción, que se repite en un cristal, se denomina unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que satisface una simetría cristalográfica dada y bien definida provee la "célula individual" del cristal. La repetición de la célula individual por repeticiones regulares en las tres dimensiones provee el cristal. Véanse Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a

Practical Approach, 2ª edición, pp. 20 1-16, Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, (1999).

Preferiblemente, en esta solicitud se describen cristales de anticuerpos contra RGM completos y fragmentos de éstos, como se detalla en la presente documentación, y formulaciones y composiciones que comprenden dichos cristales. En una realización, las proteínas de unión cristalizadas tienen una vida media *in vivo* más larga que la contraparte soluble de la proteína de unión. En otra realización, la proteína de unión conserva su actividad biológica después de la cristalización.

Las proteínas de unión cristalizadas de la invención pueden producirse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y descriptos en WO 02072636, incorporada en la presente documentación a modo de referencia.

5.8. Anticuerpos glicosilados

En realización de la invención, se provee una proteína de unión glicosilada, donde el anticuerpo o la porción de unión a antígeno de éste comprenden uno o más residuos de hidrato de carbono. La producción nativa de proteínas *in vivo* puede incluir un procesamiento adicional, conocido como modificación postraduccional. En particular, pueden agregarse residuos de azúcares (glicosilo) en forma enzimática, un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes, que contienen cadenas laterales de oligosacáridos unidas en forma covalente, son conocidas como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. Los anticuerpos son glicoproteínas con uno o más residuos de hidrato de carbono en el dominio Fc, así como en el dominio variable. Los residuos de hidrato de carbono en el dominio Fc tienen un efecto importante en la función efectora del dominio Fc, con un efecto menor en la unión a antígeno o la vida media del anticuerpo (R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* **21** (2005), páginas 11-16). Por el contrario, la glicosilación del dominio variable puede tener efecto sobre la actividad de unión a antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo sobre la afinidad de unión del anticuerpo, probablemente debido a impedimento estérico (Co, M.S., *et al.*, *Mol. Inmunol.* (1993) 30:13611367), o puede dar como resultado una afinidad aumentada por el antígeno (Wallick, S.C., *et al.*, *Exp. Med.* (1988) 168:1099-1109; Wright, A., *et al.*, *EMBO J.* (1991) 10:2717 2723).

Un aspecto de la presente invención se relaciona con la generación de mutantes de sitios de glicosilación en las cuales se ha mutado el sitio de glicosilación unido a O o N de la proteína de unión. Aquél entrenado en la técnica puede generar dichos mutantes con el uso de tecnologías convencionales bien conocidas. Los mutantes de sitios de glicosilación que retienen la actividad biológica, pero presentan una actividad de unión incrementada o disminuida, son otro objeto de la presente invención.

En aún otra realización, se modifica la glicosilación del anticuerpo o porción de unión a antígeno de la invención. Por ejemplo, es posible generar un anticuerpo no glicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse, por ejemplo, para incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dichas

modificaciones del hidrato de carbono pueden obtenerse, por ejemplo, mediante la alteración de uno o más sitios de glicosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden realizarse una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación en la región variable, para eliminar de este modo la glicosilación en ese sitio. Dicha aglicosilación puede incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Este abordaje se describe con mayor detalle en la publicación PCT WO2003016466A2 y las Patentes de los EEUU Nº 5714350 y 6350861, cada una de las cuales se incorpora en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad.

Adicionalmente o como alternativa, puede prepararse un anticuerpo modificado de la invención que tenga un tipo de glicosilación alterada, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de residuos fucosilo o un anticuerpo que tenga incrementadas las estructuras de GlcNAc bifurcadas. Se ha demostrado que dichos patrones de glicosilación alterados incrementan la capacidad de los anticuerpos de producir ADCC. Dichas modificaciones de los hidratos de carbono pueden efectuarse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con la maquinaria de glicosilación alterada. En la técnica se han descripto células con la maquinaria de glicosilación alterada, que pueden ser usadas como células huésped para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención, y de este modo, producir un anticuerpo con glicosilación alterada. Véanse, por ejemplo, Shields, R. L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740; Umana *et al.* (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, y también la Patente Europea Nº EP 1176195, las publicaciones PCT WO 03/035835 y WO 99/54342 80, cada una de las cuales se incorpora en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad.

La glicosilación de proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como de la célula huésped en la cual se expresa la proteína. Distintos organismos pueden producir enzimas de glicosilación diferentes (por ejemplo, glicosiltransferasas y glicosidasas), y pueden tener diferentes sustratos (azúcares nucleotídicos) disponibles. Debido a dichos factores, el patrón de glicosilación, y la composición de residuos glicosídicos, pueden diferir dependiendo del sistema huésped en el cual se expresa la proteína en particular. Entre los residuos glicosídicos útiles en la invención pueden incluirse, no taxativamente, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido síalico. Preferiblemente, la proteína de unión glicosilada comprende residuos glicosídicos que permiten obtener un patrón de glicosilación humano.

Aquellos entrenados en la técnica saben que el cambio en las glicosilaciones de proteínas puede dar como resultado diferentes características en la proteína. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida por un microorganismo huésped, tal como una levadura, y glicosilada usando la vía endógena de la levadura, puede ser reducida en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como una línea celular CHO. Dichas glicoproteínas también pueden ser

inmunogénicas en seres humanos y presentar una vida media reducida *in vivo* después de la administración. Receptores específicos en humanos y otros animales pueden reconocer residuos glicosídicos específicos y promover la rápida eliminación de la proteína del torrente sanguíneo. Entre otros efectos adversos pueden incluirse cambios en el plegamiento de las proteínas, su solubilidad, su susceptibilidad a proteasas, su circulación, su transporte, su compartimentalización, su secreción, el reconocimiento por otras proteínas o factores, su antigenicidad, o su alergenicidad. En consecuencia, un profesional puede preferir una proteína terapéutica con una composición y un patrón de glicosilación específicos, por ejemplo, una composición de glicosilación y un patrón idénticos, o al menos similares, a los producidos en las células humanas o las células con especificidad de especie del animal sujeto previsto.

La expresión de proteínas glicosiladas diferentes de las de una célula huésped puede llevarse a cabo mediante la modificación genética de la célula huésped para expresar enzimas de glicosilación heterólogas. Usando procedimientos conocidos en la técnica, un profesional puede generar anticuerpos o porciones de unión a antígenos de éstos que presenten la glicosilación de las proteínas humanas. Por ejemplo, se han modificado cepas de levadura para expresar enzimas de glicosilación de origen no natural, tales como las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levaduras que presentan una glicosilación proteica idéntica a aquella de las células animales, especialmente las células humanas (Solicitud de Patente de los EEUU 20040018590 y 20020137134, y Solicitud PCT WO 05/100584 A2).

Además, aquellos entrenados en la técnica han de apreciar que es posible expresar una proteína de interés usando una biblioteca de células huésped modificadas para que en ellas se expresen diversas enzimas de glicosilación, de modo que las células huésped que conforman la biblioteca produzcan la proteína de interés con patrones de glicosilación alternativos. Posteriormente, aquellos entrenados en la técnica han de poder seleccionar y aislar la proteína de interés con los patrones de glicosilación novedosos mencionados. Preferiblemente, la proteína seleccionada que tiene un patrón de glicosilación novedoso presenta propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

5.9. Anticuerpos anti-idiotípicos

Además de las proteínas de unión, la presente invención también está relacionada con un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) específico para las proteínas de unión de la invención. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con la región de unión a antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id puede prepararse mediante la inmunización de un animal con la proteína de unión o con una región que contenga su CDR. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante, y producirá un anticuerpo anti-Id. El anticuerpo anti-Id también puede ser usado como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en aún otro animal, con lo que se produce lo que se conoce como anticuerpo anti-anti-Id.

6. Usos de los anticuerpos

En virtud de su capacidad de unirse a RGM A humana, los anticuerpos neutralizadores de esta solicitud, o porciones de éstos, pueden usarse para detectar RGM A humana (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero o plasma) usando un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica en tejido. En esta solicitud se provee un método para detectar RGM A humana en una muestra biológica, que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención, y detectar el anticuerpo (o la porción de anticuerpo) unido a la RGM A humana, o el anticuerpo (o la porción de anticuerpo) no unido, para detectar de este modo la RGM A humana en la muestra biológica. El anticuerpo se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Entre las sustancias detectables apropiadas se incluyen distintas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. Entre los ejemplos apropiados de enzimas, se incluye la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la beta-galactosidasa o la acetilcolinesterasa; entre los ejemplos de grupos prostéticos complejos apropiados, se incluye la estreptavidina/biotina y la avidina/biotina; entre los ejemplos de materiales fluorescentes apropiados, se incluye la umbeliferona, la fluoresceína, el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la diclorotriazinilamino fluoresceína, el cloruro de dansilo o la ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y entre los ejemplos de materiales radioactivos apropiados, se incluyen ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, ^{153}Sm.

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de esta solicitud preferiblemente son capaces de neutralizar la actividad de la RGM A humana tanto *in vitro* como *in vivo*. Por consiguiente, estos anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención pueden usarse para inhibir la unión de RGM A a su receptor, la neogenina, o a BMP-2 y/o BM-4, con lo que es posible inhibir a actividad resultante.

En otra realización, en esta solicitud se provee un método para reducir la actividad de RMG A en un sujeto, ventajosamente un sujeto afectado por una enfermedad o un trastorno donde la actividad resultante de RGM A es perjudicial. En esta solicitud se proveen métodos para reducir la actividad de RGM A en un sujeto afectado por dicha enfermedad o trastorno al prevenir la unión de RGM A a la neogenina, y/o a BMP-2 y/o BMP-4, que comprenden el uso de los anticuerpos monoclonales de esta solicitud. Los anticuerpos de esta solicitud, particularmente los anticuerpos humanizados que se describen en la presente documentación, pueden administrársele a un sujeto humano para propósitos terapéuticos. Más aún, los anticuerpos de esta solicitud pueden administrársele a un mamífero no humano en el que se expresa una RGM A con la cual puede unirse el anticuerpo, para propósitos veterinarios o como un modelo animal de una enfermedad humana. Con relación a esto último, dichos modelos animales pueden ser

útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, evaluando las dosificaciones y la progresión de la administración en el tiempo).

Como se lo usa en la presente documentación, el término "un trastorno donde la actividad de RGM A es perjudicial" incluye enfermedades y otros trastornos de los que se ha demostrado que la presencia de RGM A o su actividad resultante en un sujeto afectado por el trastorno es responsable de la patofisiología del trastorno, o es un factor que contribuye al empeoramiento del trastorno, o bien se sospecha lo anterior. Por ende, un trastorno donde la actividad de RGM A es perjudicial es un trastorno donde se espera que la reducción de la actividad de RGM A alivie los síntomas y/o el progreso del trastorno. Entre los ejemplos no limitativos de trastornos que pueden tratarse con los anticuerpos de la invención, se incluyen aquellos trastornos indicados en la sección anterior, relacionada con composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención.

Se reconoce que RGM A tiene una participación importante en la patología asociada con una variedad de enfermedades que comprenden enfermedades neurológicas asociadas con la neurodegeneración o la inhibición procesos neurorregenerativos, lo cual da como resultado parálisis. Estas enfermedades incluyen la demencia, la demencia senil, la alteración cognitiva leve, la demencia relacionada con la enfermedad de Alzheimer, la corea de Huntington, la disquinesia tardía, la hiperquinesia, la manía, el morbo de Parkinson, el síndrome de Steel-Richard, el síndrome de Down, la miastenia grave, el traumatismo nervioso, la amiloidosis vascular, la hemorragia cerebral con amiloidosis, la inflamación cerebral, el trastorno de confusión aguda, la esclerosis lateral amiotrófica, el glaucoma, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la lesión del plexo braquial, la lesión cerebral, incluyendo la lesión cerebral traumática, la parálisis cerebral, el síndrome de Guillain Barre, la leucodistrofia, la esclerosis múltiple, el síndrome posterior a la poliomielitis, la espina bífida, las lesiones en la médula espinal, la atrofia muscular espinal, los tumores espinales, el accidente cerebrovascular y la mielitis transversal.

También, como se mencionó con anterioridad, pueden usarse inmunoglobulinas DVD o anticuerpos con especificidad doble seleccionados entre cualquiera de los miembros descriptos con anterioridad. Las preparaciones de anticuerpos descriptas con anterioridad pueden ser útiles para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, las lesiones en la médula espinal, la lesión cerebral traumática, la esclerosis múltiple, la lesión nerviosa periférica, la esquizofrenia, la depresión, la ansiedad, y también las enfermedades citadas con anterioridad, relacionadas con la plasticidad y el crecimiento de las neuritas, y la neurotoxicidad.

Los anticuerpos de esta solicitud también pueden combinarse con péptidos que permiten la transferencia trans-membrana para incluir el direccionamiento hacia proteínas blanco intracelulares. Estas secuencias de péptidos pueden incluir, no taxativamente, tat, antenapedia, poli-argininas, algunos péptidos antimicrobianos. Estos péptidos pueden permitir la transferencia a través de las membranas, incluyendo las membranas

plasmáticas celulares, y también las membranas epiteliales y endoteliales, incluyendo la barrera hematoencefálica, la mucosa gástrica, las meninges, y otras.

Un anticuerpo o una porción de anticuerpo de esta solicitud también puede administrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son moléculas pequeñas útiles para el tratamiento de trastornos donde hay actividad de RGM A, como se describió en los párrafos precedentes. Ha de comprenderse que los anticuerpos de esta solicitud o sus porciones de unión a antígeno pueden usarse solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, donde dicho agente adicional es seleccionado por aquellos entrenados en la técnica en función del propósito deseado. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica como útil para tratar la enfermedad o condición que se está tratando con el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que confiere un atributo benéfico a la composición terapéutica por ejemplo, un agente que afecta la viscosidad de la composición.

7. Composiciones farmacéuticas

En la invención también se proveen composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o una porción de unión de éste al antígeno de la invención, y un vehículo aceptable para el uso farmacéutico. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de la invención son para usar, no taxativamente, en el diagnóstico, la detección o el monitoreo de un trastorno, en la prevención, el tratamiento, el manejo o el alivio de un trastorno, o uno o más de sus síntomas, y/o en la investigación. En una realización específica, una composición comprende uno o más anticuerpos de la invención de la invención. En otra realización, la composición farmacéutica comprende uno o más anticuerpos de la invención, y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos de los anticuerpos de la invención, para tratar un trastorno donde la actividad de RGM A es perjudicial. Preferiblemente, los agentes profilácticos o terapéuticos conocidos como útiles para, o aquellos que han sido o que estén siendo usados en la prevención, el tratamiento, el manejo o el alivio de un trastorno o uno o más de sus síntomas. De acuerdo con estas realizaciones, la composición además puede comprender un transportador, diluyente o excipiente.

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpo de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas apropiadas para la administración a un sujeto. En general, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención, y un vehículo aceptable para el uso farmacéutico. Tal como lo se usa en la presente documentación, un "vehículo aceptable para el uso farmacéutico" incluye cualquiera de los solventes, los medios de dispersión, los recubrimientos, los agentes antibacterianos y antifúngicos, los agentes isotónicos y los agentes que demoran de absorción, y semejantes, que sean compatibles con el uso fisiológico. Entre los ejemplos de vehículos aceptables para el uso farmacéutico se incluyen uno o más de los siguientes: agua, solución salina, solución salina amortiguada con fosfato, dextrosa,

glicerol, etanol y semejantes, así como combinaciones de éstos. En muchos casos, en la composición será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. Además, los vehículos aceptables para el uso farmacéutico pueden comprender pequeñas cantidades de sustancias auxiliares, tales como agentes de humectación o emulsionantes, preservantes o soluciones amortiguadoras, que mejoran la vida útil o la eficacia de un anticuerpo o la porción de anticuerpo.

Se conocen distintos sistemas de liberación que pueden usarse para administrar uno o más anticuerpos de la invención, o la combinación de uno o más anticuerpos de la invención, y un agente profiláctico o un agente terapéutico útil para prevenir, manejar, tratar o aliviar un trastorno, o uno o más de sus síntomas, por ejemplo, la encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, las células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, la endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo, Wu y Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)), la construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral o de otro tipo, etcétera. Entre los métodos de administración de un agente profiláctico o terapéutico de la invención se incluyen, no taxativamente, la administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), la administración epidural, la administración intratumoral, y la administración a través de la mucosa (por ejemplo, por la ruta intranasal y oral). Además, puede emplearse la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o un nebulizador, y la formulación con un agente para una aplicación en aerosol. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EEUU Nº 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 y 4880078; y las Publicaciones PCT Nº WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad en la presente documentación a modo de referencia. En una realización, se administra un anticuerpo de la invención, una terapia combinada o una composición de la invención usando la tecnología de liberación pulmonar de drogas Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.). En una realización específica, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención se administran en forma intramuscular, intravenosa, intratumoral, oral, intranasal, pulmonar o subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse por cualquier ruta apropiada, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través del revestimiento epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, rectal y mucosa intestinal, etc.), y pueden administrarse en combinación con otros agentes con actividad biológica. La administración puede ser sistémica o local.

En una realización específica, puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención en forma local en el área que sea necesario tratar. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo y no taxativamente, por infusión local, por inyección, o por medio de un implante, donde dicho implante está compuesto por un material poroso o no poroso que incluye membranas o matrices, tales como membranas

de silastic, polímeros, matrices fibrosas (por ejemplo, Tisseel), o matrices de colágeno. En una realización, se administra una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos antagonistas de la invención en forma local en el área afectada de un sujeto, para prevenir, tratar, manejar y/o aliviar un trastorno o un síntoma de éste. En otra realización, se administra una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de la invención en forma local en el área afectada, en combinación con una cantidad eficaz de una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) diferentes de un anticuerpo de la invención a un sujeto, para prevenir, tratar, manejar y/o aliviar un trastorno o uno o más de sus síntomas.

En otra realización, el agente profiláctico o terapéutico puede liberarse en un sistema de liberación controlada o liberación sostenida. En una realización, puede usarse una bomba para obtener la liberación controlada o sostenida (véanse Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88:507; Saudek *et al.*, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos para efectuar la liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (véanse, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (editores), CRC Pres., Boca Raton, FL (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (editores), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; véanse también Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 7 1:105); la Patente de los EEUU Nº 5679377; la Patente de los EEUU Nº 5916597; la Patente de los EEUU Nº 5912015; la Patente de los EEUU Nº 5989463; la Patente de los EEUU Nº 5128326; la Publicación PCT Nº WO 99/15154; y la Publicación PCT Nº WO 99/20253. Entre los ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación sostenida, se incluyen, no taxativamente, poli(2-hidroxietilmetacrilato), poli(metilmetacrilato), poli(ácido acrílico), poli(etilen-co-vinilacetato), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), polilácticos (PLA), poli(láctido-co-glicólidos) (PLGA), y poliortoésteres. En una realización preferida, el polímero usado en una formulación de liberación es inerte, está libre de impurezas lixiviables, es estable en almacenamiento, estéril y biodegradable. En aún otra realización, puede colocarse un sistema de liberación controlada o sostenida en la proximidad de un blanco profiláctico o terapéutico, de modo que se requiera solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, citado con anterioridad, volumen 2, páginas 115-138 (1984)).

Los sistemas de liberación controlada se describen en la revisión de Langer (1990, *Science* 249:1527-1533). Es posible usar cualquier procedimiento conocido por aquellos entrenados en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprendan uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véanse, por ejemplo, la Patente de los EEUU Nº 4526938, la Publicación PCT WO 91/05548, la Publicación PCT

WO 96/20698, Ning *et al.*, 1996, "Intratumoral Radioinmunotheraphy 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 Polimeric 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, las cuales se incorporan en su totalidad en la presente documentación a modo de referencia.

En una realización específica, cuando la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión del agente profiláctico o terapéutico que codifica si se lo construye como parte de un vector de expresión de ácidos nucleicos apropiado y se lo administra de modo de que se torne intracelular, por ejemplo, con el uso de un vector retroviral (véase la Patente de los EEUU Nº 4980286), por inyección directa, usando un bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont) o un recubrimiento con lípidos o receptores superficiales celulares o agentes de transfección, o administrándolo en combinación con un péptido semejante a homeobox del que se sepa que ingresa al núcleo (véase, por ejemplo, Joliot *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868). Como alternativa, un ácido nucleico puede introducirse en forma intracelular e incorporarlo en el ADN de la célula huésped para la expresión por recombinación homóloga.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con la ruta de administración que se pretenda de él. Entre los ejemplos de rutas de administración, se incluyen, no taxativamente, la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (por ejemplo, por inhalación), transdérmica (por ejemplo, tópica), transmucosal, y rectal. En una realización específica, la composición se formula de acuerdo con los procedimientos de rutina, como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal o tópica a sujetos humanos. En general, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en soluciones acuosas isotónicas estériles. Cuando resulta necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lignocamne, para calmar el dolor en el sitio de la inyección.

Si las composiciones de la invención son para administrar en forma tópica, las formulaciones pueden formularse en forma de una pomada, una crema, un parche trasndérmico, una loción, un gel, un champú, un atomizado, un aerosol, una solución, una emulsión, u otra forma bien conocida por aquellos entrenados en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, e Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19ª edición, Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para las formas de dosificación

tópica no atomizables, generalmente se emplean formas entre viscosas y semisólidas o sólidas, que comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica, y que tienen una viscosidad dinámica preferiblemente mayor que el agua. Entre las formulaciones apropiadas se incluyen, no taxativamente, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, bálsamo, y semejantes, que son, se desea, esterilizados o mezclados con agentes auxiliares por ejemplo, preservantes, estabilizadores, agentes de humectación, amortiguadores o sales) para afectar distintas propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Entre otras formas de dosificación tópica apropiadas, se incluyen las preparaciones en aerosol atomizables, donde el principio activo, preferiblemente en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un compuesto volátil presurizado (por ejemplo, un propelente gaseoso, tal como freón) o en una botella comprimida. Si se lo desea, también pueden agregarse hidratantes o humectantes a las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación. Los ejemplos de dichos ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

Si el método de la invención comprende la administración intranasal de una composición, la composición puede formularse en una forma en aerosol, atomizado, vapor, o en forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para usar de acuerdo con la presente invención pueden liberarse convenientemente en forma de una presentación de atomizador de aerosol en un envase presurizado o un nebulizador, con el uso de un propelente apropiado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas apropiado). En el caso de aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse incluyendo una válvula para proporcionar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos (compuestos, por ejemplo, por gelatina) pueden formularse para usar en un inhalador o un insuflador que contenga una mezcla del polvo del compuesto con una base de polvo apropiada, tal como lactosa o almidón.

Si el método de la invención comprende la administración oral, las composiciones pueden formularse por vía oral en forma de tabletas, cápsulas, sellos, cápsulas de gelatina, soluciones, suspensiones, y semejantes. Las tabletas o las cápsulas pueden prepararse por medios convencionales, con agentes excipientes aceptables para el uso farmacéutico, tales como agentes unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato ácido de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de papa o glicolato sódico de almidón); o agentes de humectación (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Las tabletas pueden recubrirse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma de soluciones, jarabes o suspensiones, no taxativamente, o pueden presentarse como un producto seco para la reconstitución con agua u otro vehículo apropiado antes de usarlas. Dichas

preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales, con aditivos aceptables para el uso farmacéutico, 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 preservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales amortiguadoras, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes, según sea apropiado. Las preparaciones para la administración oral pueden formularse en una forma apropiada para la liberación lenta, la liberación controlada o la liberación sostenida de uno o varios agentes profilácticos o terapéuticos.

El método de la invención puede comprender la administración pulmonar, por ejemplo, con el uso de un inhalador o un nebulizador, de una composición formulada con un agente para la aplicación en aerosol. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EEUU Nº 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 y 4880078; y las Publicaciones PCT Nº WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903, las cuales se incorporan en su totalidad en la presente documentación a modo de referencia. En un realización específica, se administra un anticuerpo de la invención, una terapia combinada y/o una composición de la invención usando la tecnología de liberación de drogas pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

El método de la invención puede comprender la administración de una composición formulada para la administración parenteral por inyección (por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificaciones individuales (por ejemplo, en ampollas o envases para dosis múltiples) con la adición de un preservante. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o dispersantes. Como alternativa, el principio activo puede tomar la forma de un polvo para reconstituir con un vehículo apropiado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de usarlo. Además, los métodos de la invención pueden comprender la administración de composiciones formuladas como preparaciones de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, en forma subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. De este modo, por ejemplo, las composiciones pueden formularse con materiales poliméricos o hidrofóbicos apropiados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles (por ejemplo, como una sal moderadamente soluble).

Los métodos de la invención abarcan la administración de composiciones formuladas como formas neutras o salinas. Entre las sales aceptables para el uso farmacéutico se incluyen aquellas formadas con aniones, tales como aquellos derivados de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etcétera, y aquellos formados con

cationes, tales como aquellos derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etcétera.

Por lo general, los ingredientes de las composiciones se proveen en forma separada o mezclados en una unidad de forma de dosificación, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o un saché donde se indica la cantidad de agente activo. En los casos en que el modo de administración sea la infusión, la composición podrá administrarse con una botella de infusión que contenga agua o solución salina estéril de grado farmacéutico. En los casos en que el modo de administración sea por inyección, podrá proveerse una ampolla de agua o solución salina estéril para la inyección, de modo que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

En particular, en la invención también se provee uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención envasadas en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o saché donde se indica la cantidad del agente. En una realización, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención, se proveen como un polvo liofilizado estéril seco o concentrado, libre de agua, en un recipiente sellado herméticamente que puede reconstituirse (por ejemplo, con agua o solución salina) para obtener la concentración apropiada para administrarlo a un sujeto. Con preferencia, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención, se proveen como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente sellado herméticamente, con una dosificación individual de al menos 5 mg, más preferiblemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg, o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizados o las composiciones farmacéuticas de la invención deben almacenarse a una temperatura de entre 2°C y 8°C en su recipiente original, y los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención deben administrarse una semana, con preferencia 5 días, 72 horas, 48 horas, 24 horas, 12 horas, 6 horas, 5 horas, 3 horas o una hora después de reconstituirse. En una realización alternativa, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención, se proveen en forma líquida en un recipiente sellado herméticamente en el que se indica la cantidad y la concentración del agente. Con preferencia, la forma líquida de la composición que se administra se provee en un recipiente sellado herméticamente que contiene al menos 0,25 mg/ml, más preferiblemente al menos 0,5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml. La forma líquida debe almacenarse a una temperatura de entre 2°C y 8°C en su recipiente original.

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la invención pueden incorporarse en de una composición farmacéutica apropiada para la administración

parenteral. Con preferencia, el anticuerpo o las porciones de anticuerpo se prepararán como una solución inyectable con entre 0,1 y 250 mg/ml de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta por una forma de dosificación líquida o liofilizada en un recipiente, una ampolla o una jeringa de color sílex o ámbar llenada con antelación. La solución amortiguadora puede ser L-histidina (entre 1 y 50 mM), óptimamente entre 5 y 10 mM, a pH entre 5,0 y 7,0 (óptimamente a pH 6,0). Entre otras soluciones amortiguadoras apropiadas, se incluyen, no taxativamente, el succinato de sodio, el citrato de sodio, el fosfato de sodio o el fosfato de potasio. Puede usarse cloruro de sodio para modificar la toxicidad de la solución, en una concentración de entre 0 y 300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Pueden incluirse crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente sacarosa en una proporción de entre 0 y 10% (óptimamente entre 0,5 y 1,0%). Entre otros crioprotectores apropiados, se incluye la trehalosa y la lactosa. Pueden incluirse agentes de carga para una forma de dosificación liofilizada, principalmente manitol en una proporción de entre 1 y 10% (óptimamente entre 2 y 4%). Pueden usarse estabilizadores para las formas de dosificación líquidas y liofilizadas, principalmente L-Metionina entre 1 y 50 mM (óptimamente entre 5 y 10 mM). Entre otros agentes de carga apropiados, se incluye la glicina, la arginina, que pueden incluirse como polisorbato-80 en una proporción de entre 0 y 0,05% (óptimamente entre 0,005 y 0,01%). Entre los agentes tensioactivos adicionales, se incluyen, no taxativamente, el polisorbato 20 y los agentes tensioactivos BRIJ. La composición farmacéutica que comprende los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la invención, que se preparan como una solución inyectable para administración parenteral, puede comprender además un agente útil como coadyuvante, tal como los que se usan para incrementar la absorción o la dispersión de una proteína terapéutica (por ejemplo, un anticuerpo). En particular, un adyuvante útil es la hialuronidasa, tal como Hylenex® (hialuronidasa recombinante humana). La adición de hialuronidasa a la solución inyectable mejora la biodisponibilidad para los humanos después de la administración parenteral, particularmente la administración subcutánea. También permite obtener un volumen mayor por sitio de inyección (es decir, más de 1 ml), con menos dolor y disconformidad, y con una incidencia mínima de reacciones en el sitio de inyección (véase WO2004078140, US2006104968, incorporadas en la presente documentación a modo de referencia).

Las composiciones de esta invención pueden tomar una variedad de formas. Éstas incluyen, por ejemplo, las formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como las soluciones líquidas (por ejemplo, las soluciones inyectables y para infusión), las dispersiones o las suspensiones, las tabletas, las píldoras, los polvos, los liposomas y los supositorios. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica requerida. Las composiciones preferidas típicas toman la forma de soluciones inyectables o para infusión, tales como composiciones similares a las que se usan para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. El modo de administración

preferido es el parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferida, el anticuerpo se administra mediante infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, una microemulsión, una dispersión, un liposoma u otra estructura ordenada, apropiada para alojar una concentración elevada de droga. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del compuesto activo (es decir, anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes de los que se enumeraron previamente, según se lo requiera, a lo que sigue una esterilización por filtración. Por lo general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes que necesarios enumerados con anterioridad. En el caso de los polvos estériles y los liofilizados para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado por vacío y el secado por rociado, que proporciona un polvo del ingrediente activo, más cualquier ingrediente adicional que se desee, a partir de una solución de éste previamente esterilizada por filtración. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante el uso de agentes tensioactivos. Es posible obtener la absorción prolongada de composiciones inyectables mediante la inclusión en la composición de un agente que demore la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la presente invención pueden administrarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/el modo de administración preferido es la inyección subcutánea, la inyección intravenosa o la infusión. Como han de apreciar aquellos entrenados en la técnica, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados que se deseen. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que protegerá el compuesto de la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de viniletileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o generalmente son conocidos por aquellos entrenados en la técnica. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, editor, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo o un porción de anticuerpo de la

invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se lo desea) también puede envasarse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, puede comprimirse en tabletas, o puede incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los compuestos pueden incorporarse con excipientes y usarse en la forma de tabletas para ingestión, tabletas bucales, comprimidos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y semejantes. Para administrar un compuesto de la invención por una ruta distinta que la administración parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto, o coadministrar el compuesto, con un material para prevenir su inactivación.

También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones. En determinadas realizaciones, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se coformula y/o se coadministra con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar trastornos en los que es perjudicial la actividad de RGM A. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo anti-RGM A de la invención puede coformularse y/o coadministrarse con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otros blancos (por ejemplo, anticuerpos que se unen a citoquinas o se unen a moléculas de la superficie de la célula). Más aun, uno o más anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos mencionados con anterioridad. Ventajosamente, en dichas terapias de combinación pueden utilizarse dosis menores de los agentes terapéuticos que se administran, con lo que se evitan posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las distintas monoterapias.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo contra RGM A o un fragmento de éste está unido a un vehículo extensor de la vida media conocido en la técnica. Dichos vehículos incluyen, no taxativamente, el dominio Fc, polietilenglicol y dextrano. Dichos vehículos se describen, por ejemplo, en la Solicitud de los EEUU con Nº de Acta 09/428082 y la Solicitud PCT Nº WO 99/25044, las cuales se incorporan en la presente documentación para todo propósito.

En una realización específica, se administran secuencias de ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un anticuerpo de la invención u otro agente profiláctico o terapéutico de la invención, para tratar, prevenir, manejar o mejorar un trastorno o uno o más de sus síntomas mediante terapia génica. La terapia génica hace referencia a la terapia que se lleva a cabo mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o que puede ser expresado. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen el anticuerpo o el agente profiláctico o terapéutico de la invención codificado, que produce un efecto profiláctico o terapéutico.

Es posible usar cualquiera de los métodos de terapia génica disponibles en la técnica de acuerdo con la presente invención. Para hallar revisiones generales de los métodos de terapia génica, véanse Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*

32:573-596; Mulligan, *Science* 260:926- 932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; Mayo, 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica para la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel et al. (editores), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley &Sons, Nueva York (1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, Nueva York (1990). Se presenta una descripción detallada de los distintos métodos de terapia génica en US20050042664 A1, que se incorpora en la presente documentación como referencia.

RGM A tiene una función clave en la patología asociada con una variedad de las enfermedades definidas con anterioridad. Se ha establecido que las proteínas RGM A y RGM se hallan reguladas positivamente en los sitios de las lesiones, en seres humanos que sufren lesiones cerebrales traumáticas (Schwab et al., Arch. Neurol. 62: 1561-8, 2005a), en la penumbra infartada y las áreas nucleares del cerebro de los seres humanos que han sufrido daños debido a un accidente cerebrovascular (Schwab et al., Arch. Neurol. 62: 1561-8, 2005a), y en la sustancia negra de los pacientes que sufren la enfermedad de Parkinson (Bossers et al. Brain Pathology vol. 19: 91-107, 2008). Entonces, los anticuerpos contra RGM A son agentes apropiados para la terapia de combinación del accidente cerebrovascular, las lesiones cerebrales traumáticas, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, y otros trastornos neurodegenerativos del sistema nervioso humano. En los pacientes que han sufrido un accidente cerebrovascular, el tratamiento actual, que se aplica durante las primeras tres horas, consiste en la administración de un activador del plasminógeno tisular para lisar los coágulos sanguíneos (Liang et al. Arch. Neurol. 65: 1429-33, 2008), y en principio, este tratamiento podría combinarse con la administración de un anticuerpo contra RGM A, para ofrecer un abordaje de tratamiento diferente y una ventana terapéutica mucho más extendida. En la enfermedad de Alzheimer, es posible realizar una combinación de drogas con los anticuerpos contra RGMA, por ejemplo, con los potenciadores de la cognición donepezil y memantina, y este abordaje podría permitir reducir significativamente la neuropatología progresiva. La administración intranasal de insulina tiene efectos positivos sobre la atención y la memoria (Hanson y Frey, BMC Neurosci. 9: S5, 2008), y constituye una ruta de administración posible para los anticuerpos contra RGM A que permite evitar la barrera hematoencefálica. En los pacientes con la enfermedad de Parkinson (PD), el tratamiento actual se basa en agentes dopaminérgicos, tales como la levodopa, una prodroga de la dopamina (Khor y Hsu, Curr. Clin. Pharmacol. 2: 234-43, 2007), el ropinirol, un agonista no ergolínico de la dopamina (Jost et al. J. Neurol. 255 Supl. 5: 60-3, 2008), y los inhibidores de la monoamina oxidasa B rasagilina y selegilina (Elmer y Bertoni, Expert Opin. Pharmacother. 9: 2759-72, 2008). A pesar de sus efectos beneficiosos sobre la PD temprana y leve, ninguna de estas drogas permite prevenir la degeneración progresiva de la sustancia negra y las áreas subcorticales y corticales asociadas del cerebro, por lo que

una terapia de combinación con anticuerpos contra RGM A estimuladores de la regeneración podría demorar el progreso de la enfermedad.

Cualquier agente neuroprotector, ya sea un antioxidante, un capturador de radicales, una droga anticonvulsiva como la fenitoína, o la droga contra la anemia eritropoyetina, será apropiado para la terapia de combinación con anticuerpos contra RGM A que favorezcan la regeneración, lo que permitirá extender la ventana de tratamiento terapéutico de los neuroprotectores, que usualmente es muy breve.

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar aquellos seres humanos que sufren las enfermedades mencionadas.

Ha de comprenderse que los anticuerpos de la invención, o sus porciones de unión a antígeno, pueden usarse solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, donde dicho agente adicional es seleccionado por aquellos entrenados en la técnica en función del propósito deseado. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica como útil para tratar la enfermedad o la condición que se esté tratando con el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que le imparta un atributo beneficioso a la composición terapéutica, por ejemplo, un agente que afecte la viscosidad de la composición.

Adicionalmente, ha de comprenderse que las combinaciones que se incluyen dentro de esta invención son aquellas combinaciones útiles para el propósito que se pretende de ellas. Los agentes que se indicarán más adelante se presentan con propósitos ilustrativos, y no tienen por objeto limitar la invención. Las combinaciones que son parte de esta invención pueden comprender los anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional elegido entre las listas que se presentarán más adelante. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales, si la combinación es tal que la composición formada puede llevar a cabo la función que se esté buscando.

Los ejemplos no limitativos para la esclerosis múltiple con los cuales puede combinarse un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención incluyen los siguientes: corticosteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferón-□1a (AVONAX; Biogen); interferón-□1b (BETASERON; Chiron/Berlex); interferón □-n3) (Interferon Sciences/Fujimoto), interferón-□ (Alfa Wassermann/J&J), interferón □1A-IF (Serono/Inhale Terapeutics), Peg-interferón □ 2b (Enzon/Schering-Plough), copolímero 1 (Cop-1; COPAXONA; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; cladribina; anticuerpos o antagonistas de otras citoquinas o factores de crecimiento humanos, y sus receptores, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-23, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o las porciones de unión a antígeno de éstos, pueden combinarse con anticuerpos contra moléculas de la superficie celular, tales como CD2, CD3, CD4, CD8,

CD19, CD20, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90, o sus ligandos. Los anticuerpos de la invención, o las porciones de unión a antígeno de éstos, también pueden combinarse con agentes tales como el metotrexato, la ciclosporina, FK506, la rapamicina, el micofenolato de mofetil, la leflunomida, los NSAID, por ejemplo, el ibuprofeno, los corticosteroides, tales como la prednisolona, los inhibidores de la fosfodiesterasa, los agonistas de la adensosina, los agentes antitrombóticos, los inhibidores del complemento, los agentes adrenérgicos, los agentes que interfieren con la señalización por citoquinas proinflamatorias, tales como TNF□ o IL-1 (por ejemplo, inhibidores de las quinasas IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP), los inhibidores de la enzima convertidora de IL-1□, inhibidores de TACE, los inhibidores de la señalización de las células T, tales como los inhibidores de quinasas, los inhibidores de metaloproteínasas, la sulfasalazina, la azatioprina, las 6-mercaptopurinas, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, los receptores de citoquinas solubles, y sus derivados (por ejemplo, receptores de TNF p55 o p75 solubles, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), y las citoquinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-13 y TGF□).

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

Los anticuerpos de la invención, o las porciones de unión a antígeno de éstos, también pueden combinarse con agentes tales como alemtuzumab, dronabinol, unimed, daclizumab, mitoxantrona, clorhidrato de xaliproden, fampridina, acetato de glatiramer, natalizumab, sinnabidol, a-inmunoquina NNSO3, ABR-215062, AnergiX.MS, antagonistas del receptor de quimioquina, BBR-2778, calagualina, CPI-1189, LEM (mitoxantrona encapsulada en liposomas), THC.CBD (agonista de canabinoides) MBP-8298, mesopram (inhibidor de PDE4), MNA-715, anticuerpo contra el receptor de anti-IL-6, neurovax, pirfenidone allotrap 1258 (RDP-1258), sTNF-R1, talampanel, teriflunomida, TGF-beta2, tiplimotida, antagonistas de VLA-4 (por ejemplo, TR-14035, VLA4 Ultrahaler, Antegran-ELAN/Biogen), antagonistas del interferón gamma, agonistas de IL-4.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad eficaz para el uso terapéutico" o una "cantidad eficaz para el uso profiláctico" de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención. Una "cantidad eficaz para el uso terapéutico" hace referencia a una cantidad eficaz, en las dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para obtener el resultado terapéutico que se desea. Una cantidad eficaz para el uso terapéutico del anticuerpo o la porción de anticuerpo puede ser determinada por un aquellos entrenados en la técnica y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o la porción de anticuerpo de producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz para el uso terapéutico también es una en la que

cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o la porción de anticuerpo es superado por los efectos terapéuticos beneficiosos. Una "cantidad eficaz para el uso profiláctico" hace referencia a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para obtener el resultado profiláctico que se desea. Típicamente, debido a que se usa una dosis profiláctica en los sujetos antes o en estados tempranos de la enfermedad, la cantidad eficaz para el uso profiláctico será menor que la cantidad eficaz para el uso terapéutico.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proveer la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta profiláctica o terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un bolo individual, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o la dosis puede reducirse o incrementarse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en formas de dosificación individuales para facilitar su administración y obtener dosis uniformes. La forma de dosificación individual, como se la usa en la presente documentación, hace referencia a unidades físicamente discretas, apropiadas para dosificaciones individuales en los sujetos mamíferos a tratar; donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico que se requiera. La especificación para la forma de dosificación individual de la invención está dictada y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se desea obtener, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de las composiciones de un compuesto activo tal para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

A modo de ejemplo, un rango no limitativo para una cantidad eficaz para el uso profiláctico o terapéutico de un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención es entre 0,1 y 20 mg/kg, más preferiblemente entre 1 y 10 mg/kg. Vale destacar que los valores de las dosis pueden variar con el tipo y la severidad de la condición a tratar. También ha de comprenderse que, para un sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el correr del tiempo, de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de dosificación que se indican en la presente documentación solamente se presentan a modo de ejemplo y no tienen la intención de limitar el alcance o la práctica de la composición que se reivindica.

Para los expertos en la técnica será fácilmente evidente que son obvias otras modificaciones y adaptaciones apropiadas para los métodos de la invención que se describen en la presente documentación, y que dichos métodos también pueden llevarse a cabo usando equivalentes apropiados, sin alejarse del alcance de la invención o las realizaciones que se detallan en la presente documentación. Habiéndose descripto la presente invención en detalle, ésta podrá comprenderse más claramente con referencia a los siguientes ejemplos, que solamente se incluyen con fines ilustrativos y no pretenden

limitar la invención.

EJEMPLOS

Métodos

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

(i) Se cubrieron placas de ELISA de unión directa con hRGM A (R&D) en una concentración de 2 µg/ml en amortiguador de carbonato. Se bloquearon luego las cavidades con una solución de Bloqueo 2% (Bio-Rad) durante 1 hora, a temperatura ambiente. Se realizaron diluciones seriadas de los anticuerpos biotinilados con un factor de dilución de 1:5 en BSA/PBS 0,1% a lo largo de la placa, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. El reactivo de detección fue una dilución 1:10.000 de estreptavidina-HRP en BSA/PBS al 0,1%. Se realizó la detección con un reactivo TMB, se la detuvo con H_2SO_4 2N y se leyó la DO a 450 nM.

(ii) Análisis de FACS. Se sometieron los transfectantes estables de las células HEK293 que sobreexpresaban hRGM A o las células BAF3 que sobreexpresan RGM A de rata a una coloración con anticuerpos monoclonales 5F9 o 8D1 no marcados durante más de 15 minutos a 4º en amortiguador de BSA/PBS 0,1%. La detección se llevó a cabo con un anticuerpo IgG PE de ratón anti-rata.

(iii) Ensayos de ELISA en fase sólida para evaluar el anticuerpo monoclonal 5F9 en ensayos de unión de hRGM A-neogenina.

Se cubrieron placas de ELISA (Immuno Plate Cert. Maxi Sorb. F96 NUNC, 439454) durante 1 hora a 37ºC con una concentración de 2,5 µg/ml del dominio extracelular de la proteína de neogenina humana con una marca de His (concentración de la solución de reserva: 30 µg/ml). Después de la incubación, se removió la neogenina no unida en 3 pasos de lavado separados con PBS que contenía Tween 20 0,02%. El bloqueo de las placas cubiertas con neogenina se hizo agregando 200 µl por cavidad de una solución de bloqueo de albúmina de suero bovina (BSA) al 3%, PBS, Tween 20 (0,02%). Después de incubar durante 1 hora a 37ºC, se removió la solución de bloqueo y se agregó la proteína RGM A completa, o fragmentos de ésta, conjugada con una marca de fc humana, con o sin anticuerpo. En algunos experimentos. Se preincubaron los anticuerpos con las proteínas hRGM A conjugadas con fc durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron las placas cubiertas con neogenina con hRGM A, con o sin anticuerpos, durante 1 hora a 37ºC. Después de 3 pasos de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%), se incubaron las placas con un anticuerpo marcado con biotina anti-fc humano (1 mg/ml, diluido 1:200 en PBS, que contenía BSA al 0,6%, Tween 20 al 0,02%), catálogo de Jackson ImmunoResearch nº: 709-065-149, durante 1 hora a 37ºC. Se removió el anticuerpo no unido mediante 3 pasos de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%). Para visualizar la unión del anticuerpo anti-fc marcado con biotina, se agregó un complejo que consistía en estreptavidina-peroxidasa (Roche, cat.# 11089153001), diluido 1:5000 con PBS que contenía BSA al 0,6%, Tween 20 al 0,02%, a lo que siguió una incubación a

37°C durante 1 hora. El complejo de Peroxidasa no unido se removió en los 3 pasos de lavado subsiguientes (PBS-Tween 20 (0,02%), antes de agregar el sustrato de la Peroxidasa (Immuno Pure TMB, Pierce # 34021). La reacción del sustrato se detuvo con H_2SO_4 2,5 M, 1-30 minutos después de su adición a las cavidades. Se analizaron las placas (determinación de DO) con una longitud de onda de 450 nm, usando un fotómetro Anthos.

(iv) Ensayos de ELISA en fase sólida para evaluar el anticuerpo monoclonal 5F9 en ensayos de unión hRGM A-BMP-4.

Se cubrieron placas de ELISA (Immuno Plate Cert. Maxi Sorb. F96 NUNC, 439454) durante 1 hora a 37°C con una solución que contenía una concentración de 2,5 µg/ml de la proteína BMP-4 recombinante humana (R&D Systems, # 314-BP, Lote # BEM316061). Después de la incubación, se removió la BMP-4 no unida en 3 pasos de lavado separados con PBS que contenía Tween 20 al 0,02%. El bloqueo de las placas cubiertas con BMP-4 se hizo agregando 200 µl por cavidad de una solución de bloqueo de Albúmina de suero bovina (BSA) al 3%, PBS, Tween 20 (0,02%). Después de 1 hora de incubación a 37°C, se removió la solución de bloqueo y se agregó la proteína RGM A completa, o fragmentos de ésta, conjugada con una marca de fc humana, con o sin anticuerpo. En algunos experimentos, se preincubaron los anticuerpos con las proteínas hRGM A conjugadas con fc durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron las placas cubiertas con BMP-4 con hRGM A, con o sin anticuerpos, durante 1 hora a 37°C. Después de 3 pasos de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%), se incubaron las placas con un anticuerpo marcado con biotina anti-fc humano (1 mg/ml, diluido 1:200 en PBS, que contenía BSA al 0,6%, Tween 20 al 0,02%), catálogo de Jackson ImmunoResearch nº: 709-065-149, durante 1 hora a 37°C. Se removió el anticuerpo no unido mediante 3 pasos de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%). Para visualizar la unión del anticuerpo anti-fc marcado con biotina, se agregó un complejo que consistía en estreptavidina-peroxidasa (Roche, cat.# 11089153001), diluido 1:5000 con PBS que contenía BSA AL 0,6%, Tween 20 0,02%, a lo que siguió una incubación a 37°C durante 1 hora. El complejo de Peroxidasa no unido se removió en los subsiguientes 3 pasos de lavado (PBS-Tween 20 (0,02%), antes de agregar el sustrato de la Peroxidasa (Immuno Pure TMB, Pierce # 34021). La reacción del sustrato se detuvo con H_2SO_4 2,5 M, 1-30 minutos después de su adición a las cavidades. Se analizaron las placas (determinación de DO) a una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos.

(v) Ensayos de ELISA en fase sólida para evaluar el anticuerpo monoclonal 5F9 en ensayos de unión hRGM A-BMP-2.

Se cubrieron placas de ELISA (Immuno Plate Cert. Maxi Sorb. F96 NUNC, 439454) durante 1 hora a 37°C con una solución que contenía una concentración de 2,5 µg/ml de la proteína BMP-2 recombinante humana (R&D Systems, # 355-BM, Lote # MSA04). Después de la incubación, se removió la BMP-2 no unida en 3 pasos de lavado separados con PBS que contenía Tween 20 0,02%. El bloqueo de las placas cubiertas

con BMP-2 se hizo agregando 200 µl por cavidad de una solución de bloqueo de Albúmina de suero bovina (BSA) 3%, PBS, Tween 20 (0,02%). Después de 1 hora de incubación a 37°C, se removió la solución de bloqueo y se agregó la proteína RGM A completa, o fragmentos de ésta, conjugada con una marca de fc humana, con o sin anticuerpo. En algunos experimentos, se preincubaron los anticuerpos con las proteínas hRGM A conjugadas con fc durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron las placas cubiertas con BMP-2 con hRGM A, con o sin anticuerpos, durante 1 hora a 37°C. Después de 3 pasos de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%), se incubaron las placas con un anticuerpo marcado con biotina anti-fc humano (1 mg/ml, diluido 1:200 en PBS, que contenía BSA al 0,6%, Tween 20 al 0,02%), catálogo de Jackson ImmunoResearch nº: 709-065-149, durante 1 hora a 37°C. Se removió el anticuerpo no unido mediante 3 pasos de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%). Para visualizar la unión del anticuerpo anti-fc marcado con biotina, se agregó un complejo que consistía en estreptavidina-peroxidasa (Roche, cat.# 11089153001), diluido 1:5000 con PBS que contenía BSA AL 0,6%, Tween 20 al 0,02%, a lo que siguió una incubación a 37°C durante 1 hora. El complejo de Peroxidasa no unido se removió en los subsiguientes 3 pasos de lavado (PBS-Tween 20 (0,02%), antes de agregar el sustrato de la Peroxidasa (Immuno Pure TMB, Pierce # 34021). La reacción del sustrato se detuvo con H_2SO_4 2,5 M, 1-30 minutos después de su adición a las cavidades. Se analizaron las placas (determinación de DO) a una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos.

(vi) Cultivo de células NTera-2

Se obtuvieron células NTera-2 humanas de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DMSZ, Braunschweig). Se descongelaron reservas congeladas de células NTera-2 indiferenciadas en medio DMEM que contenía suero fetal bovino al 10% (FBS; JRH Bioscience, Kansas, EEUU) y suero de caballo al 5% (HS; Sigma, Alemania). Se cultivaron las células en frascos de cultivo (Greiner, Alemania) hasta alcanzar 80% de confluencia.

Para la diferenciación neuronal, se sembraron las células NTera-2 en una densidad de 2,5 x 10^6 células/175 cm^2 en medio de diferenciación (medio DMEM que contenía 10% de FBS, 5% de HS, 1% de penicilina-estreptomicina, ácido retinoico 10 µM). Se diferenciaron las células durante 3 semanas y se cambió el medio dos veces por semana.

Después de la diferenciación, se despegaron las células con tripsina-EDTA, y se las separó en una proporción de 1:6. 48 horas después, se separaron las células neuronales mediante el golpeteo de las células subyacentes. Se transfirieron las células separadas para su agregación en medio nuevo, en frascos de cultivo nuevos en agitación (Corning, EEUU). Se dejó reposar las células NTera-2 diferenciadas para que se agregaran, con una agitación horizontal suave a 37°C, durante 24 horas en medio Neurobasal (Gibco) suplementado con B27 (Gibco), glutamina (Gibco) y penicilina-estreptomicina. Se sembraron los agregados de NTera-2 en una densidad de

aproximadamente 20-30 agregados por cubreobjeto, en placas de 24 cavidades. Se cubrieron los cubreobjetos de poli-lisina precubiertos con laminina (20 µg/ml, Sigma) y con el fc recombinante acoplado al fragmento #786 de RGM A humana (aminoácidos 47-168) en una concentración de 10 µg/ml. Después de la siembra, se trataron los cultivos con el anticuerpo monoclonal 5F9, agregado en tres concentraciones diferentes (0,1 µg/ml; 1 µg/ml; 10 µg/ml) al medio de cultivo, y se los incubó nuevamente durante 24 horas a 37°C en medio Neurobasal. A continuación, se fijaron los agregados en paraformaldehído al 4% (2 horas, temperatura ambiente), y se los permeabilizó agregando Triton X-100 al 0,1% en PBS (20 minutos, temperatura ambiente). Para realizar la coloración fluorescente, se bloquearon los cultivos con PBS que contenía BSA al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del bloqueo. las células NTera se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón contra □-tubulina, isotipo 3 (clon SDL3D10, Sigma # T8660), durante 2 horas a temperatura ambiente. Se removió el anticuerpo no unido mediante 3 pasos de lavado diferentes (5-15 minutos cada uno), y se incubaron las células NTera con un anticuerpo de burro anti-ratón conjugado con Cy-3 (Jackson ImmunoResearch Lote 62597), diluido 1:350 veces en PBS/0,5% de BSA y 0,5 µg/ml d e bisbenzimida. Después de una incubación de 1 hora, se lavaron los cultivos 3 veces para remover el anticuerpo secundario no unido. Para la microscopía de fluorescencia, se embebieron los cubreobjetos en Fluoromount G (Southern Biotech, Eching).

Se adquirieron imágenes de agregados de NTera-2 usando un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200, y se analizaron automáticamente los productos de los cultivos usando un sistema de adquisición y análisis de imágenes interno. El análisis automático del producto fue hecho con Image Pro Plus 4.5 y el análisis estadístico de los datos se realizó con el Graph Pad Prism 4. El producto se normalizó a los cultivos control crecidos en ausencia del fragmento de la RGM A human #786.

(vii) Cultivo SH-SY5Y.

Las células SH-SY5Y (ATCC, CRL-2266) son células de neuroblastoma humano derivadas de un tumor de cerebro metastásico. Se cultivaron estas células en un medio que consistía en un 50% de la Solución de Sales Balanceada de Earle (Invitrogen Life Technologies, Cat. # 24010-043) y 50% de la Mezcla de Nutrientes F12 (Ham) + GlutaMAX-1 (Invitrogen Life Technologies, Cat. # 31765-027). Al medio se le agregó un suplemento adicional de 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FCS, JRH Biosciences, Kansas Cat. # 12107-1000M), 1% de NEAA (Solución de Aminoácidos no esenciales MEM (Sigma-Aldrich Cat.# M1745) y 1% de penicilina (10000 U/ml)/estreptomicina (10000 µg/ml) (Invitrogen Life Technologies, Cat. # 15140-122). Para estimular la diferenciación neuronal y el crecimiento de las prolongaciones neuronales, se cultivaron las células SH-SY5Y en un medio suplementado con ácido retinoico 10 µM (RA, Sigma-Aldrich Cat. # R2625-050MG) durante varios días. Se cultivaron las células SH-SY5Y diferenciadas en frascos de cultivo de tejidos, se las removió con una tripsinización

cuidadosa, y se las sembró sobre cubreobjetos de vidrio cubiertos con un patrón de bandas de la proteína RGM A o de un fragmento de la misma y colágeno I.

(viii) Preparación de cubreobjetos de vidrio con bandas

La versión modificada del ensayo de bandas sobre cubreobjetos de vidrio se realizó en una forma levemente diferente a la descripta previamente (Knoell et al. Nature Protocols 2: 1216-1224, 2007) y se resume a continuación.

Se presionaron matrices de silicona estériles para la producción de bandas que consisten en proteínas purificadas sobre la superficie de una placa de Petri con la cara rugosa de la matriz apuntando hacia arriba. Se colocaron cubreobjetos limpios lavados con etanol sobre la matriz, y los bordes de la matriz se marcaron con un bolígrafo en el anverso del cubreobjetos. La matriz que contenía los cubreobjetos se colocó boca abajo cuidadosamente, con el cubreobjetos orientado hacia el fondo de la placa de Petri. Se mezcló RGM A inhibitoria completa conjugada con Fc o fragmentos-fc, o RGM A humana recombinante (R&D Systems Cat. # 2459 RM), con 10 µl de un anticuerpo anti-ratón marcado con FITC (Fab- IgG específico de cabra anti-ratón, Sigma-Aldrich Cat. # F-4018) para visualizar las bandas de RGM A. Usando una jeringa Hamilton, se inyectaron cuidadosamente 50 µl de la solución de RGM A-anticuerpo FITC a través del canal de entrada. El exceso de fluido abandonó la matriz a través del canal de salida, y se eliminó con un paño Kleenex. Después de una incubación de la matriz-cubreobjetos a 37°C durante 2 horas, se lavó la primera solución de recubrimiento (que contenía RGM A) con 100 µl de PBS. En el siguiente paso, se transfirieron los cubreobjetos con las bandas de RGM A a una placa de 24 cavidades, cubierta con 500 µl de colágeno I (colágeno I de cola de rata, Becton Dickinson Biosciences Cat. # 354236) para llenar los espacios vacíos entre las bandas de RGM A. y se incubó a 37°C durante 2 horas. Finalmente, se produjo un patrón de bandas alternadas de RGM A y colágeno I sobre el cubreobjetos. Después de la incubación, el colágeno I no unido se lavó mediante tres pasos de lavado separados con PBS, y las células SH-SY5Y diferenciadas se sembraron sobre los cubreobjetos. Se continuó la incubación de las células SH-SY5Y sobre el sustrato estampado a 37°C durante 20-24 horas, en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra RGM A humana.

Para el análisis de la inmunofluorescencia, se fijaron las células en paraformaldehído al 4% durante 2 horas a temperatura ambiente, o durante la noche a 4°C, y se las permeabilizó por medio de una incubación con PBS que contenía 0,1% de Triton X-100 durante 10-20 minutos a temperatura ambiente. Después de bloquear con BSA al 3% durante 60 minutos, se incubaron las células con el anticuerpo primario (monoclonal anti-□-tubulina, isotipo 3, clon SDL 3D10, Sigma-Aldrich Cat. # T8660) durante 2 horas a temperatura ambiente, y después de varios pasos de lavado, con el anticuerpo secundario (Cy-3 de burro anti-ratón JacksonImmuno Research Lote: 62597), diluido en PBS con BSA al 0,1% durante 1 hora. Los núcleos fueron sometidos a una contracoloración usando bisbenzimida H33258 (Riedel-De-Haen, Cat. # A-0207). Las

células fueron embebidas finalmente en Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates Inc.: Cat. # 010001). Se analizaron las células usando un microscopio de fluorescencia Axioplan2 (Zeiss).

(ix) Construcción y expresión de anticuerpos recombinantes anti RGM A

Se clonó el ADN que codificaba los fragmentos de ADNc de la región variable de la cadena pesada de los anticuerpos monoclonales de rata anti-RGM A humana 5F9 y 8D1 dentro de un vector de expresión pHybE que contenía la región constante de la IgG1 humana, la cual contiene 2 mutaciones de aminoácidos en la región bisagra, por recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones son un cambio de leucina por alanina en las posiciones 234 y 235 (numeración EU, Lund et al., 1991, J. Immunol., 147:2657). Se clonó la región variable de la cadena liviana de los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1 dentro del vector pHybE, que contenía la región constante humana kappa. Los ejemplos de vectores pHyb-E incluyen pHybE-hCk y pHybE-hCg1,z,no-a (véase la Solicitud de Patente de los EEUU con Nº de Acta 61/021282). Se expresaron los anticuerpos completos de manera transitoria en células 293E por co-transfección de los ADNc de las cadenas pesada y liviana quiméricas, unidos dentro del plásmido de expresión pHybE. Los sobrenadantes celulares que contenían al anticuerpo recombinante se purificaron por cromatografía de Proteína A Sefarosa, y el anticuerpo unido se eluyó agregando un amortiguador ácido. Se neutralizaron los anticuerpos y se los dializó en PBS. Posteriormente, se evaluó la capacidad de unirse RGM A de los anticuerpos monoclonales anti- RGM A humana purificados por ELISA, tal como se describió en el ejemplo 1, y ELISA de competición, tal como se describió en el ejemplo 7.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales anti RGM A humana

Los anticuerpos monoclonales de rata anti-RGM A humana se obtuvieron como se detalla a continuación:

Ejemplo 1A: Inmunización de ratas con el antígeno de RGM A humana

El día 1, se inyectaron veinticinco microgramos de RGM A humana recombinante purificada (R&D Systems Cat#2459-RM lote MRH02511A) mezclados con coadyuvante completo de Freund (Sigma), por vía subcutánea, en cuatro ratas Harlan Sprague Dawley de 6-8 semanas de edad. Los días 21, 42 y 63, se inyectaron veinticinco microgramos de RGM A humana recombinante purificada mezclados con coadyuvante incompleto de Freund (Sigma), por vía subcutánea, en las mismas 4 ratas Harlan Sprague Dawley. El día 144 o el día 165, se inyectaron las ratas por vía intravenosa con 10 µg de RGM A humana recombinante purificada.

Ejemplo 1B: Generación de un hibridoma

Se fusionaron los esplenocitos obtenidos de las ratas inmunizadas descriptas en el ejemplo 1.2.A con células SP2/O-, en una proporción de 2:1, de acuerdo con el método establecido descripto en Kohler, G. y Milstein 1975, Nature, 256:495 para generar hibridomas. Los productos de fusión se sembraron en medio selectivo que contenía azaserina e hipoxantina, en placas de 96 cavidades, en una densidad de 1,5 x 10^5 células

de bazo por cavidad. Siete a diez días después de la fusión, se observaron colonias de hibridomas macroscópicas. Se evaluó el sobrenadante de cada uno de las cavidades que contenían colonias de hibridoma por medio de un ELISA directo (véase el ejemplo 2), para determinar la presencia del anticuerpo contra RGM A humana. Las líneas celulares positivas en el ELISA se evaluaron en FACS contra células HEK293 transfectadas de manera estable donde se expresaba RGM A humana y/o de rata. Después, en estas líneas celulares de hibridoma de rata se evaluó la reactividad con RGM A de rata en un ELISA directo, y también se determinó la unión a la proteína de fusión HuRGM A 47-168 en el ELISA.

Tabla 7. Unión de los anticuerpos monoclonales de rata anti RGM A

Nombre	**ELISA directo rHuRGM A**	**FACS HEK293-rhRGM A**	**ELISA directo rRatRGM A**	**ELISA directo hRGM A 47-168/HuIgGFc**
ML68-8D1	Sí	Sí	No	Sí
ML69-5F9	Sí	Sí	Sí	Sí

Ejemplo 2: Unión de los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1 en un ELISA directo

Según se ilustra en la Figura 1A, los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1 se unen a hRGM A con una afinidad similar, tal como describió en la sección anterior (i). También se demostró que el anticuerpo monoclonal 5F9 se une a RGM A de rata en un ELISA, mientras que 8D1 no es capaz de unirse a RGM A de rata (datos no presentados). En la Figura 1B se ilustra que los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1 se unen a células HEK293 donde se sobreexpresa hRGM A en FACS. En la Figura 1C se ilustra que 5F9 es capaz de unirse a células BAF3 donde se sobreexpresa RGM A de rata en FACS, mientras que 8D1 no lo es. El FACS se llevó a cabo según lo descripto en la sección (ii).

Se usaron ensayos de ELISA en fase sólida para evaluar la unión del anticuerpo monoclonal 5F9 en ensayos de unión competitivos de hRGM A-neogenina. Se prepararon y usaron las placas de ELISA como se describió en la sección (iii) de esta solicitud. Se agregó hRGM A en una concentración de 0,5 µg/ml con anticuerpos 5F9, durante 1 hora a 37°C. Se usó el anticuerpo monoclonal 5F9 en las siguientes concentraciones: 1,25 µg/ml, 0,63 µg/ml, 0,32 µg/ml, 0,16 µg/ml, 0,08 µg/ml, 0,04 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,01 µg/ml. La unión de hRGM A se visualizó usando un anticuerpo anti-fc marcado con biotina y un complejo de estreptavidina-peroxidasa. Se analizaron las placas (determinación de DO) en una longitud de onda de 450 nm, usando un fotómetro Anthos. Como se ilustra en la Figura 2, las tres concentraciones de anticuerpo más altas inhibieron la unión de RGM A humana completa a la neogenina en una forma dependiente de la dosis.

Los ensayos de ELISA en fase sólida también se usaron para evaluar el anticuerpo monoclonal 5F9 en ensayos competitivos de hRGM A-BMP-4. Se prepararon y usaron las placas de ELISA como se describió en la sección (iv) de esta solicitud. Se agregó hRGM A en una concentración de 0,5 µg/ml con anticuerpos 5F9, durante 1 hora a 37°C. Se usó el anticuerpo monoclonal 5F9 en las siguientes concentraciones: 1,25 µg/ml,

0,63 µg/ml, 0,32 µg/ml, 0,16 µg/ml, 0,08 µg/ml, 0,04 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,01 µg/ml. La unión de hRGM A se visualizó usando un anticuerpo anti-fc marcado con biotina y un complejo de estreptavidina-peroxidasa. Se analizaron las placas (determinación de DO) en una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos. Como se ilustra en la Figura 3, las cuatro concentraciones de anticuerpo más altas, inhibieron la unión de RGM A humana completa a BMP-4 en una forma dependiente de la dosis.

Los ensayos de ELISA en fase sólida se usaron también para evaluar la inhibición de la unión del fragmento 0 (47-168) de hRGM A a BMP-4 con el anticuerpo monoclonal 5F9. Se cubrieron las placas de ELISA durante 1 hora a 37°C con una concentración de 2,5 µg/ml de la proteína BMP-4 humana recombinante. Se agregó la cadena liviana de hRGM A (fragmento 0, 47-168) en una concentración de 0,5 µg/ml con anticuerpos 5F9, durante 1 hora a 37°C. Se usó el anticuerpo monoclonal 5F9 en las siguientes concentraciones: 1,25 µg/ml, 0,63 µg/ml, 0,32 µg/ml, 0,16 µg/ml, 0,08 µg/ml, 0,04 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,01 µg/ml. La unión de hRGM A se visualizó usando un anticuerpo anti-fc marcado con biotina y un complejo de estreptavidina-peroxidasa. Se analizaron las placas (determinación de DO) en una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos. En la Figura 4 se ilustra la inhibición dependiente de la dosis de la unión de la cadena liviana de RGM A humana a BMP-4 con el anticuerpo en concentraciones de 1,25 µg/ml, 0,63 µg/ml y 0,32 µg/ml.

Los ensayos de ELISA en fase sólida se usaron también para evaluar la unión del anticuerpo monoclonal 5F9 en ensayos de unión competitivos de hRGM A-BMP-2. Se prepararon y usaron las placas de ELISA como se describió en la sección (v) de esta solicitud. Se agregó hRGM A completa en una concentración de 0,5 µg/ml con anticuerpos 5F9, durante 1 hora a 37°C. Se usó el anticuerpo monoclonal 5F9 en las siguientes concentraciones: 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,63 µg/ml. La unión de hRGM A se visualizó usando un anticuerpo anti-fc marcado con biotina y un complejo de estreptavidina-peroxidasa. Se analizaron las placas (determinación de DO) en una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos. En la Figura 5 se ilustra la inhibición de la unión de RGM A humana completa a BMP-2 con el anticuerpo en concentraciones de 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,63 µg/ml, 0,32 µg/ml.

Los ensayos de ELISA en fase sólida se usaron también para evaluar a los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1 en ensayos de unión de hRGM A-neogenina, hRGM A-BMP-2 y hRGM A-BMP-4. (Figura 9) Como se describió con anterioridad, se cubrieron las placas de ELISA durante 1 hora a 37°C con una concentración de 2,5 µg/ml del dominio extracelular de la proteína humana de neogenina marcada con His o con 2,5 µg/ml Bmp-2 o BMP-4. Se agregó hRGM A completa conjugada con fc en una concentración de 0,5 µg/ml con anticuerpos durante 1 hora a 37°C. Los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1 se usaron en las siguientes concentraciones: 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,63 µg/ml, 0,32 µg/ml, 0,16 µg/ml, 0.08 µg/ml. La unión de hRGM A se visualizó usando un anticuerpo anti-fc marcado con biotina y un complejo de

estreptavidina-peroxidasa. Se analizaron las placas (determinación de DO) en una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos. Como se ilustra en la Figura 9, el anticuerpo monoclonal 8D1 de rata inhibe o reduce la unión de RGM A humana a BMP-2 y a BMP-4, pero no es capaz de inhibir su unión a la neogenina.

Ejemplo 3. Actividad del anticuerpo monoclonal 5F9 en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados de neuronas humanas diferenciadas NTera

Se obtuvieron células NTera y se las cultivó como se describió en la sección del método (vi) de esta solicitud. El anticuerpo monoclonal 5F9 neutralizó la actividad de inhibición del crecimiento de las neuritas del fragmento inhibidor potente de la cadena liviana de la proteína hRGM A humana conjugada con fc (aminoácidos 47-168) en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados de neuronas NTera humanas diferenciadas. Como se ilustra en la Figura 6, en ausencia de una proteína RGM A inhibitoria o un fragmento, y en presencia de la sustancia estimulante de procesos laminina, los agregados neuronales de NTera presentan una red extensa y densa de neuritas en crecimiento (A). Como también se ilustra en la Figura 6, la presencia de la cadena liviana de hRGM A reduce dramáticamente la cantidad, la densidad y la longitud de las neuritas de NTera, con lo que se demuestra la potente actividad de inhibición del fragmento de hRGM A. Las pocas neuritas que salen del agregado son cortas y fuertemente empaquetadas (B). En las partes C-E de la Figura 6 se ilustran concentraciones en aumento del anticuerpo monoclonal 5F9, que al ser agregado a los cultivos, neutraliza o desreprime, de una manera eficaz y dependiente de la dosis, la actividad de inhibición del crecimiento de neuritas del fragmento de la cadena liviana de hRGM A. Al aumentar las concentraciones del anticuerpo monoclonal, el crecimiento de los agregados neuronales de NTera es restaurado por completo, a pesar de la presencia del inhibidor RGM A (C: 0,1 µg/ml del anticuerpo monoclonal 5F9; D: 1 µg/ml del anticuerpo monoclonal 5F9; E: 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal 5F9).

Se realizó un análisis cuantitativo de la actividad de neutralización del anticuerpo monoclonal 5F9 en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados de NTera humanos para evaluar el fragmento inhibidor potente de la cadena liviana de la proteína hRGM A humana conjugada con fc (aminoácidos 47-168). El crecimiento de procesos de los cultivos fue analizado automáticamente al colorear los agregados con bisbenzimida para luego fotografiarlos. Con la coloración solamente marcaron los agregados, y no las neuritas en crecimiento. Sin embargo, éstas fueron coloreadas con un anticuerpo contra □3-tubulina y un anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo. El crecimiento de las neuritas fue determinado automáticamente calculando el índice de crecimiento de neuritas, un índice determinado mediante la sustracción del área de los cuerpos celulares del área del agregado y sus procesos coloreados con □3-tubulina. Después, este factor se dividió por el área de los cuerpos celulares, como se describió en Lingor et al. J. Neurochem. 103: 181-189, 2007. En la Figura 7 se ilustra que el anticuerpo monoclonal 5F9 (0,1-10,0 µg) neutralizó de forma dependiente de la dosis la actividad de inhibición del

crecimiento de un fragmento inhibidor potente de hRGM A conjugada con fc (fragmento 0, 47-168; 10 µg) en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados de NTera humanas.

Ejemplo 4: Actividad del anticuerpo monoclonal 5F9 en bandas de hRGM A/colágeno I

Se cultivaron y usaron las células SH-SY5Y como se describió en la sección (vii) de esta solicitud. Se prepararon los cubreobjetos de vidrio con bandas de RGM A y colágeno I como se describió en la sección (viii) de esta solicitud. Para los experimentos, se produjo una base con bandas alternadas de hRGM A/colágeno I y colágeno I, de acuerdo con un protocolo descripto en la literatura (Knoell et al. Nature Protocols 2: 1216-1224, 2007). En ausencia del anticuerpo monoclonal 5F9 (A), las células neuronales SH-SY5Y presentan una preferencia clara por la banda de colágeno I, donde más de 90% de las células prefieren las bandas de colágeno I sobre las bandas de hRGM A. Con concentraciones crecientes del anticuerpo monoclonal 5F9, las células neuronales SH-SY5Y prefieren las bandas de hRGM A sobre las bandas de colágeno I (B-E). En la concentración máxima del anticuerpo monoclonal (E), las neuronas SH-SY5Y presentan una preferencia marcada por las bandas de hRGM A, en comparación con las bandas de colágeno I (véase la Figura 8). Esto puede interpretarse como una característica única del anticuerpo monoclonal 5F9, ya que transformó la naturaleza inhibitoria de RGM A en una actividad de atracción. En presencia de concentraciones crecientes de 5F9, las células neuronales prefieren migrar y crecer en un sustrato RGM A, y no sobre un sustrato permisivo como el colágeno I. Una característica única como ésta nunca había sido descripta para un anticuerpo monoclonal.

Ejemplo 5: Construcción de anticuerpos con injertos de CDR

Se injertan las secuencias CDR de las cadenas VH y VL del anticuerpo monoclonal 5F9 (véase la tabla 5 anterior) aplicando métodos convencionales bien conocidos en la técnica, en distintas secuencias de cadenas pesadas y livianas humanas aceptoras. Sobre la base de los alineamientos de las secuencias VH y VL con las secuencias VH y VL del anticuerpo monoclonal 5F9 de la presente invención, se seleccionan las siguientes secuencias humanas conocidas:

a) VH3-48, VH3-33 y VH3-23, así como las secuencias de unión hJH3, hJH4 y hJH6, para construir secuencias aceptoras de la cadena pesada (de acuerdo con la tabla 3 anterior);
b) A17 y A18, así como hJK2, para construir secuencias aceptoras de la cadena liviana (de acuerdo con la tabla 4 anterior).

Mediante el injerto de las CDR correspondientes de VH y VL de 5F9 en dichas secuencias aceptoras, se prepararon las siguientes secuencias VH y VL humanizadas y modificadas con injertos de CDR (véase también la tabla 6 anterior): VH 5F9.1-GL, VH 5F9.2-GL, VH 5F9.3-GL, VH 5F9.4-GL, VH 5F9.5-GL, VH 5F9.6-GL, VH 5F9.7-GL y VH 5F9.8-GL; VL 5F9.1-GL, VL 5F9.2-GL y VL 5F9.3-GL.

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

Para generar retromutaciones del marco en anticuerpos humanizados, se introducen mutaciones en las secuencias de los anticuerpos con injertos de CDR preparados de acuerdo con el ejemplo 5, mediante la síntesis *de novo* del dominio variable, y/o usando cebadores mutagénicos y PCR, y métodos bien conocidos en la técnica. Se construyen distintas combinaciones de retromutaciones, y otras mutaciones para cada uno de los injertos de CDR,, como se indica a continuación.

Para las cadenas pesadas VH 5F9.1-GL, VH 5F9.2-GL y VH 5F9.3-GL se retromutan uno o más de los siguientes residuos de interfase Vernier y VH/VL, como se indica a continuación: V37→I, V48→I, S49→G, y/o R98→K

Para las cadenas pesadas VH 5F9.4-GL, VH 5F9.5-GL y VH 5F9.6-GL se retromutan uno o más de los siguientes residuos de interfase Vernier y VH/VL, como se indica a continuación: V37→I, V48→I, A49→G, R98→K.

Para las cadenas pesadas VH 5F9.7-GL, VH 5F9.8-GL y VH 5F9.9-GL se retromutan uno o más de los siguientes residuos de interfase Vernier y VH/VL, como se indica a continuación: V37→I, V48→I, S49→G.

Las mutaciones adicionales incluyen las que se indican a continuación:

para las cadenas pesadas VH 5F9.1-GL, VH 5F9.2-GL y VH 5F9.3-GL: D88→A,

para las cadenas pesadas VH 5F9.4-GL, VH 5F9.5-GL y VH 5F9.6-GL: Q1→E y

para las cadenas pesadas VH 5F9.7-GL, VH 5F9.8-GL y VH 5F9.9-GL: L5→V.

Para la cadena liviana VL 5F9.1-GL, se retromutan uno o más de los siguientes residuos de interfase Vernier y VH/VL, como se indica a continuación: I2→V, M4→L, Y41→F.

Para la cadena liviana VL 5F9.2-GL, se retromutan uno o más de los siguientes residuos de interfase Vernier y VH/VL, como se indica a continuación: M4→L, R51→L.

Para la cadena liviana VL 5F9.3-GL se retromutan uno o más de los siguientes residuos de interfase Vernier y VH/VL, como se indica a continuación: M4→L, Y41→F.

Ejemplo 7: Construcción y expresión de anticuerpos anti RGM A recombinantes y humanizados

Se co-transfectaron vectores de expresión pHybE que contenían cadenas pesadas y livianas que contenían retromutaciones del marco en células 293-6E para producir anticuerpos humanizados completos de manera transitoria, como se describió en la sección ix anterior. Las mutaciones se introdujeron en secuencias de los anticuerpos con injertos CDR preparadas de acuerdo con el ejemplo 5, mediante la síntesis *de novo* del dominio variable, y/o usando cebadores mutagénicos y PCR, y métodos bien conocidos en la técnica. Las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos humanizados se detallan en la tabla 8.

Específicamente, las cadenas pesadas:

VH 5F9.1, VH 5F9.5 y VH 5F9.9 contienen VH 5F9.4-GL con una mutación Q1→E;

VH 5F9.2, VH 5F9.6, VH 5F9.10, VH 5F9.19, VH 5F9.20, VH 5F9.21 y VH 5F9.22 contienen VH 5F9.4-GL con una mutación Q1→E, y las siguientes retromutaciones en los residuos Vernier y VH/VL de interfase: V37→I, V48→I, A49→G, R98→K;

VH 5F9.3, VH 5F9.7 y VH 5F9.11 contienen VH 5F9.7-GL con una mutación L5→V;

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

Las cadenas livianas

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

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

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

VL 5F9.19 y VL 5F9.23 contienen VL 5F9.2-GL, con las siguientes retromutaciones en los residuos Vernier y VH/VL de interfase: M4→L, R51→L;

VL 5F9.20 y VL 5F9.24 contienen a VL 5F9.2-GL con la siguiente retromutación en el residuo Vernier y VH/VL de interfase: M4→L;

VL 5F9.21 y VL 5F9.25 contienen VL 5F9.3-GL, con las siguientes retromutaciones en los residuos Vernier y VH/VL de interfase: M4→L, Y41→F;

VL 5F9.22 y VL 5F9.26 contienen VL 5F9.3-GL, con la siguiente retromutación en el residuo Vernier y VH/VL de interfase: M4→L.

Tabla 8: Expresión de anticuerpos humanizados

SEQ ID Nº	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789 **0**
47	**VH h5F9.1**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WVRQAPGKGLEW VA**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AR**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
44	**VL h5F9.1**	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WYLQKPGQSP QLLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQATH** **DPLT**FGQGTKLEIKR
48	**VH h5F9.2**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WIRQAPGKGLEWI G**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
44	**VL h5F9.2**	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WYLQKPGQSP QLLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQATH** **DPLT**FGQGTKLEIKR
49	**VH h5F9.3**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WVRQAPGKGLEW VS**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
44	**VL h5F9.3**	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WYLQKPGQSP QLLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQATH** **DPLT**FGQGTKLEIKR

50	**VH h5F9.4**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WIRQAPGKGLEWI G**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
44	**VL h5F9.4**	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WYLQKPGQSP QLLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQATH** **DPLT**FGQGTKLEIKR
47	**VH h5F9.5**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WVRQAPGKGLEW VA**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AR**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
45	**VL h5F9.5**	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WFQQRPGQS PRRLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQAT** **HDPLT**FGQGTKLEIKR
48	**VH h5F9.6**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WIRQAPGKGLEWI G**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
45	**VL h5F9.6**	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WFQQRPGQS PRRLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQAT** **HDPLT**FGQGTKLEIKR
49	**VH h5F9.7**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WVRQAPGKGLEW VS**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS

45	**VL h5F9.7**	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WFQQRPGQS PRRLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQAT** **HDPLT**FGQGTKLEIKR
50	**VH h5F9.8**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WIRQAPGKGLEWI G**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
45	**VL h5F9.8**	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WFQQRPGQS PRRLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQAT** **HDPLT**FGQGTKLEIKR
47	**VH h5F9.9**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WVRQAPGKGLEW VA**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AR**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
46	**VL h5F9.9**	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WYLQKPGQSP QLLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQATH** **DPLT**FGQGTKLEIKR
48	**VH h5F9.10**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WIRQAPGKGLEWI G**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
46	**VL h5F9.10**	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WYLQKPGQSP QLLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQATH** **DPLT**FGQGTKLEIKR

49	**VH h5F9.11**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WVRQAPGKGLEW VS**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
46	**VL h5F9.11**	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WYLQKPGQSP QLLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQATH** **DPLT**FGQGTKLEIKR
50	**VH h5F9.12**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WIRQAPGKGLEWI G**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
46	**VL h5F9.12**	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WYLQKPGQSP QLLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQATH** **DPLT**FGQGTKLEIKR
48	**VH h5F9.19**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WIRQAPGKGLEWI G**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
51	**VL h5F9.19**	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WFQQRPGQS PRLLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQAT** **HDPLT**FGQGTKLEIKR
48	**VH h5F9.20**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WIRQAPGKGLEWI G**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS

52	**VL h5F9.20**	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WFQQRPGQS PRRLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQAT** **HDPLT**FGQGTKLEIKR
48	**VH h5F9.21**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WIRQAPGKGLEWI G**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
53	**VL h5F9.21**	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WFLQKPGQSP QLLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQATH** **DPLT**FGQGTKLEIKR
48	**VH h5F9.22**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WIRQAPGKGLEWI G**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
54	**VL h5F9.22**	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WYLQKPGQSP QLLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQATH** **DPLT**FGQGTKLEIKR
50	**VH h5F9.23**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WIRQAPGKGLEWI G**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
51	**VL h5F9.23**	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WFQQRPGQS PRLLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQAT** **HDPLT**FGQGTKLEIKR

50	**VH h5F9.24**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WIRQAPGKGLEWI G**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
52	**VL h5F9.24**	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WFQQRPGQS PRRLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQAT** **HDPLT**FGQGTKLEIKR
50	**VH h5F9.25**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WIRQAPGKGLEWI G**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
53	**VL h5F9.25**	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WFLQKPGQSP QLLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQATH** **DPLT**FGQGTKLEIKR
50	**VH h5F9.26**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS**NYGMN**WIRQAPGKGLEWI G**MIYYDSSEKHYADSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK**GTTPDY**WGQGTMVTVSS
54	**VL h5F9.26**	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISC**RS** **SQSLEYSDGYTFLE**WYLQKPGQSP QLLIY**EVSNRFS**GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC**FQATH** **DPLT**FGQGTKLEIKR

Ejemplo 8: Caracterización de los anticuerpos humanizados 5F9 usando un ELISA de competición

Se cubrieron placas de ELISA (Costar 3369) durante la noche a 4°C con 50 µl por cavidad de hRGM A, a razón de 0,25 µg/ml en amortiguador de carbonato-bicarbonato de sodio 0,2 M, pH 9,4; se las lavó con amortiguador de lavado (PBS que contenía Tween 20 al 0,1%), y se las bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con 200 µl/cavidad de leche en polvo descremada al 2% en PBS. Después de lavar con amortiguador de lavado, se agregó una mezcla de 5F9 quimérica biotinilada (con una concentración final de 0,1

µg/ml) y un anticuerpo competidor de ensayo no marcado, donde se comenzó en una concentración final de 50 µg/ml y se realizaron diluciones seriadas al 5º) en 50 µl/cavidad del amortiguador de ELISA por duplicado. Después de incubar 1 hora a temperatura ambiente y lavar con amortiguador de lavado, los anticuerpos unidos a las placas se detectaron usando 100 µl/cavidad de una dilución 1:10.000 de estreptavidina conjugada con HRP (Fitzgerald) en amortiguador de ELISA. Después de incubar 1 hora a temperatura ambiente y lavar con amortiguador de lavado, se reveló el color agregando 100 µl/cavidad de amortiguador TMB (Zymed). Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se detuvo el revelado del color agregando de 50 µl/cavidad de ácido clorhídrico 1 N. Se leyó la absorbancia a 490 nm.

En la tabla 9 se detallan los valores de IC_{50} de los anticuerpos 5F9 humanizados obtenidos usando el programa computacional GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Tabla 9. Valores de IC50 de los anticuerpos 5F9 humanizados en un ELISA competitivo

Anticuerpo	IC50 (µg/ml)	Anticuerpo	IC50 (µg/ml)
h5F9.1	>10	h5F9.19	N/D
h5F9.2	>10	h5F9.20	>2,0
h5F9.3	>10	h5F9.21	0,60
h5F9.4	>10	h5F9.22	>2,0
h5F9.5	>10	h5F9.23	0,55
h5F9.6	>10	h5F9.24	1,32
h5F9.7	>10	h5F9.25	0,66
h5F9.8	>10	h5F9.26	>2,0
h5F9.9	>10		
h5F9.10	>10		
h5F9.11	>10		
h5F9.12	>10		

Ejemplo 9: Determinaciones de la afinidad de los anticuerpos quiméricos y humanizados usando la tecnología BIACORE

El ensayo de BIACORE (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) permite determinar la afinidad de los anticuerpos con mediciones cinéticas de las constantes de afinidad y disociación. Se determinó la unión de anticuerpos contra RGM A humana recombinante purificados mediante mediciones basadas en resonancia de plasmón superficial, con un instrumento Biacore® 3000 (Biacore® AB, Uppsala, Suecia), usando HBS-EP continuo

(HEPES 10 mM [pH 7,4], NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y agente tensioactivo P20 al 0,005%) a 25ºC. Todos los reactivos se obtuvieron en Biacore® AB (Uppsala, Suecia). Se inmovilizaron directamente aproximadamente 5000 RU de IgG de cabra anti-humana, (Fc□), el fragmento específico del anticuerpo policlonal (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) diluido en acetato de sodio 10 mM (pH 4,5), a través de un chip biosensor CM5 de grado de investigación, usando un conjunto de elementos convencional para la asociación de aminas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y procedimientos a 25 µg/ml. Las fracciones no reactivas sobre la superficie del biosensor fueron bloqueadas con etanolamina. Como superficie de reacción, se usó una superficie de carboximetil dextrano modificado en las celdas de flujo 2 y 4. El carboximetil dextrano no modificado sin IgG de cabra anti-humana en las celdas de flujo 1 y 3 se usó como superficie de referencia. Los anticuerpos purificados se diluyeron en solución salina bufereada HEPES, para la captura a través de superficies de reacción específicas para IgG de cabra anti-humana. Se inyectaron los anticuerpos humanos para capturarlos como ligandos (25 µg/ml) sobre las matrices de reacción con una velocidad de flujo de 5 µl/min. Se determinaron las constantes de velocidad de asociación y disociación, k_{on} (unidad $M^{-1}s^{-1}$) y k_{off} (unidad s^{-1}), bajo una velocidad de flujo continua de 25 µl/minuto. Las constantes de velocidad se obtuvieron realizando mediciones cinéticas de unión a diez concentraciones de antígeno diferentes en el rango de entre 0,39 y 50 nM. Para el análisis cinético, se ajustaron las ecuaciones de velocidad derivadas del modelo de unión 1:1 de Langmuir, de manera simultánea con las fases de asociación y disociación de las ocho inyecciones (usando el análisis de ajuste global), con el uso del programa informático Biaevaluation 4.0.1. A continuación, se calculó la constante de equilibrio de disociación (unidad M) de la reacción entre los anticuerpos humanizados y la RGM A humana recombinante purificada, a partir de las constantes cinéticas de velocidad, a través de la siguiente fórmula: $K_D = k_{off}/k_{on}$.

Tabla 9: Afinidad de los Anticuerpos Monoclonales anti-RGM A quiméricos y humanizados

Nombre	**k_{on} (1/M•s)**	**k_{off} (1/s)**	**K_D (nM)**
5F9 quimérico	$7,65x10^5$	$2,36x10^{-3}$	3,09
h5F9.21	$3,55x10^5$	$2,69x10^{-3}$	7,59
h5F9.23	$5,07x10^5$	$2,21x10^{-3}$	4,37
h5F9.25	$5,70x10^5$	$3,29x10^{-3}$	5,78

Ejemplo 10: Los anticuerpos humanizados 5F9 neutralizan la actividad quimiorrepulsiva de RGM A humana en un ensayo de quimiotaxis de las SH-SY5Y neuronales

En el ensayo de quimiotaxis se mide el comportamiento quimiotáctico de las células en respuesta a factores difusibles que pueden ejercer actividades quimioatractantes o quimiorepulsivas. RGM A ha sido descripta como una proteína que actúa tanto en su forma unida a membrana (repulsión dependiente de contacto) como en su forma soluble y difundible (quimiorepulsiva), y por lo tanto, se la evaluó en un ensayo quimiotáctico de hRGM A. Con este objetivo, se usaron células SH-SY5Y de neuroblastoma sensibles a RGM A humana que presentaban el receptor de RGM neogenina (Schaffar et al. J. Neurochemistry: 107: 418-431, 2008). Se cultivaron las células SH-SY5Y en solución salina balanceada de Earle/medio F12 (EBSS/F12) suplementado con suero fetal bovino al 10% y aminoácidos no esenciales al 1% (MEM-NEAA). Las células se cultivaron para inducir el crecimiento de neuritas en un medio suplementado con ácido retinoico 10 µM (RA). 5-6 horas después, se tripsinizaron las células y se las contó para sembrarlas en recámaras de Boyden de 24-cavidades (BD Falcon 351185, HTS Sistema Multicavidades). Se agregaron 500 µl de la suspensión celular (que correspondieron a $1x10^5$ células) al círculo interno de cada cavidad. Este círculo interno se encuentra separado del círculo externo mayor de cada cavidad por una membrana PET con un diámetro del poro de 8 µm. Se pipetearon 600 µl de medio +/- RGM A +/- anticuerpos en el círculo externo, y se cultivaron las células en las recámaras de cavidades múltiples de Boyden durante la noche a 37°C. Después de la incubación, se aspiró el medio y se lo reemplazó por el fijador (paraformaldehído al 2%). La fijación continuó durante 2 horas a temperatura ambiente, y después de varios pasos de lavado con PBS, se realizó la permeabilización usando PBS con Triton-X-100 al 0,1% (15 minutos, temperatura ambiente). Las células se colorearon incubándolas 1 hora en la oscuridad, en una solución de Alexa Fluor 488 Faloidina 1:100 (Invitrogen A12379) y Bisbenzimida (H332456) 1: 100. Después de 2 pasos de lavado con PBS, se llenaron los cultivos de PBS, se los selló con parafilm y se los almacenó en la oscuridad para realizar un análisis con un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiovert).

En ausencia de hRGM A, las células migran a través de los poros de la membrana, y pueden ser contadas después de la fijación y la coloración. Solamente se cuentan aquellas células que se encuentran unidas al fondo de la membrana, debido a que estas células han migrado a través de la membrana PET. Las células del lado superior de la membrana fueron removidas cuidadosamente antes del procedimiento de fijación. Con este ensayo de quimiotaxis se comprobó que la presencia de hRGM A reducía significativamente, más de 80%, la cantidad de células SH-SY5Y que migran a través de la membrana. El anticuerpo monoclonal de rata 5F9, el anticuerpo quimérico humano-de rata 5F9 y el anticuerpo humanizado 5F9, pero no un anticuerpo monoclonal control de isotipo de rata (p21), neutralizaron parcial o completamente la actividad quimiorepulsiva de hRGM, manifestada como una gran cantidad de células presentes en el fondo de la membrana (Figura 10), A en una concentración de 10 µg/ml.

Ejemplo 11: 5F9 induce la regeneración de axones del nervio óptico comprimidos y dañados en un modelo de lesión del nervio óptico en rata

El modelo de compresión del nervio óptico (o lesión del nervio óptico) provee un modelo animal para evaluar varias sustancias que estimulan la regeneración de las fibras del nervio óptico y reducen la muerte celular masiva de las células ganglionares de la retina.

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas Sprague Dawley macho adultas y ratas Wistar macho, obtenidas en los laboratorios Charles River (D) (Alemania). Los animales se mantienen individualmente en jaulas con un ciclo de 12 horas luz/oscuridad, con agua y comida *ad libitum*. La compresión del nervio óptico se realiza siempre solamente en el ojo izquierdo, mediante una mínima cirugía anterior. Este es un método de lesión del nervio óptico mínimamente invasivo, y fue desarrollado por los inventores, de acuerdo con métodos de cirugía visual anterior humana. Antes y durante los procedimientos de operación, los animales son anestesiados con una anestesia por inhalación, usando Sevoflurano (Abbott GmbH Co. y KG, Delkenheim, Alemania), y son fijados sobre la mesa de operaciones usando una agarradera y cinta adhesiva para los miembros. Se previene la disminución en la temperatura corporal montando los animales sobre una almohadilla de calefacción. Para realizar la cirugía de compresión anterior del nervio óptico de la rata, se libera el ojo izquierdo de los ligamentos y el tejido conectivo de forma cuidadosa. Como primer paso, se realiza un corte de microcirugía (2-3 mm) en el tejido adyacente en la esquina exterior del ojo. Después, se expone el nervio óptico usando un par de fórceps para mover al costado los músculos oculares y la glándula lacrimal, de forma que su uso sea moderado. En el siguiente paso, se abren longitudinalmente las meninges usando microtijeras para exponer el nervio óptico.

Esto resulta en una mayor movilidad del ojo y permite la rotación lateral del ojo y el acceso al nervio óptico izquierdo. El nervio óptico es lesionado aproximadamente 1-3 mm detrás del ojo, usando un par de fórceps dispuestos para proveer una presión máxima fija durante 20-30 segundos. Se tiene especial cuidado de no dañar el suministro vascular del ojo.

Administración local de anticuerpos y amortiguador

Una vez realizada la lesión por compresión del nervio óptico, se trataron ratas macho Sprague Dawley localmente con el anticuerpo 5F9 (n = 10 animales), el anticuerpo control 8D1 (n = 10 animales) o el vehículo control PBS (n = 10 animales). Los experimentadores desconocieron los distintos grupos de tratamiento en todo momento. Para la aplicación local de los anticuerpos, se embebieron pequeños trozos de gelfoam (longitud: 2,5 mm, ancho: 2,5 mm, altura: 2,5 mm) con 20 µl de una solución de anticuerpo, a razón de 10 mg/ml, o con 20 µl de PBS, y se los colocó en una posición directamente adyacente al sitio de la lesión del nervio óptico. Después de realizar una mínima cirugía invasiva y aplicar el anticuerpo, se colocaron los animales sobre toallas de papel en la jaula limpia montada sobre el calentador, para controlar la temperatura

corporal hasta que comenzaran a moverse. Se aplicó un ungüento que contenía un antibiótico (Gentamytrex, Dr. Mann Pharma) sobre el ojo para evitar las infecciones bacterianas y secar la parte exterior de la esclerótica. Se aplicó Carprofen (Rimadyl, 5 mg/kg, Pfizer GmbH, Karlsruhe) por vía intraperitoneal para la terapia de dolor posoperatorio, directamente después de la cirugía, y posteriormente dos veces por día durante un período de 3 días. Se observaron y se controlaron los animales regularmente, de manera directa, varias horas después de la cirugía, y en los días subsiguientes, para asegurar que todos los animales hubieran sobrevivido y se hubieran recuperado de la anestesia y la cirugía. 5 semanas después de la cirugía y la aplicación del anticuerpo/vehículo, se anestesiaron los animales con una sobredosis de Narcoren (40-60 mg/kg) y se los prefundió inyectabndo una solución de paraformaldehído al 4% en el corazón. Se aislaron los nervios ópticos y se los transfirió a una solución de paraformaldehído al 4% durante 1 hora a temperatura ambiente, para asegurar una fijación correcta del tejido. Después de la postfijación, se almacenaron los nervios ópticos de las ratas durante la noche en una solución de sacarosa al 30% (4ºC). Al día siguiente, se embebieron los nervios ópticos en Tissue Tek y se prepararon secciones congeladas y longitudinales con un espesor de 16 µm usando un crióstato.

Para las inmunocoloraciones, se fijaron las secciones de nervios ópticos con acetona fría (-20°C, 10 minutos), se las lavó 3 veces (5 minutos) con solución salina amortiguada con Tris (TBS, Fluka 93312), y se los bloqueó y se los permeabilizó con TBS que contenía albúmina de suero bovina al 5% y Triton-X-100 al 1% (30 minutos) a temperatura ambiente. Se removió la BSA y el detergente residual mediante 2 pasos de lavado separados con TBS (5 minutos cada uno). Se incubaron las secciones durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal de conejo anti-GAP-43 (Abcam, ab 7562), sometido a una dilución 1:100 en solución de BSA/TBS al 5%. Después de 3 pasos de lavado con TBS y Tween al 0,1%, se incubaron las secciones durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes A11034), diluido 1: 1000 en BSA/TBS al 5%, que contenía una dilución 1:100 de bisbenzimida (H33258, 50 µg/ml), para visualizar los núcleos celulares. Antes del embebido, se lavaron 3 veces las secciones coloreadas con TBS-Tween al 0,1% (5 minutos cada paso), y con agua destilada. Las secciones fueron embebidas en Fluoromount G, se las cubrió con un cubreobjeto y se las almacenó en la oscuridad para el análisis microscópico.

Usando un microscopio de fluorescencia Zeiss, se registraron imágenes (Figura 11) de las secciones longitudinales coloreadas usando el programa informático Zeiss Axiovison. Cada una de las imágenes de cada nervio fue montada para su análisis usando el programa de análisis de imágenes Photoshop (Adobe). Se realizó un análisis cuantitativo de dos formas diferentes usando imágenes compuestas de los nervios ópticos. Se midió el área positiva para GAP-43 en el sitio de la lesión usando el programa Axiovision (Figura 12B). Independientemente de este primer análisis cuantitativo, se contó

cada una de las fibras en regeneración (positivas para GAP-43) en 4 áreas diferentes: 0-200 µm, 200-400 µm, 400-600 µm y 600-1200 µm más allá del sitio de compresión. El análisis de los datos y la evaluación estadística fueron realizados con la ayuda del programa Graphpad Prism. (Figura 12A)

Administración sistémica de anticuerpos y amortiguador

Para la administración sistémica de anticuerpos, se trataron ratas macho Wistar de manera sistémica (por vía intraperitoneal, ip, o intravenosa, iv) con el anticuerpo 5F9 (n = 10 animales), o con PBS como vehículo control (n = 10 animales). Se inyectaron los animales dos veces, y las inyecciones se aplicaron en el día 0, poco tiempo después de la inducción de la compresión del nervio, y el día 21 posterior a la compresión. Las dosis de anticuerpo aplicaran fueron de 2 mg/kg el día 0 y 10 mg/kg el día 21. Los animales fueron sacrificados cinco semanas después de la lesión por compresión, se aisló el tejido, se prepararon las secciones y las coloraciones, y se realizó el análisis cuantitativo como se describió con anterioridad. Al igual que los experimentos anteriores, los experimentadores desconocieron los grupos de tratamiento en todo momento. En la Figura 13 se presentan imágenes compuestas de los nervios ópticos de las ratas. En los animales tratados con 5F9 (A), muchas fibras positivas para GAP-43 se extienden más allá del sitio de compresión, en contraste con los animales control tratados con PBS (B). El sitio de compresión está ubicado en el margen izquierdo, y las fibras en regeneración están coloreadas con un anticuerpo contra GAP-43. Se observan muchas fibras en los bordes superior e inferior del nervio óptico en animales tratados con 5F9, pero no en los animales con PBS.

El tratamiento con 5F9, pero no con el vehículo control PBS, incrementó significativamente la cantidad de fibras en regeneración positivas para GAP-43. Se hallaron significativamente más fibras ($p < 0.001$) en los animales tratados con 5F9 a distancias de entre 300 µm y 1800 µm que en los animales tratados con vehículo. Los animales fueron tratados con 5F9 el día 0 y el día 21, con 2 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. El anticuerpo o el vehículo fueron administrados por vía intraperitoneal o vía intravenosa. Los datos provienen del análisis de 9 animales por grupo. Por cada animal, se analizaron 3 series de secciones con un crióstato. (Figura 14A)

En un segundo experimento, se trataron ratas macho Wistar después de la lesión sistémica del nervio óptico (iv) con el anticuerpo 5F9 (n = 10 animales), el anticuerpo control 8D1 (n = 10 animales) o el vehículo control con PBS (n = 10 animales). Las ratas fueron inyectadas una vez por semana con 2 mg/kg del anticuerpo por vía intravenosa, y las inyecciones comenzaron inmediatamente después de la compresión del nervio óptico. Todas las ratas recibieron 4 inyecciones, y los animales se sacrificaron 5 semanas después de la lesión por compresión. Los experimentadores desconocieron los grupos de tratamiento en todo momento, y el procesamiento del tejido y el análisis cuantitativo se llevaron a cabo como se describió con anterioridad. El tratamiento con 5F9, y con vehículo control PBS, incrementó significativamente la cantidad de fibras en regeneración

positivas para GAP-43. Se hallaron significativamente más fibras ($p < 0,001$) en los animales tratados con 5F9 a distancias de entre 200 µm y 1400 µm que en los animales tratados con el vehículo o con el anticuerpo control. Los animales se trataron por vía intravenosa una vez a la semana durante 4 semanas, comenzando el día 0 con 5F9 (2 mg/kg por dosis), el anticuerpo control 8D1 (2 mg/kg por dosis) o PBS (Figura 14B).

Ejemplo 11: 5F9 induce la remielinización de los axones del nervio óptico dañado por compresión en un modelo de lesión del nervio óptico en rata

La proteína básica de la mielina (MBP) es un marcador para los oligodendrocitos y la mielina. Se utilizó un anticuerpo dirigido contra MBP para determinar si había diferencias en la remielinización en los distintos grupos de tratamiento. Para visualizar el proceso de remielinización, se fijaron las secciones de nervio óptico de los animales tratados de manera sistémica con acetona fría (-20ºC, 10 minutos), se las lavó 3 veces (5 minutos) con solución salina amortiguada con Tris (TBS, Fluka 93312), y se los bloqueó y se los permeabilizó con TBS que contenía albúmina de suero bovina al 5% y Triton-X-100 al 1% (30 minutos) a temperatura ambiente. Se removió la BSA y el detergente residual mediante 2 pasos de lavado separados con TBS (5 minutos cada uno). Se incubaron las secciones durante 3 horas o durante la noche a 4ºC con un anticuerpo policlonal de conejo anti-MBP (Abcam, ab 2404), sometido a una dilución 1:50 en una solución BSA/TBS al 5%. Después de 3 pasos de lavado con TBS y Tween al 0,1%, las secciones fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 488 (Molecular Probes A11034), diluido 1: 1000 en BSA al 5%/TBS, que contenía una dilución 1:100 de bisbenzimida (H33258, 50 µg/ml), para visualizar los núcleos celulares. Antes de la inmersión, las secciones coloreadas se lavaron 3 veces con TBS-Tween al 0,1% (5 minutos cada paso), y con agua destilada. Las secciones se embebieron en Fluoromount G, se cubrieron con un cubreobjetos y se almacenaron en la oscuridad para su documentación al microscopio.

Utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss se obtuvieron imágenes de las secciones longitudinales coloreadas, las cuales fueron guardadas usando el programa Zeiss Axiovison. Se montó una imagen de cada nervio para su análisis por medio del programa de análisis de imágenes Photoshop (Adobe). Se realizó un análisis cuantitativo de dos formas diferentes usando imágenes compuestas de los nervios ópticos. Se midió el área positiva para MBP en el sitio de la lesión usando el programa informático Axiovision. El análisis de los datos y la evaluación estadística de los datos se realizaron con la ayuda del programa Graphpad Prism. Los animales se trataron con 5F9 el día 0 y el día 21, con 2 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. El anticuerpo o el vehículo fueron administrados por vía intraperitoneal o vía intravenosa **Imágenes compuestas de nervios ópticos de rata**

La mielinización se visualiza usando un anticuerpo dirigido contra el marcador de mielina, la proteína básica de la mielina MBP. Los sitios de compresión están localizados en el medio de los nervios mixtos, y el área está libre en los animales control tratados con

vehículo (A y B). En los animales tratados con 5F9 (C y D), se observan muchas estructuras positivas para MBP en el área media (centro de compresión) de los nervios ópticos. (Figura 15)

La mielinización se visualiza usando un anticuerpo dirigido contra el marcador de mielina, la proteína básica de la mielina MBP. Se midió el área de MBP usando el programa Zeiss Axiovison. M1 y M2 son dos mediciones independientes, y M es el área positiva para MPB medida promedio. La administración de 5F9 resulta en el aumento significativo, con un factor de 3,5 ($p < 0,001$ versus el vehículo control), del área MBP del sitio de compresión del nervio óptico (Figura 16).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Abbott GmbH & Co. KG

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROTEÍNA RGM A Y SUS USOS

<130> M/49229-PCT

<160> 68

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 1353
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1353)

<400> 1

atg cag ccg cca agg gag agg cta gtg gta aca ggc cga gct gga tgg 48
Met Gln Pro Pro Arg Glu Arg Leu Val Val Thr Gly Arg Ala Gly Trp
1 5 10 15

atg ggt atg ggg aga ggg gca gga cgt tca gcc ctg gga ttc tgg ccg 96
Met Gly Met Gly Arg Gly Ala Gly Arg Ser Ala Leu Gly Phe Trp Pro
20 25 30

acc ctc gcc ttc ctt ctc tgc agc ttc ccc gca gcc acc tcc ccg tgc 144
Thr Leu Ala Phe Leu Leu Cys Ser Phe Pro Ala Ala Thr Ser Pro Cys
35 40 45

aag atc ctc aag tgc aac tct gag ttc tgg agc gcc acg tcg ggc agc 192
Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Gly Ser
50 55 60

cac gcc cca gcc tca gac gac acc ccc gag ttc tgt gca gcc ttg cgc 240
His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu Arg
65 70 75 80

agc tac gcc ctg tgc acg cgg cgg acg gcc cgc acc tgc cgg ggt gac 288
Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly Asp
85 90 95

ctg gcc tac cac tcg gcc gtc cat ggc ata gag gac ctc atg agc cag 336
Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser Gln
100 105 110

cac aac tgc tcc aag gat ggc ccc acc tcg cag cca cgc ctg cgc acg 384
His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Leu Arg Thr
115 120 125

ctc cca ccg gcc gga gac agc cag gag cgc tcg gac agc ccc gag atc 432
Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu Ile
130 135 140

tgc cat tac gag aag agc ttt cac aag cac tcg gcc acc ccc aac tac 480
Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Thr Pro Asn Tyr
145 150 155 160

acg cac tgt ggc ctc ttc ggg gac cca cac ctc agg act ttc acc gac 528
Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp
165 170 175

cgc ttc cag acc tgc aag gtg cag ggc gcc tgg ccg ctc atc gac aat 576
Arg Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn
180 185 190

aat tac ctg aac gtg cag gcc acc aac acg cct gtg ctg ccc ggc tca 624
Asn Tyr Leu Asn Val Gln Ala Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser
195 200 205

gcg gcc act gcc acc agc aag ctc acc atc atc ttc aag aac ttc cag 672
Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln
210 215 220

gag tgt gtg gac cag aag gtg tac cag gct gag atg gac gag ctc ccg 720
Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro
225 230 235 240

gcc gcc ttc gtg gat ggc tct aag aac ggt ggg gac aag cac ggg gcc 768
Ala Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala
245 250 255

aac agc ctg aag atc act gag aag gtg tca ggc cag cac gtg gag atc 816
Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile
260 265 270

cag gcc aag tac atc ggc acc acc atc gtg gtg cgc cag gtg ggc cgc 864
Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg
275 280 285

tac ctg acc ttt gcc gtc cgc atg cca gag gaa gtg gtc aat gct gtg 912
Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val
290 295 300

gag gac tgg gac agc cag ggt ctc tac ctc tgc ctg cgg ggc tgc ccc 960
Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys Pro
305 310 315 320

ctc aac cag cag atc gac ttc cag gcc ttc cac acc aat gct gag ggc 1008
Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr Asn Ala Glu Gly
325 330 335

acc ggt gcc cgc agg ctg gca gcc gcc agc cct gca ccc aca gcc ccc 1056
Thr Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala Pro Thr Ala Pro
340 345 350

gag acc ttc cca tac gag aca gcc gtg gcc aag tgc aag gag aag ctg 1104
Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu
355 360 365

ccg gtg gag gac ctg tac tac cag gcc tgc gtc ttc gac ctc ctc acc 1152
Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr
370 375 380

acg ggc gac gtg aac ttc aca ctg gcc gcc tac tac gcg ttg gag gat 1200
Thr Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp
385 390 395 400

gtc aag atg ctc cac tcc aac aaa gac aaa ctg cac ctg tat gag agg 1248
Val Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Tyr Glu Arg
405 410 415

act cgg gac ctg cca ggc agg gcg gct gcg ggg ctg ccc ctg gcc ccc 1296
Thr Arg Asp Leu Pro Gly Arg Ala Ala Ala Gly Leu Pro Leu Ala Pro
420 425 430

cgg ccc ctc ctg ggc gcc ctc gtc ccg ctc ctg gcc ctg ctc cct gtg 1344
Arg Pro Leu Leu Gly Ala Leu Val Pro Leu Leu Ala Leu Leu Pro Val
435 440 445

ttc tgc tag 1353
Phe Cys
450

<210> 2
<211> 450
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gln Pro Pro Arg Glu Arg Leu Val Val Thr Gly Arg Ala Gly Trp
1 5 10 15

Met Gly Met Gly Arg Gly Ala Gly Arg Ser Ala Leu Gly Phe Trp Pro
20 25 30

Thr Leu Ala Phe Leu Leu Cys Ser Phe Pro Ala Ala Thr Ser Pro Cys
35 40 45

Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Gly Ser
50 55 60

His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu Arg
65 70 75 80

Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly Asp
85 90 95

Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser Gln
100 105 110

His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Leu Arg Thr
115 120 125

Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu Ile
130 135 140

Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Thr Pro Asn Tyr
145 150 155 160

Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp
165 170 175

Arg Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Cys
450

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

<220>
<223> hRGMA fc

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1929)

<220>
<221> péptido_señal
<222> (1)..(102)

<220>
<221> característica_misc
<222> (103)..(1230)
<223> Fragmento de hRGMA 47-422

<220>
<221> característica_misc
<222> (1231)..(1929)
<223> porción fc

<400> 3
atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca 48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

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

aag ctt ccg tgc aag atc ctc aag tgc aac tct gag ttc tgg agc gcc 144
Lys Leu Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala
35 40 45

acg tcg ggc agc cac gcc cca gcc tca gac gac acc ccc gag ttc tgt 192
Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys
50 55 60

gca gcc ttg cgc agc tac gcc ctg tgc acg cgg cgg acg gcc cgc acc 240
Ala Ala Leu Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr
65 70 75 80

tgc cgg ggt gac ctg gcc tac cac tcg gcc gtc cat ggc ata gag gac 288
Cys Arg Gly Asp Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp
85 90 95

ctc atg agc cag cac aac tgc tcc aag gat ggc ccc acc tcg cag cca 336
Leu Met Ser Gln His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro
100 105 110

cgc ctg cgc acg ctc cca ccg gcc gga gac agc cag gag cgc tcg gac 384
Arg Leu Arg Thr Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp
115 120 125

agc ccc gag atc tgc cat tac gag aag agc ttt cac aag cac tcg gcc 432
Ser Pro Glu Ile Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala
130 135 140

acc ccc aac tac acg cac tgt ggc ctc ttc ggg gac cca cac ctc agg 480
Thr Pro Asn Tyr Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg
145 150 155 160

act ttc acc gac cgc ttc cag acc tgc aag gtg cag ggc gcc tgg ccg 528
Thr Phe Thr Asp Arg Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro
165 170 175

ctc atc gac aat aat tac ctg aac gtg cag gtc acc aac acg cct gtg 576
Leu Ile Asp Asn Asn Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val
180 185 190

ctg ccc ggc tca gcg gcc act gcc acc agc aag ctc acc atc atc ttc 624
Leu Pro Gly Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe
195 200 205

aag aac ttc cag gag tgt gtg gac cag aag gtg tac cag gct gag atg 672
Lys Asn Phe Gln Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met
210 215 220

gac gag ctc ccg gcc gcc ttc gtg gat ggc tct aag aac ggt ggg gac 720
Asp Glu Leu Pro Ala Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp
225 230 235 240

aag cac ggg gcc aac agc ctg aag atc act gag aag gtg tca ggc cag 768
Lys His Gly Ala Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln
245 250 255

cac gtg gag atc cag gcc aag tac atc ggc acc acc atc gtg gtg cgc 816
His Val Glu Ile Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg
260 265 270

cag gtg ggc cgc tac ctg acc ttt gcc gtc cgc atg cca gag gaa gtg 864
Gln Val Gly Arg Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val
275 280 285

gtc aat gct gtg gag gac tgg gac agc cag ggt ctc tac ctc tgc ctg 912
Val Asn Ala Val Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu
290 295 300

cgg ggc tgc ccc ctc aac cag cag atc gac ttc cag gcc ttc cac acc 960
Arg Gly Cys Pro Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr
305 310 315 320

aat gct gag ggc acc ggt gcc cgc agg ctg gca gcc gcc agc cct gca 1008
Asn Ala Glu Gly Thr Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala
325 330 335

ccc aca gcc ccc gag acc ttc cca tac gag aca gcc gtg gcc aag tgc 1056
Pro Thr Ala Pro Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys
340 345 350

aag gag aag ctg ccg gtg gag gac ctg tac tac cag gcc tgc gtc ttc 1104
Lys Glu Lys Leu Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe
355 360 365

gac ctc ctc acc acg ggc gac gtg aac ttc aca ctg gcc gcc tac tac 1152
Asp Leu Leu Thr Thr Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr
370 375 380

gcg ttg gag gat gtc aag atg ctc cac tcc aac aaa gac aaa ctg cac 1200
Ala Leu Glu Asp Val Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His
385 390 395 400

ctg tat gag agg act cgg gac ctg cca ggc ttg aat tct gca gat atc 1248
Leu Tyr Glu Arg Thr Arg Asp Leu Pro Gly Leu Asn Ser Ala Asp Ile
405 410 415

gag gga cga atg gat cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga 1296
Glu Gly Arg Met Asp Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
420 425 430

ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc 1344
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
435 440 445

tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa 1392
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
450 455 460

gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat 1440
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
465 470 475 480

aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt 1488
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
485 490 495

gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag 1536
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
500 505 510

gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag 1584
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
515 520 525

aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac 1632
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
530 535 540

acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg 1680
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
545 550 555 560

acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg 1728
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
565 570 575

gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg 1776
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
580 585 590

ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac 1824
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
595 600 605

aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat 1872
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
610 615 620

gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg 1920
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
625 630 635 640

ggt aaa tga 1929
Gly Lys

<210> 4
<211> 642
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 4

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

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

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

Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys

50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Asn Phe Gln Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met

210 215 220

Asp Glu Leu Pro Ala Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp
225 230 235 240

Lys His Gly Ala Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln
245 250 255

His Val Glu Ile Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg
260 265 270

Gln Val Gly Arg Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val
275 280 285

Val Asn Ala Val Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu
290 295 300

Arg Gly Cys Pro Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr
305 310 315 320

Asn Ala Glu Gly Thr Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala
325 330 335

Pro Thr Ala Pro Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys
340 345 350

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

Asp Leu Leu Thr Thr Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr

370 375 380

Ala Leu Glu Asp Val Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His
385 390 395 400

Leu Tyr Glu Arg Thr Arg Asp Leu Pro Gly Leu Asn Ser Ala Asp Ile
405 410 415

Glu Gly Arg Met Asp Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
420 425 430

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
450 455 460

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
465 470 475 480

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
485 490 495

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
500 505 510

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
515 520 525

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

530 535 540

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
545 550 555 560

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
565 570 575

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
580 585 590

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
595 600 605

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
610 615 620

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
625 630 635 640

Gly Lys

<210> 5
<211> 1167
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> hRGMA LC fc

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1167)

<220>
<221> péptido_señal
<222> (1)..(102)

<220>
<221> característica_misc
<222> (103)..(468)
<223> Fragmento de hRGMA 47-168

<220>
<221> característica_misc
<222> (469)..(1167)
<223> porción fc

<400> 5
atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca 48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

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

aag ctt ccg tgc aag atc ctc aag tgc aac tct gag ttc tgg agc gcc 144
Lys Leu Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala
35 40 45

acg tcg ggc agc cac gcc cca gcc tca gac gac acc ccc gag ttc tgt 192
Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys
50 55 60

gca gcc ttg cgc agc tac gcc ctg tgc acg cgg cgg acg gcc cgc acc 240
Ala Ala Leu Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr
65 70 75 80

tgc cgg ggt gac ctg gcc tac cac tcg gcc gtc cat ggc ata gag gac 288

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

ctc atg agc cag cac aac tgc tcc aag gat ggc ccc acc tcg cag cca 336
Leu Met Ser Gln His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro
100 105 110

cgc ctg cgc acg ctc cca ccg gcc gga gac agc cag gag cgc tcg gac 384
Arg Leu Arg Thr Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp
115 120 125

agc ccc gag atc tgc cat tac gag aag agc ttt cac aag cac tcg gcc 432
Ser Pro Glu Ile Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala
130 135 140

acc ccc aac tac acg cac tgt ggc ctc ttc ggg gac ttg aat tct gca 480
Thr Pro Asn Tyr Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Leu Asn Ser Ala
145 150 155 160

gat atc gag gga cga atg gat cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg 528
Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
165 170 175

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc 576
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
180 185 190

atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc 624
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
195 200 205

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag 672
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
210 215 220

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

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat 768

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

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

tct ccg ggt aaa tga 1167
Ser Pro Gly Lys
385

<210> 6
<211> 388
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
165 170 175

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
180 185 190

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
195 200 205

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
210 215 220

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
225 230 235 240

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
245 250 255

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
260 265 270

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
275 280 285

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
290 295 300

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
385

<210> 7
<211> 1431
<212> ADN
<213> Rattus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1431)

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

gct tac cac tcg gct gtc cat ggc ata gag gac ctc atg agc cag cac 384
Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser Gln His
115 120 125

aac tgc tcc aag gat ggc ccc acc tca cag cct cga gtg cgc acg ctc 432
Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Val Arg Thr Leu
130 135 140

ccg cca gct ggg gac agc cag gag cgc tca gat agc ccc gag atc tgc 480
Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu Ile Cys
145 150 155 160

cac tat gag aag agt ttc cac aag cac tca gct gcc ccc aac tac act 528
His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Ala Pro Asn Tyr Thr
165 170 175

cac tgc ggc ctc ttt ggg gac cca cac ctc agg act ttc aca gac cac 576
His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp His
180 185 190

ttc cag aca tgt aag gtg caa ggc gct tgg cct ctc atc gac aat aat 624
Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn Asn
195 200 205

tac ctg aac gtg cag gtc acc aat aca cct gtg ctg ccc ggc tct gcc 672
Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser Ala
210 215 220

gcc act gcc acc agc aag ctc acc atc atc ttc aag aac ttc caa gag 720
Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln Glu
225 230 235 240

tgt gtg gac cag aaa gta tac caa gcc gag atg gac gag ctt ccg tcc 768
Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro Ser
245 250 255

gcc ttt gcc gat ggc tcc aaa aac ggt gga gat aaa cac gga gcc aac 816
Ala Phe Ala Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala Asn
260 265 270

agc ctg aag atc aca gag aag gtg tca ggc cag cac gtg gag atc cag 864
Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile Gln
275 280 285

gcc aag tac atc ggc acc acc atc gtg gtg aga cag gtg ggc cgc tac 912
Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg Tyr
290 295 300

ctg acc ttc gcc gtc cgg atg ccc gag gag gta gtc aac gcc gtg gag 960
Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val Glu
305 310 315 320

gac cgt gac agc caa ggc ctc tac ctc tgc ctg cgg ggc tgc ccg ctc 1008
Asp Arg Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys Pro Leu
325 330 335

aac cag cag atc gac ttc cag gct ttc cgt gcc aac gcc gag agc cct 1056
Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe Arg Ala Asn Ala Glu Ser Pro
340 345 350

cgc agg cca gca gct gcc agc ccc tct cct gtg gtc ccc gag aca ttt 1104
Arg Arg Pro Ala Ala Ala Ser Pro Ser Pro Val Val Pro Glu Thr Phe
355 360 365

ccg tac gag aca gct gtg gcc aag tgc aaa gag aag ctg cct gta gaa 1152
Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu Pro Val Glu
370 375 380

gac ttg tac tac cag gcc tgt gtc ttc gac ctc ctc acg act ggc gac 1200
Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr Thr Gly Asp
385 390 395 400

gtg aac ttc acg ctg gcc gcc tac tat gct ttg gag gat ggc aag atg 1248
Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp Gly Lys Met
405 410 415

ctc cac tcc aac aag gac aag cta cac ctg ttt gaa agg act cgg gag 1296
Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Phe Glu Arg Thr Arg Glu
420 425 430

ctg cct gac cca gct ttc ttg tac aaa gtg gtg ata tcc agc aca gtg 1344
Leu Pro Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Ile Ser Ser Thr Val
435 440 445

gcg gcc gct cga gga ggg ccc gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat 1392
Ala Ala Ala Arg Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
450 455 460

ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat cat tga 1431
Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
465 470 475

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

<400> 8

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

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

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

Ala Asp Ile Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly Ser Pro Cys Lys Ile
50 55 60

Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Ser Gly Ser His
65 70 75 80

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

Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly Asp Leu
100 105 110

Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser Gln His
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH 5F9

<220>
<221> característica_misc
<222> (62)..(62)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL 5F9

<400> 10

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

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

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

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

50 55 60

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

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

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

Arg

<210> 11
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región constante de Ig gamma-1

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

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

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

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

<210> 12
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región constante mutante de Ig gamma-1

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

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

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

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

<210> 13
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región constante de Ig Kappa

<400> 13

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

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

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

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

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

<210> 14
<211> 105
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región constante de Ig Lambda

<400> 14

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

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

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

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

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

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

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100 105

<210> 15
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH3-48/JH3 FR1

<400> 15

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

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

<210> 16
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH3-48/JH3 FR2

<400> 16

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

<210> 17
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH3-48/JH3 FR3

<400> 17

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

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

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH3-49/JH3 FR4

<400> 18

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH3-48/JH4 FR4

<400> 19

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH3-48/JH6 FR4

<400> 20

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 21
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH3-33/JH6 FR!

<400> 21

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

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

<210> 22
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH3-33/JH6 FR2

<400> 22

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

<210> 23
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH3-33/JH6 FR3

<400> 23

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

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

<210> 24
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH3-23/JH3 FR1

<400> 24

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

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

20 25 30

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH3-23/JH3 FR2

<400> 25

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

<210> 26
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH3-23/JH3 FR3

<400> 26

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

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

<210> 27
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> A18/JK2 FR1

<400> 27

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> A18/JK2 FR2

<400> 28

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

<210> 29
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> A18/JK2 FR3

<400> 29

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

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

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

<220>
<223> A18/JK2 FR4

<400> 30

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

<210> 31
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> A17/JK2 FR1

<400> 31

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 32
<211> 15
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> A17/JK2 FR2

<400> 32

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

<210> 33
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> A17/JK2 FR3

<400> 33

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

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

<210> 34
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH 5F9

<400> 34

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

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH 5F9.1-GL

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 36
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH 5F9.2-GL

<400> 36

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH 5F9.3-GL

<400> 37

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 38
<211> 115
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VH 5F9.4-GL

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 39

<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH 5F9.5-GL

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH 5F9.6-GL

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser

115

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

<220>
<223> VH 5F9.7-GL

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 42
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH 5F9.8-GL

<400> 42

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 43
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH 5F9.9-GL

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 44
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL 5F9.1-GL

<400> 44

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

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

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala

85 90 95

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

Arg

<210> 45
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL 5F9.2-GL

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 46
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL 5F9.3-GL

<400> 46

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

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

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

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

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

65 70 75 80

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

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

Arg

<210> 47
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH h5F9.1

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 48
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH h5F9.2

<400> 48

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

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

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

Gly Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 49
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH h5F9.3

<400> 49

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 50
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH h5F9.4

<400> 50

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

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

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

35 40 45

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 51
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL h5F9.19

<400> 51

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

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 52
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL h5F9.20

<400> 52

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser

20 25 30

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

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

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

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

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

Arg

<210> 53
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL h5F9.21

<400> 53

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

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 54
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL h5F9.22

<400> 54

Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
5 20 25 30

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

10

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

15

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

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

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
25 100 105 110

Arg

30

<210> 55
<211> 121
<212> PRT
35 <213> Artificial

<220>
<223> VH 8D1

40 <400> 55

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Asn Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 56
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL 8D1

<400> 56

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

Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 57
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH 5F9 CDR H1

<400> 57

Asn Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 58
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH 5F9 CDR-H2

<400> 58

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

Gly

<210> 59
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH 5F9 CDR-H3

<400> 59

Gly Thr Thr Pro Asp Tyr
1 5

<210> 60
<211> 16
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> VL 5F9 CDR-L1

<400> 60

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

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL 5F9 CDR-L2

<400> 61

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL 5F9 CDR-L3

<400> 62

Phe Gln Ala Thr His Asp Pro Leu Thr
1 5

<210> 63

<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH 8D1 CDR-H1

<400> 63

Ser Tyr Val Met His
1 5

<210> 64
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH 8D1 CDR-H2

<400> 64

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

Gly

<210> 65
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH 8D1 CDR-H3

<400> 65

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

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

<220>
<223> VL 8D1 CDR-L1

<400> 66

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL 8D1 CDR-L2

<400> 67

Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL 8D1 CDR-L3

<400> 68

Leu Gln Gly Tyr Ile Pro Pro Arg Thr
1 5

5

000343

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión CARACTERIZADA PORQUE se disocia de RGM A humana (hRGM A) con una K_D de 1 x 10^{-7} M o menos, y una constante k_{off} de 1 x 10^{-2} s^{-1} o menos, ambas determinadas por resonancia de plasmón superficial.

2. Una proteína de unión CARACTERIZADA PORQUE se une a RGM A humana y neutraliza la actividad de inhibición del desarrollo de las neuritas de RGM A humana, lo cual puede determinarse con un ensayo in vitro convencional.

3. La proteína de unión de una de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE tiene al menos una de las siguientes características funcionales adicionales:
unión a RGM A de rata,
unión a RGM C humana, y
unión a RGM C de rata.

4. La proteína de unión de una de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión modula la capacidad de RGM A unirse a al menos uno de sus receptores.

5. La proteína de unión de la reivindicación 4, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión interactúa con el dominio de unión al receptor de RGM A humana.

6. La proteína de unión de la reivindicación 4, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión modula al menos una de las siguientes interacciones:
unión de RGM humana A a BMP-4 humana,
unión de hRGM A a la neogenina humana,
unión de hRGM C a la neogenina humana,
unión de RGM A humana a BMP-2 humana.

7. Una proteína de unión de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE es un anticuerpo humanizado.

8. Una proteína de unión de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE comprende un dominio de unión a antígeno, donde dicha proteína de unión es capaz de unirse a un epitope de una molécula RGM, donde dicho dominio de unión a antígeno comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

GTTPDY	(SEQ ID Nº 59),
FQATHDPLT	(SEQ ID Nº 62),
ARRNEYYGSSFFDY	(SEQ ID Nº 65),
LQGYIPPRT	(SEQ ID Nº 68), y

secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50% con una de dichas secuencias

9. Una proteína de unión CARACTERIZADA PORQUE comprende un dominio de unión a antígeno, donde dicha proteína de unión es capaz de unirse a un epitope de una molécula RGM, donde dicho dominio de unión a antígeno comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

GTTPDY	(SEQ ID Nº 59),
FQATHDPLT	(SEQ ID Nº 62),
ARRNEYYGSSFFDY	(SEQ ID Nº 65),
LQGYIPPRT	(SEQ ID Nº 68), y

secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50% con una de dichas secuencias.

10. Una proteína de unión de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE comprende además al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 57, 58, 60, 61, 63, 64, 66, 67, y secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50% con una de dichas secuencias.

11. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE dicha al menos una CDR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

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

12. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 11, CARACTERIZADA PORQUE comprende al menos 3 CDR que se seleccionan entre un conjunto de CDR de dominios variables que consiste en

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

o un conjunto de dominios variables donde al menos una de dichas 3 CDR es una secuencia de aminoácidos de una CDR modificada que tiene una identidad de secuencia de al menos 50% con la secuencia progenitora.

13. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 12, CARACTERIZADA PORQUE comprende al menos dos conjuntos de CDR de dominios variables.

14. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 13, CARACTERIZADA PORQUE dichos al menos dos conjuntos de CDR de dominios variables se seleccionan del grupo que consiste en

Conjunto VH 5F9 y Conjunto VL 5F9; y

Conjunto VH 8D1 y Conjunto VL 8D1.

15. La proteína de unión de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE comprende además un marco aceptor humano.

16. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 15, CARACTERIZADA PORQUE dicho marco aceptor humano comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 y 33.

17. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 16, CARACTERIZADA PORQUE comprende un conjunto de secuencias de marco seleccionado del grupo que consiste en los siguientes conjuntos:

Conjunto VH3-48 (SEQ ID Nº 15, 16 y 17)

Conjunto VH3-33 (SEQ ID Nº 21, 22 y 23)

Conjunto VH3-23 (SEQ ID Nº 24, 25 y 26),

cada uno de los cuales está combinado con otra secuencia de marco seleccionada entre

JH3 (SEQ ID Nº 18),
JH4 (SEQ ID Nº 19),
JH6 (SEQ ID Nº 20);

o

seleccionado del grupo que consiste en los siguientes conjuntos:
Conjunto A18: (SEQ ID Nº 27, 28 y 29)
Conjunto A17: (SEQ ID Nº 31, 32 y 33),
cada uno de los cuales está combinado con otra secuencia de marco seleccionada entre JK2 (SEQ ID Nº 2).

18. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE comprende al menos un dominio variable de la cadena pesada seleccionado entre SEQ ID Nº 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 y 43, y/o al menos un dominio variable de la cadena liviana seleccionado entre SEQ ID Nº 44, 45 y 46.

19. La proteína de unión de la reivindicación 18, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión comprende dos dominios variables, donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos que se seleccionan entre
SEQ ID Nº 35 y 44, 36 y 44, 37 y 44, 38 y 44, 39 y 44, 40 y 44, 41 y 44, 42 y 44, 43 y 44;
SEQ ID Nº 35 y 45, 36 y 45, 37 y 45, 38 y 45, 39 y 45, 40 y 45, 41 y 45, 42 y 45, 43 y 45;
SEQ ID Nº 35 y 46, 36 y 46, 37 y 46, 38 y 46, 39 y 46, 40 y 46, 41 y 46, 42 y 46, 43 y 46.

20. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, CARACTERIZADA PORQUE dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido clave en dicha región del marco, donde dicho residuo clave se selecciona del grupo que consiste en
un residuo adyacente a una CDR;
un residuo de un sitio de glicosilación;
un residuo raro;
un residuo capaz de interactuar con un epitope de RGM;
un residuo capaz de interactuar con una CDR;
un residuo canónico;
un residuo de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena liviana;
un residuo en una zona Vernier;
un residuo en el extremo N capaz de formar paraglutamato, y
un residuo en una región de superposición entre una cadena pesada variable CDR1, tal como la define Chotia, y el primer marco de una cadena pesada, tal como la define Kabat.

21. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 20, CARACTERIZADA PORQUE dicho residuo clave se selecciona del grupo que consiste en
(posición de la secuencia de la cadena pesada): 1, 5, 37, 48, 49, 88, 98;
(posición de la secuencia de la cadena liviana): 2, 4, 41, 51.

22. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE la proteína de unión es un dominio variable consenso humano.

23. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, CARACTERIZADA PORQUE dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácidos en la región del marco, donde la secuencia de aminoácidos del marco es al menos 65% idéntica a secuencia de dicho marco aceptor humano, y comprende al menos 70 residuos de aminoácidos idénticos a dicho marco aceptor humano.

24. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión comprende al menos un dominio variable (marco mutado) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en
SEQ ID Nº 47, 48, 49, 50;
SEQ ID Nº 51, 52, 53 y 54.

25. La proteína de unión de la reivindicación 24, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión comprende dos dominios variables, donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas de los grupos que consisten en
SEQ ID Nº 47 y 44, 47 y 45, 47 y 46, 47 y 51, 47 y 52, 47 y 53, 47 y 54;
SEQ ID Nº 48 y 44, 48 y 45, 48 y 46, 48 y 51, 48 y 52, 48 y 53, 48 y 54;
SEQ ID Nº 49 y 44, 49 y 45, 49 y 46, 49 y 51, 49 y 52, 49 y 53, 49 y 54;
SEQ ID Nº 50 y 44, 50 y 45, 50 y 46, 50 y 51, 50 y 52, 50 y 53, 50 y 54.

26. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión es capaz de unirse a un blanco seleccionado entre moléculas RGM.

27. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE es capaz de unirse a RGM A humana.

28. La proteína de unión de la reivindicación 27, CARACTERIZADA PORQUE tiene al menos una de las siguientes características funcionales adicionales:
unión a RGM A de rata,
unión a RGM C humana,
unión a RGM C de rata.

29. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE la proteína de unión es capaz de modular una función biológica de un blanco seleccionado entre moléculas RGM.

30. La proteína de unión de la reivindicación 29, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión modula la capacidad de RGM de unirse a al menos uno de sus receptores.

31. La proteína de unión de la reivindicación 30, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión modula al menos una de las siguientes interacciones:
unión de RGM humana A a BMP-4 humana,
unión de hRGM A a la neogenina humana,
unión de hRGM C a la neogenina humana,
unión de RGM A humana a BMP-2 humana.

32. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión es capaz de inhibir una actividad biológica de RGM.

33. La proteína de unión de la reivindicación 32, CARACTERIZADA PORQUE la molécula RGM es RGM A.

34. La proteína de unión de la reivindicación 33, CARACTERIZADA PORQUE la RGM A se selecciona entre RGM A humana, de mono macaco, rata, pollo, anfibio y pez.

35. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión tiene una constante de activación (k_{on}) con relación a dicho blanco seleccionada del grupo que consiste en al menos aproximadamente 10^2 $M^{-1}s^{-1}$, al menos aproximadamente 10^3 $M^{-1}s^{-1}$, al menos aproximadamente 10^4 $M^{-1}s^{-1}$, al menos aproximadamente 10^5 $M^{-1}s^{-1}$, al menos aproximadamente 10^6 $M^{-1}s^{-1}$, y al menos aproximadamente 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, medida por resonancia de plasmón superficial.

36. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión tiene una constante de desactivación (k_{off}) con relación a dicho blanco seleccionada del grupo que consiste en a lo sumo aproximadamente 10^{-2} s^{-1}, a lo sumo aproximadamente 10^{-3} s^{-1}, a lo sumo aproximadamente 10^{-4} s^{-1}, a lo sumo aproximadamente 10^{-5} s^{-1}, y a lo sumo aproximadamente 10^{-6} s^{-1}, medida por resonancia de plasmón superficial.

37. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión tiene una constante de disociación (K_D) con relación a dicho blanco seleccionada del grupo que consiste en a lo sumo aproximadamente 10^{-7} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-8} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-9} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-10} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-11} M, a lo sumo aproximadamente 10^{-12} M, y a lo sumo 10^{-13} M.

38. Una construcción de anticuerpos CARACTERIZADA PORQUE comprende una proteína de unión descripta en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha construcción de anticuerpos comprende además un polipéptido conector o un dominio constante de inmunoglobulina.

39. La construcción de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 38, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión se selecciona del grupo que consiste en

una molécula de inmunoglobulina,
un anticuerpo monoclonal,
un anticuerpo quimérico,
un anticuerpo con un injerto de CDR,
un anticuerpo humanizado,
un Fab,
un Fab',
un F(ab')2,
un Fv,
un Fv con enlaces disulfuro,
un scFv,
un anticuerpo de un solo dominio,
un diacuerpo,
un anticuerpo multiespecífico,
un anticuerpo con especificidad doble,
una inmunoglobulina con dos dominios variables, y
un anticuerpo biespecífico.

40. La construcción de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38 y 39, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión comprende un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en

un dominio constante de la IgM humana,
un dominio constante de la IgG1 humana,
un dominio constante de la IgG2 humana,
un dominio constante de la IgG3 humana,
un dominio constante de la IgG4 humana,
un dominio constante de la IgGE humana,
un dominio constante de la IgGD humana,
un dominio constante de la IgGA1 humana,
un dominio constante de la IgGA2 humana,
un dominio constante de la IgGY humana, y
los dominios constantes mutados correspondientes.

41. La construcción de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38 a 40, CARACTERIZADA PORQUE comprende un dominio constante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº 11, 12, 13 y 14

42. Un conjugado de anticuerpos CARACTERIZADO PORQUE comprende una construcción de anticuerpos descripta en cualquiera de las reivindicaciones 38 a 41, donde dicho conjugado de anticuerpos comprende además un agente seleccionado del grupo que consiste en una molécula de inmunoadhesión, un agente para el diagnóstico por imágenes, un agente terapéutico y un agente citotóxico.

43. El conjugado de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 42, CARACTERIZADO PORQUE dicho agente es un agente para el diagnóstico por imágenes seleccionado del grupo que consiste en una radiomarca, una enzima, una marca fluorescente, una marca luminiscente, una marca bioluminiscente, una marca magnética, y biotina.

44. El conjugado de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 43, CARACTERIZADO PORQUE dicho agente para el diagnóstico por imágenes es una radiomarca seleccionada del grupo que consiste en ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho y ^{153}Sm.

45. El conjugado de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 43, CARACTERIZADO PORQUE dicho agente es un agente terapéutico o citotóxico seleccionado del grupo que consiste en un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente antiangiogénico, un agente antimitótico, una antraciclina, una toxina y un agente apoptótico.

46. La construcción de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38 a 41, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión posee un patrón de glicosilación humano.

47. El conjugado de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 42 a 45, CARACTERIZADO PORQUE dicha proteína de unión posee un patrón de glicosilación humano.

48. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión existe como un cristal.

49. La construcción de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38 a 41, CARACTERIZADA PORQUE dicha construcción de anticuerpos existe como un cristal.

50. El conjugado de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 42 a 45, CARACTERIZADO PORQUE dicha construcción de anticuerpos existe como un cristal.

51. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 48, CARACTERIZADA PORQUE dicho cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada libre de vehículo.

52. La construcción de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 49, CARACTERIZADA PORQUE dicho cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada libre de vehículo.

53. El conjugado de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 50, CARACTERIZADO PORQUE dicho cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada libre de vehículo.

54. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 48, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión tiene una vida media in vivo más prolongada que la contraparte soluble de dicha proteína de unión.

55. La construcción de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 49, CARACTERIZADA PORQUE dicha construcción de anticuerpos tiene una vida media in vivo más prolongada que la contraparte soluble de dicha construcción de anticuerpos.

56. El conjugado de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 50, CARACTERIZADO PORQUE dicho conjugado de anticuerpos tiene una vida media in vivo más prolongada que la contraparte soluble de dicho conjugado de anticuerpos.

57. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 48, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión retiene su actividad biológica.

58. La construcción de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 49, CARACTERIZADA PORQUE dicha construcción de anticuerpos retiene su actividad biológica.

59. El conjugado de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 50, CARACTERIZADO PORQUE dicho conjugado de anticuerpos retiene su actividad biológica.

60. Un ácido nucleico aislado CARACTERIZADO PORQUE codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1-37.

61. Un ácido nucleico aislado CARACTERIZADO PORQUE codifica una secuencia de aminoácidos de una construcción de anticuerpos de cualquiera de las reivindicaciones 38-41.

62. Un ácido nucleico aislado CARACTERIZADO PORQUE codifica una secuencia de aminoácidos de un conjugado de anticuerpos de cualquiera de las reivindicaciones 42-45.

63. Un vector CARACTERIZADO PORQUE comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 60 a 62.

64. El vector de la reivindicación 63, CARACTERIZADO PORQUE dicho vector se selecciona del grupo que consiste en pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pHibE y pBJ.

65. Una célula huésped CARACTERIZADA PORQUE comprende un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 63 y 64.

66. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 65, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula huésped es una célula procariota.

67. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 66, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula huésped es *E. coli*.

68. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 67, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula huésped es una célula eucariota.

69. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 68, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula eucariota se selecciona del grupo que consiste en una célula protista, una célula animal, una célula vegetal y una célula fúngica.

70. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 69, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula eucariota es una célula animal seleccionada del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula de ave y una célula de insecto.

71. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 69, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula huésped se selecciona entre células HEK, células CHO, células COS y células de levadura.

72. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 71, CARACTERIZADA PORQUE dicha levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

73. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 70, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula huésped es una célula de insecto Sf9.

74. Un método para producir una proteína capaz de unirse a RGM, CARACTERIZADO PORQUE comprende cultivar una célula huésped de cualquiera de las reivindicaciones 65 a 73 en un medio de cultivo, bajo condiciones apropiadas para producir una proteína de unión capaz de unirse a RGM.

75. Una proteína CARACTERIZADA PORQUE ha sido producida de acuerdo con el método de la reivindicación 74.

76. Una composición para la liberación de una proteína de unión, CARACTERIZADA PORQUE dicha composición comprende

(a) una formulación, donde dicha formulación comprende un producto proteico cristalizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 48 a 50, y un ingrediente; y

(b) al menos un vehículo polimérico.

77. La composición de acuerdo con la reivindicación 76, CARACTERIZADA PORQUE dicho vehículo polimérico es un polímero seleccionado entre uno o más del grupo que consiste en poli (ácido acrílico), poli (cianoacrilatos), poli (aminoácidos), poli (anhídridos), poli (depsipéptido), poli (ésteres), poli (ácido láctico), poli (ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli (b-hidroxibutriato), poli (caprolactona), poli (dioxanona), poli (etilenglicol), poli ((hidroxipropil) metacrilamida, poli [(órgano) fosfazeno], poli (orto ésteres), poli (alcohol vinílico), poli (vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico y alquil vinil éter, polioles pluronic, albúmina, alginatos, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, y mezclas y copolímeros de los anteriores.

78. La composición de acuerdo con la reivindicación 76, CARACTERIZADA PORQUE dicho ingrediente se selecciona del grupo que consiste en albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil-□-ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilegnlicol.

79. Un método para tratar un mamífero CARACTERIZADO PORQUE comprende el paso de administrarle al mamífero una cantidad eficaz de la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 77 y 78.

80. Una composición farmacéutica CARACTERIZADA PORQUE comprende el producto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 59 y un vehículo aceptable para el uso farmacéutico.

81. La composición farmacéutica de la reivindicación 80, CARACTERIZADA PORQUE dicho vehículo aceptable para el uso farmacéutico funciona como un coadyuvante útil para incrementar la absorción o la dispersión de dicha proteína de unión.

82. La composición farmacéutica de la reivindicación 81, CARACTERIZADA PORQUE dicho coadyuvante es hialuronidasa.

83. La composición farmacéutica de la reivindicación 82, CARACTERIZADA PORQUE comprende además al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno donde la actividad de RGM es perjudicial.

84. La composición farmacéutica de la reivindicación 83, CARACTERIZADA PORQUE dicho agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en un agente terapéutico, un agente para el diagnóstico por imágenes, un agente citotóxico, un inhibidor de la angiogénesis, un inhibidor de quinasa, un bloqueador de una molécula de co-estimulación, un bloqueador de una molécula de adhesión, un anticuerpo anti-citoquina o un fragmento funcional de éste, metotrexato, ciclosporina, rapamicina, FK506, una marca o una señal detectable, un antagonista del TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, una droga antiinflamatoria no esteroidal (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un agente antimicrobiano, un antipsoriático, un corticosteriode, un anabólico esteroidal, una eritropoyetina, un agente de inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, una droga para el reemplazo de una hormona, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalable, una epinefrina o un análogo, una citoquina, y un antagonista de citoquina.

85. Un método para reducir la actividad de la RGM A humana CARACTERIZADO PORQUE comprende poner en contacto RGM A humana con el producto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 59, con el fin de reducir dicha actividad de RGM A humana.

86. Un método para disminuir la unión de hRGM A a su receptor, la neogenina, en un sujeto que lo necesita, CARACTERIZADO PORQUE comprende el paso de administrarle al sujeto un producto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 59.

87. Un método para disminuir la unión de hRGM A a la proteína morfogenética ósea 2 y la proteína morfogenética ósea 4 (BMP-2 y BMP-4) en un sujeto que lo necesita, CARACTERIZADO PORQUE comprende el paso de administrarle al sujeto un producto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51.

88. Un método para tratar un sujeto afectado por un trastorno asociado con la actividad de RGM A, CARACTERIZADO PORQUE comprende el paso un producto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 59, solo o en combinación con otros agentes terapéuticos.

89. Un método para reducir la actividad de RGM A en un sujeto afectado por un trastorno donde la actividad de RGM A es perjudicial, CARACTERIZADO PORQUE comprende administrarle al sujeto un producto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 59, solo o en combinación con otros agentes terapéuticos.

90. El método de la reivindicación 89, CARACTERIZADO PORQUE el trastorno comprende enfermedades neurológicas seleccionadas del grupo que comprende la esclerosis lateral amiotrófica, la lesión del plexo braquial, la lesión cerebral, incluyendo la lesión cerebral traumática, la parálisis cerebral, el síndrome de Guillain Barre, la leucodistrofia, la esclerosis múltiple, el síndrome posterior a la poliomielitis, la espina bífida, las lesiones en la médula espinal, la atrofia muscular espinal, los tumores espinales, el accidente cerebrovascular, la mielitis transversal, la demencia, la demencia senil, la alteración cognitiva leve, la demencia relacionada con la enfermedad de Alzheimer, la corea de Huntington, la disquinesia tardía, la hiperquinesia, la manía, el morbo de Parkinson, el síndrome de Steel-Richard, el síndrome de Down, la miastenia grave, el traumatismo nervioso, la amiloidosis vascular, la hemorragia cerebral con amiloidosis, la inflamación cerebral, el trastorno de confusión aguda, la esclerosis lateral amiotrófica, el glaucoma y la enfermedad de Alzheimer.

91. Una CDR aislada de una proteína de unión CARACTERIZADA PORQUE es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51.

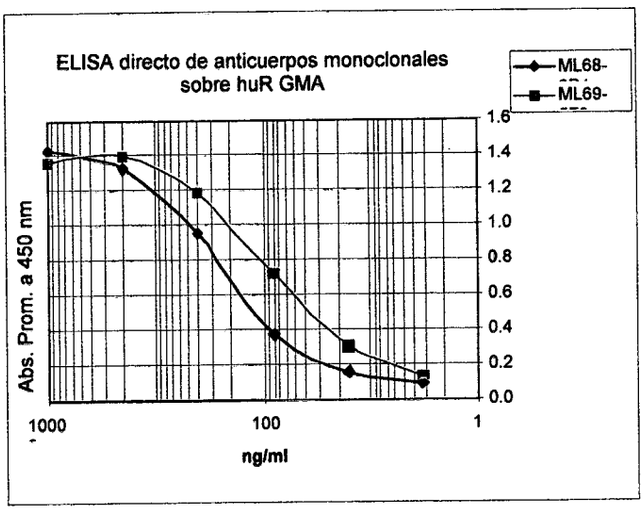
ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROTEÍNA RGM A Y SUS USOS

RESUMEN

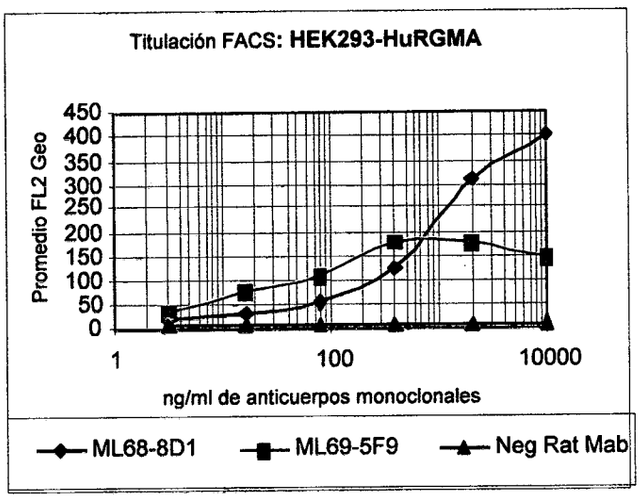
Proteínas aisladas, particularmente anticuerpos monoclonales, que se unen y neutralizan la proteína RGM A. Específicamente, estos anticuerpos tienen la capacidad de inhibir la unión de RGM A a su receptor y/o sus correceptores. Los anticuerpos de la invención, o sus porciones, son útiles para detectar RGM A e inhibir la actividad de RGM A, por ejemplo, en un ser humano afectado por un trastorno que incluye, no taxativamente, esclerosis múltiple, traumatismo cerebral en mamíferos, lesiones en la médula espinal, accidente cerebrovascular, enfermedades neurodegenerativas, y esquizofrenia.

000356

A



B



C

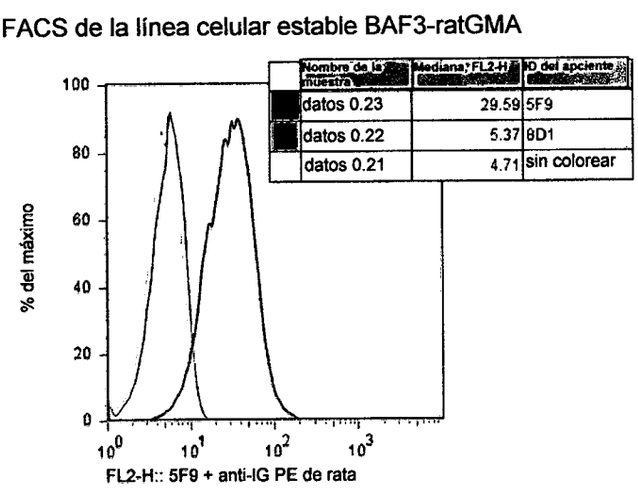


Fig. 1

000357

Inhibición de la unión de fl hRGM a neogenina

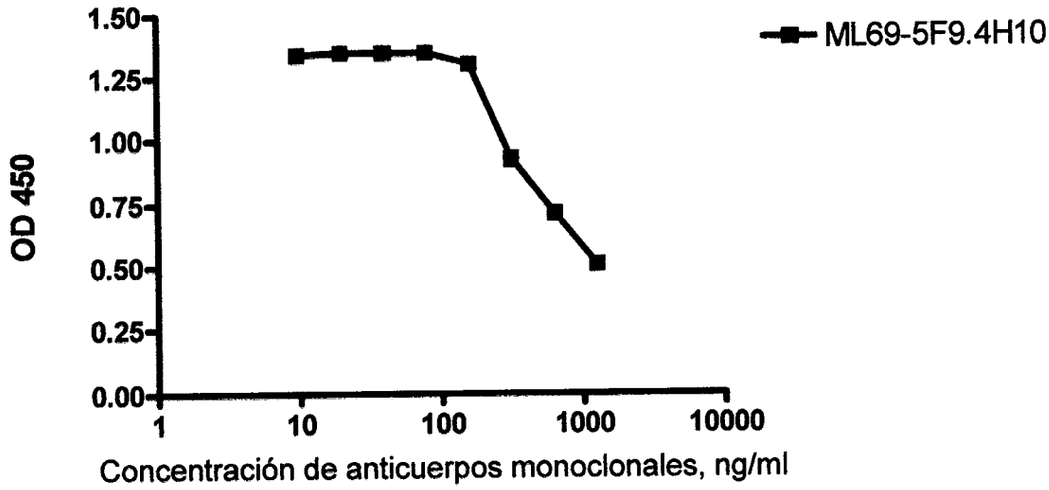


Fig. 2

Inhibición de la unión de fl hRGM a BMP-4

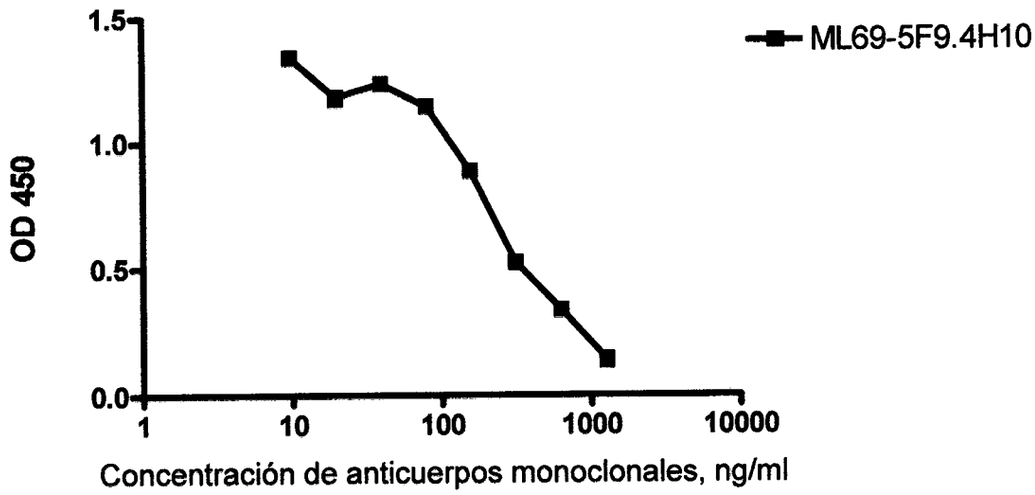


Fig. 3

000358

Inhibición de la unión del fragmento 0 a BMP-4 por el anticuerpo monoclonal 5F9

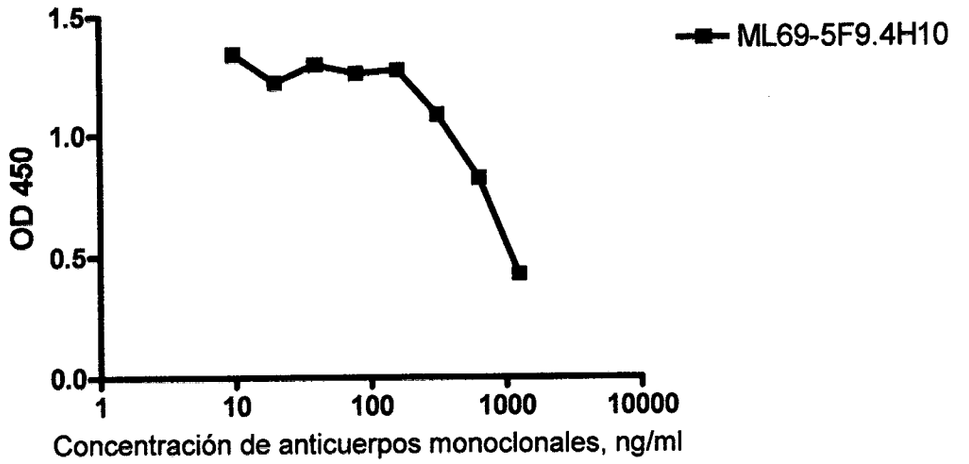


Fig. 4

Inhibición de la unión de hRGM completo conjugado con fc a BMP-2

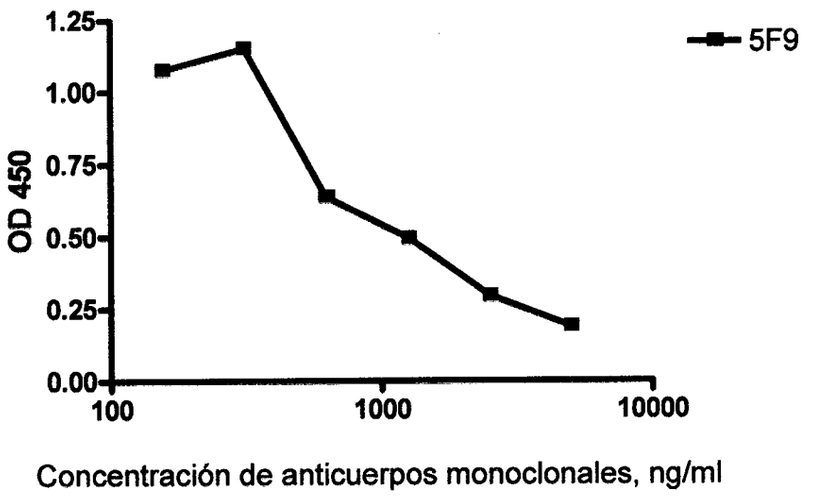


Fig. 5

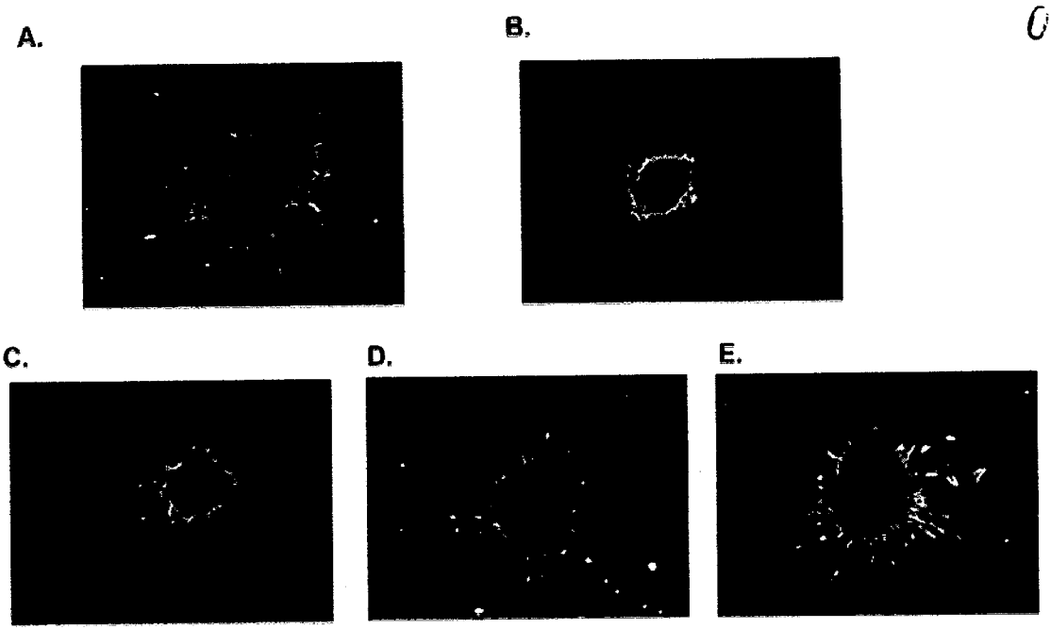

A.
B.
C.
D.
E.

Fig. 6

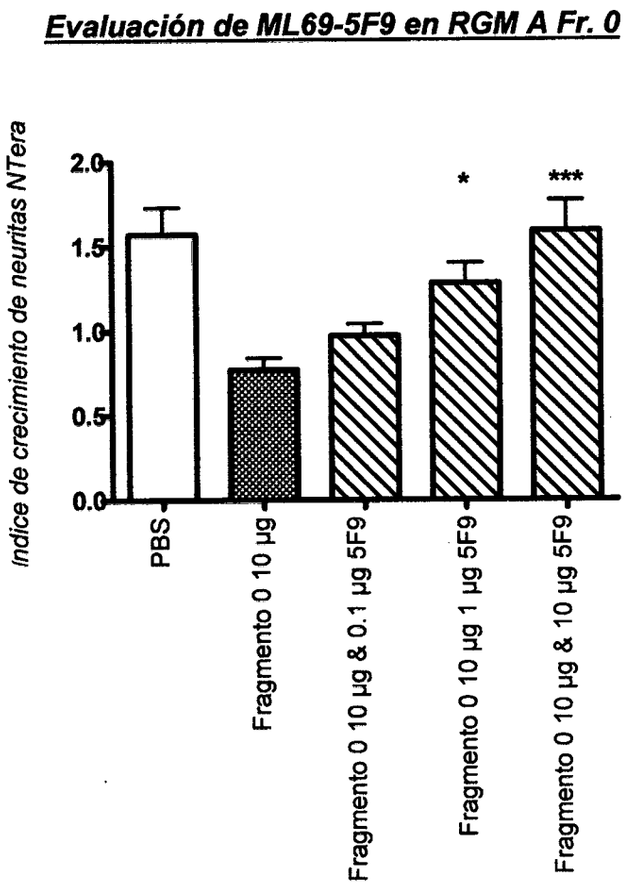

Evaluación de ML69-5F9 en RGM A Fr. 0
Indice de crecimiento de neuritas NTera
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
***
PBS
Fragmento 0 10 µg
Fragmento 0 10 µg & 0.1 µg 5F9
Fragmento 0 10 µg 1 µg 5F9
Fragmento 0 10 µg & 10 µg 5F9

Fig. 7

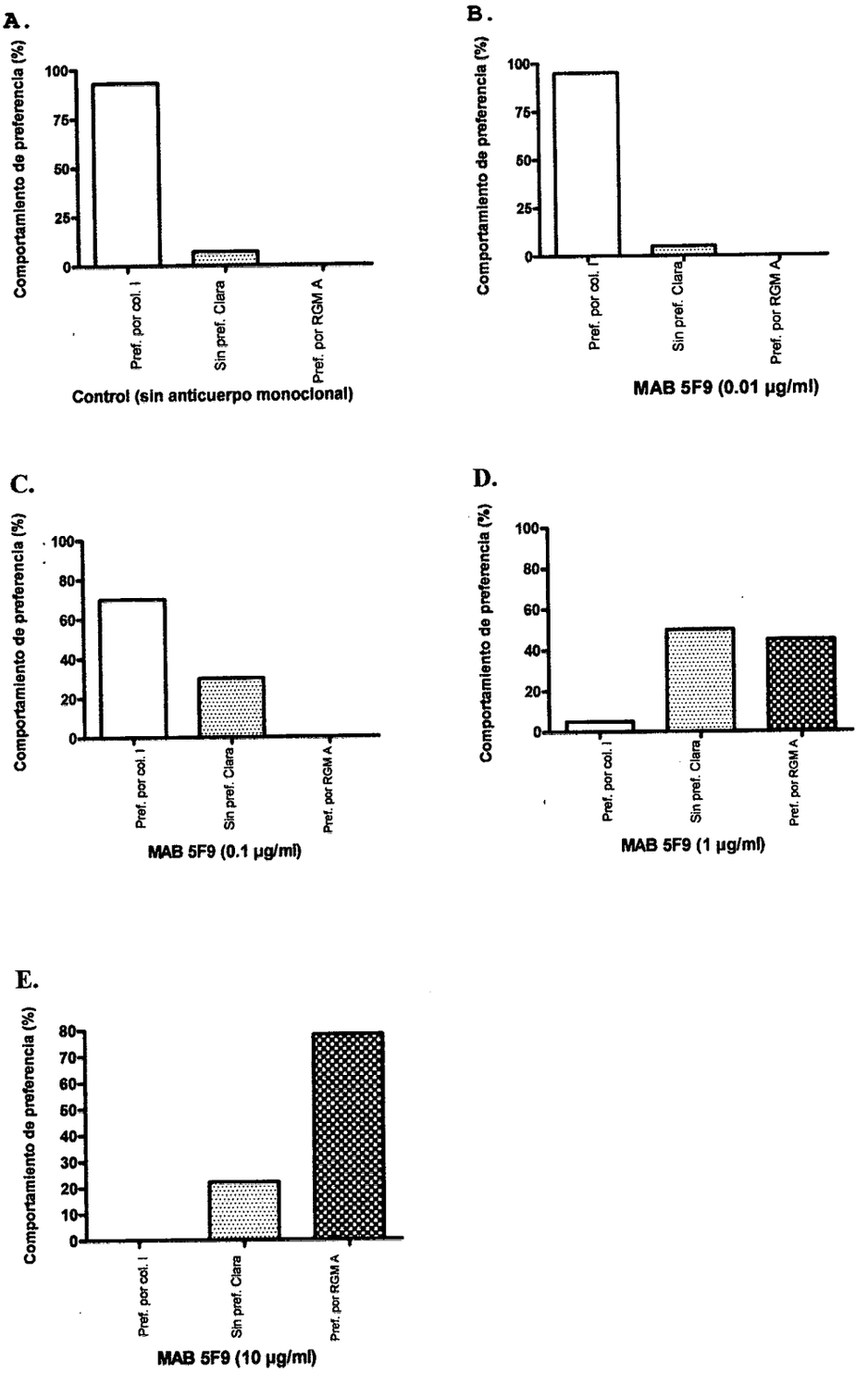

A.
Comportamiento de preferencia (%)
100
75
50
25
0
Pref. por col. I
Sin pref. Clara
Pref. por RGM A
Control (sin anticuerpo monoclonal)
B.
Comportamiento de preferencia (%)
100
75
50
25
0
Pref. por col. I
Sin pref. Clara
Pref. por RGM A
MAB 5F9 (0.01 µg/ml)
C.
Comportamiento de preferencia (%)
100
80
60
40
20
0
Pref. por col. I
Sin pref. Clara
Pref. por RGM A
MAB 5F9 (0.1 µg/ml)
D.
Comportamiento de preferencia (%)
100
80
60
40
20
0
Pref. por col. I
Sin pref. Clara
Pref. por RGM A
MAB 5F9 (1 µg/ml)
E.
Comportamiento de preferencia (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Pref. por col. I
Sin pref. Clara
Pref. por RGM A
MAB 5F9 (10 µg/ml)

Fig. 8

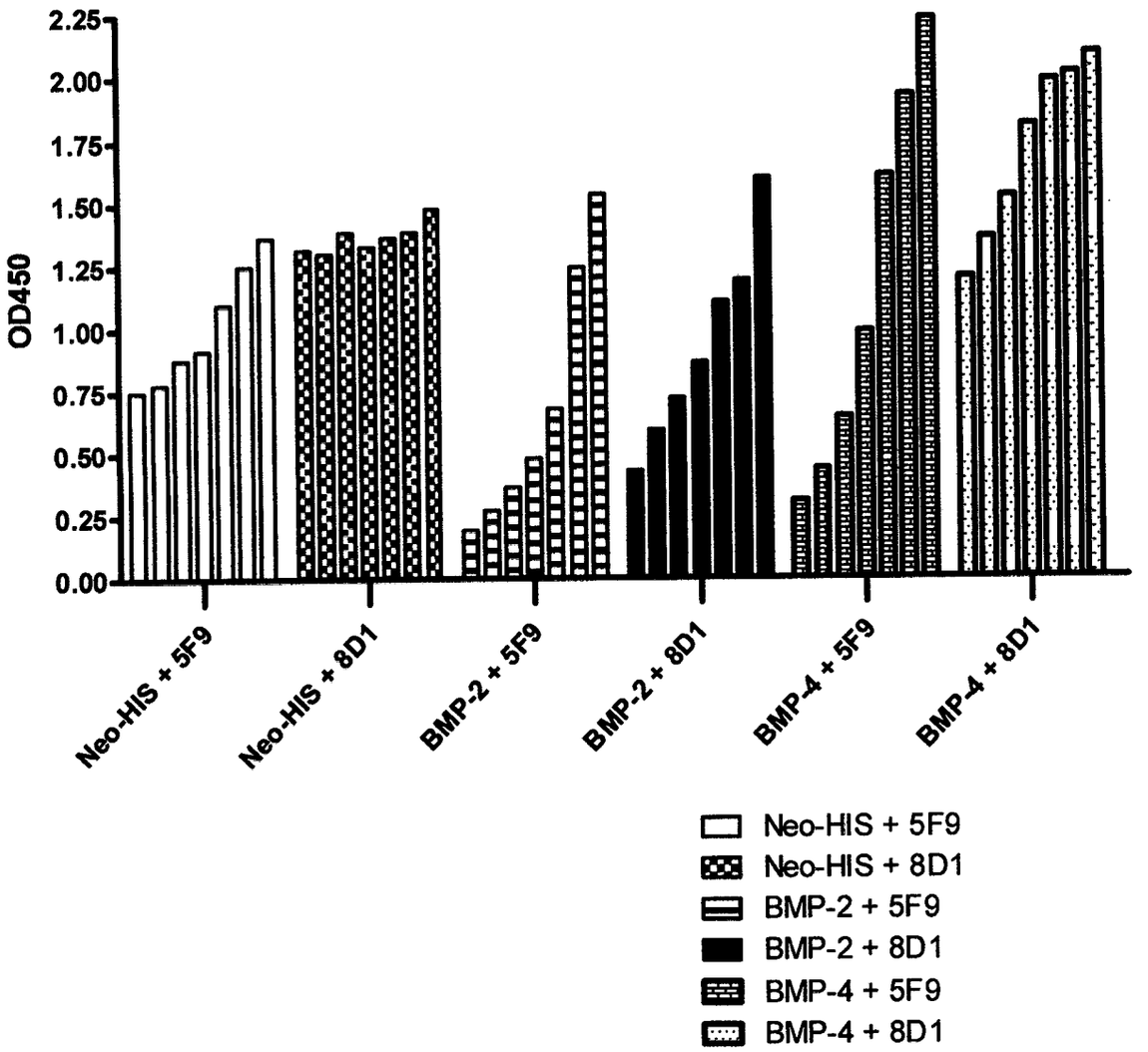
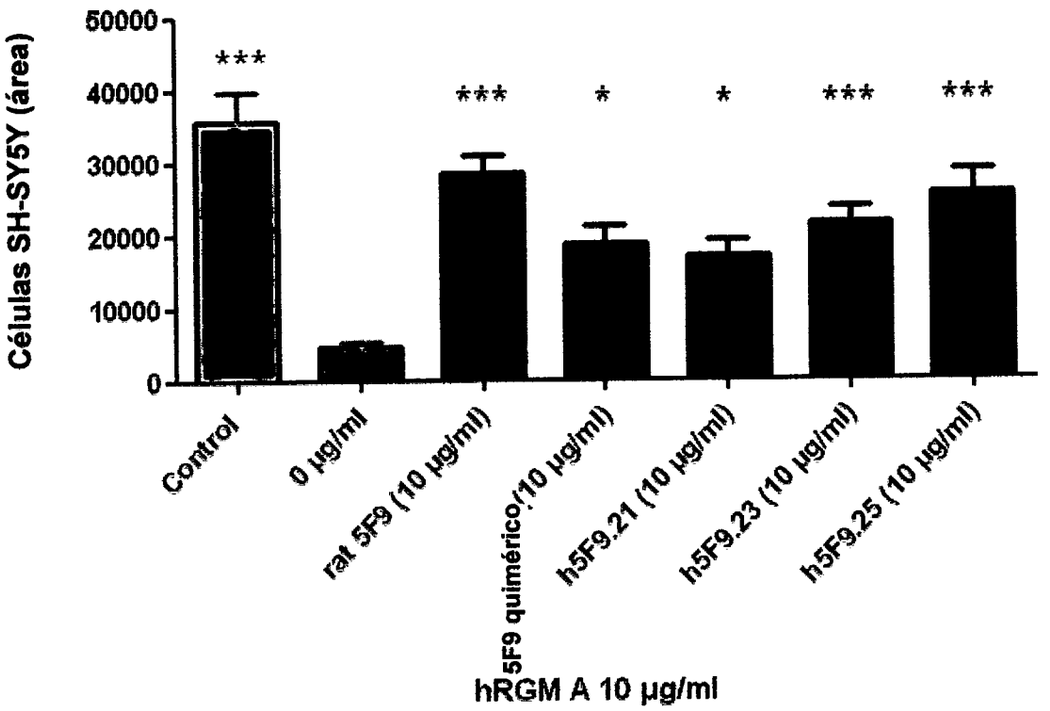

OD450
2.25
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Neo-HIS + 5F9
Neo-HIS + 8D1
BMP-2 + 5F9
BMP-2 + 8D1
BMP-4 + 5F9
BMP-4 + 8D1
Neo-HIS + 5F9
Neo-HIS + 8D1
BMP-2 + 5F9
BMP-2 + 8D1
BMP-4 + 5F9
BMP-4 + 8D1

Fig. 9

Ensayo de quimiotaxis (sin EGF): evaluación de 5F9 de rata humanizado, n = 2



* $p < 0.05$: significación versus 5F9 0 µg/ml

*** $p < 0.001$: significación versus 5F9 0 µg/ml

*** $p < 0.001$: significación versus 5F9 0 µg/ml

Fig. 10

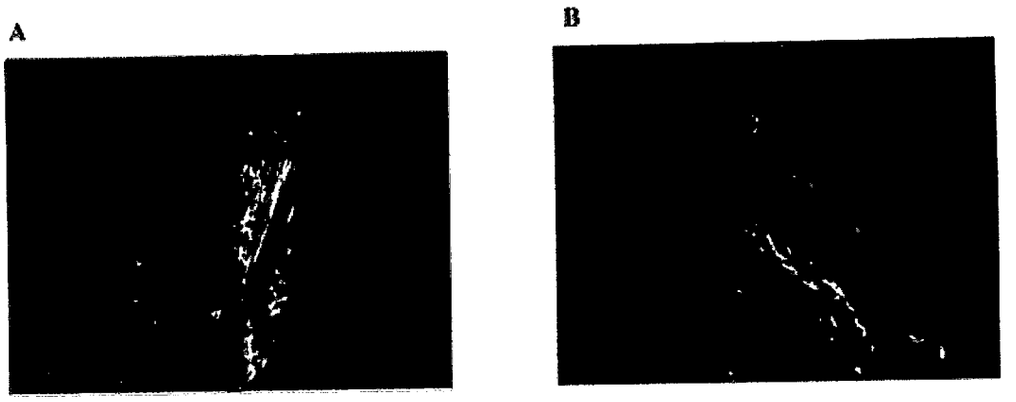
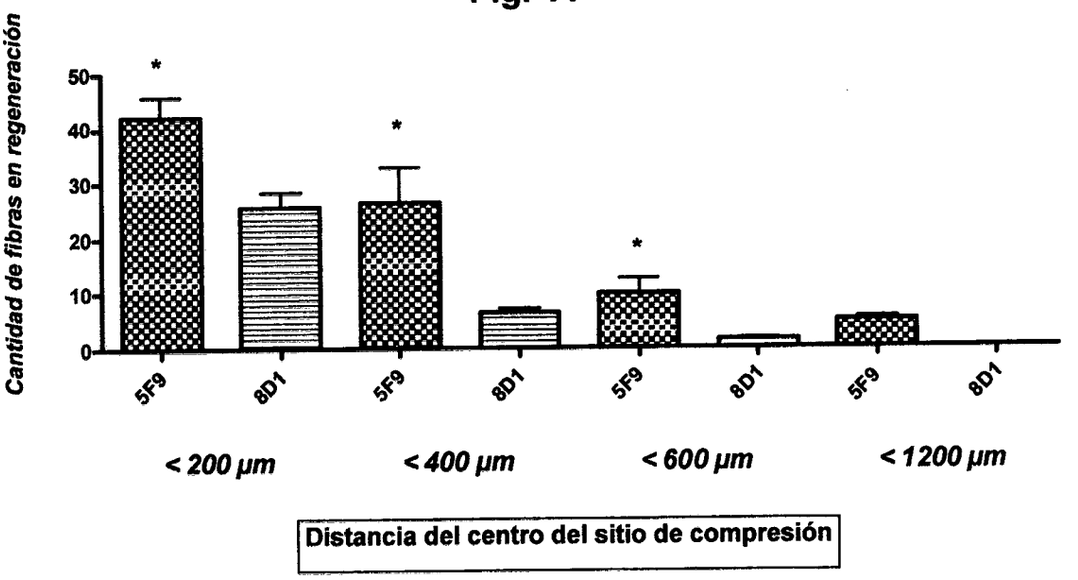

A
B

Fig. 11


Cantidad de fibras en regeneración
50
40
30
20
10
0
*
*
*
5F9
8D1
5F9
8D1
5F9
8D1
5F9
8D1
< 200 µm
< 400 µm
< 600 µm
< 1200 µm
Distancia del centro del sitio de compresión

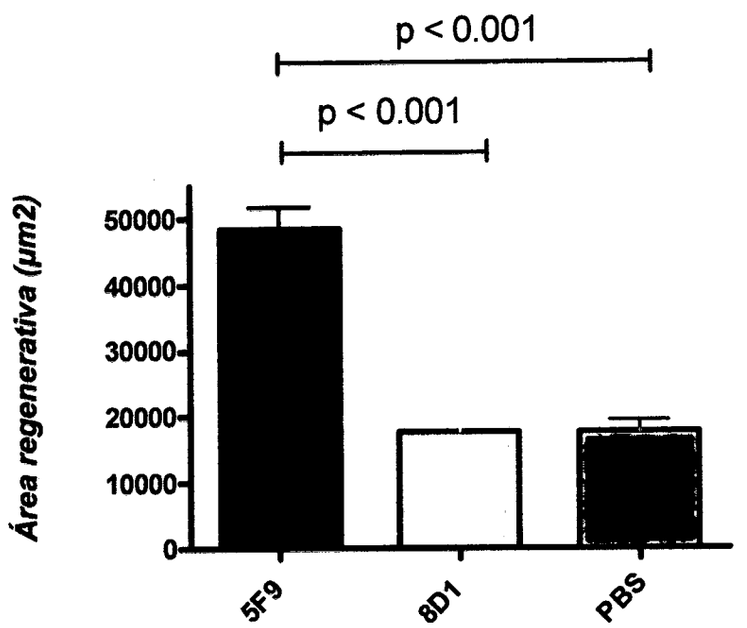

p < 0.001
p < 0.001
Área regenerativa (µm2)
50000
40000
30000
20000
10000
0
5F9
8D1
PBS

Fig. 12

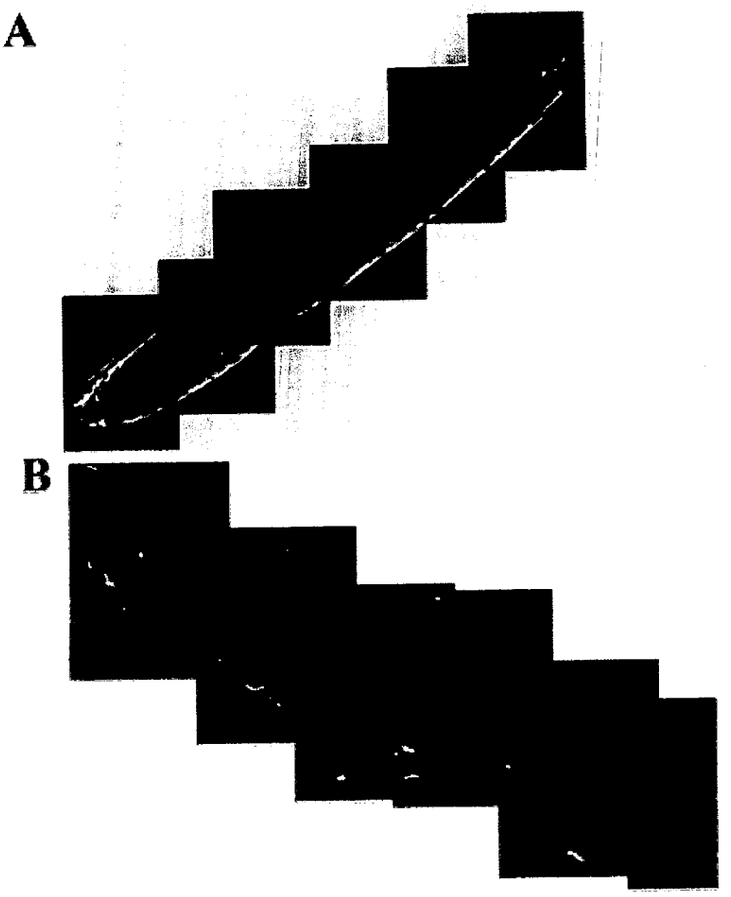


Fig. 13

000305

Tratamiento sistémico con 5F9 en el modelo del nervio óptico comprimido

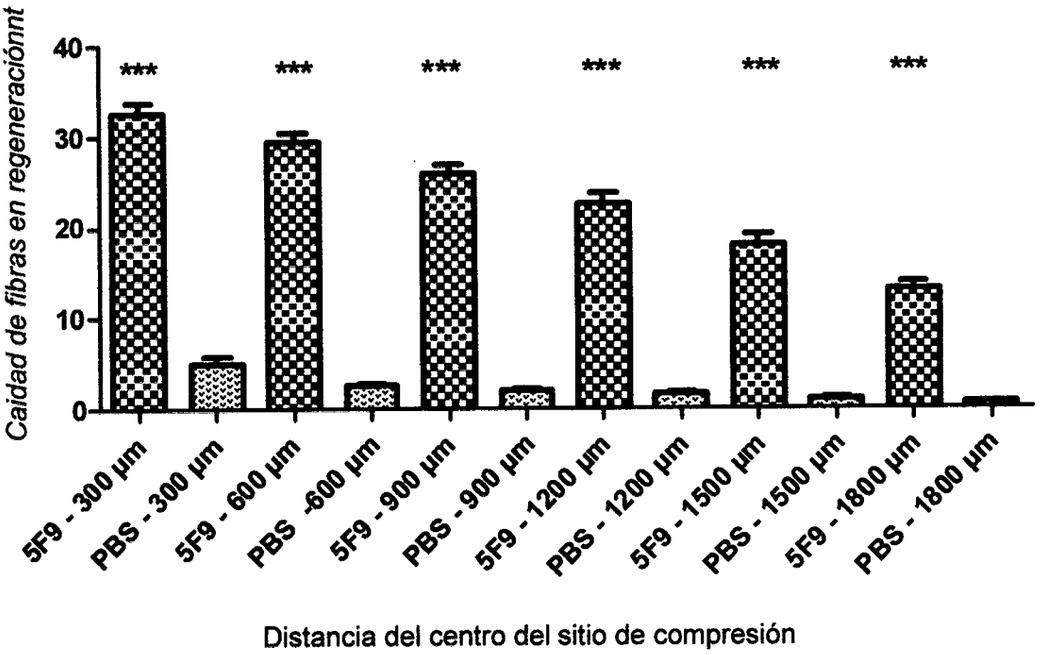


Fig. 14A

Tratamiento sistémico con 5F9 en el modelo del nervio óptico comprimido

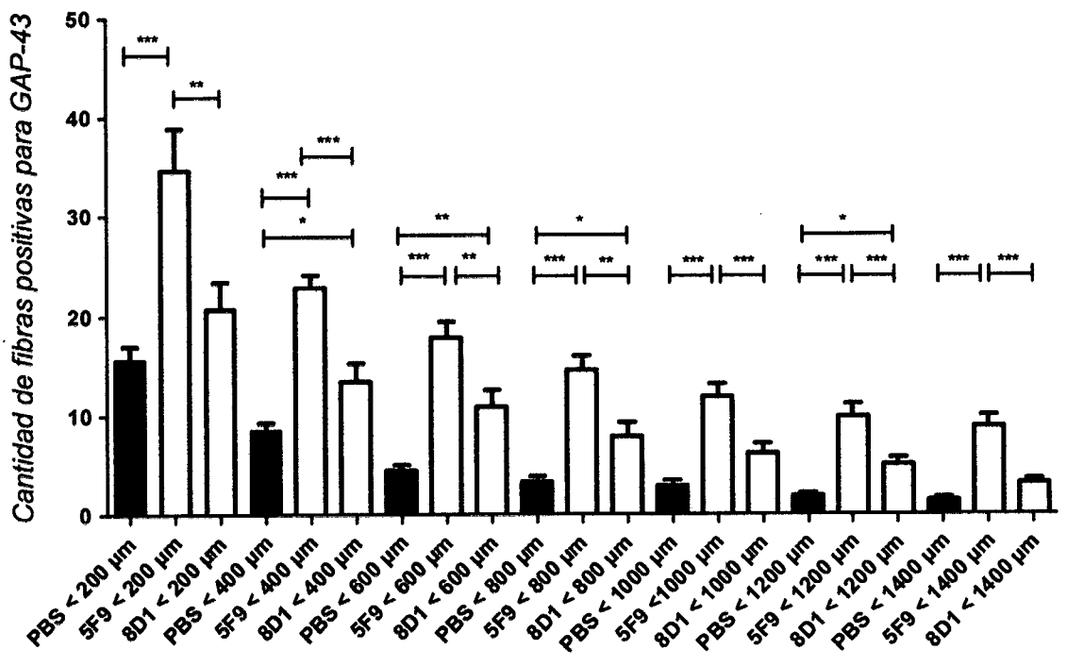


Fig. 14B

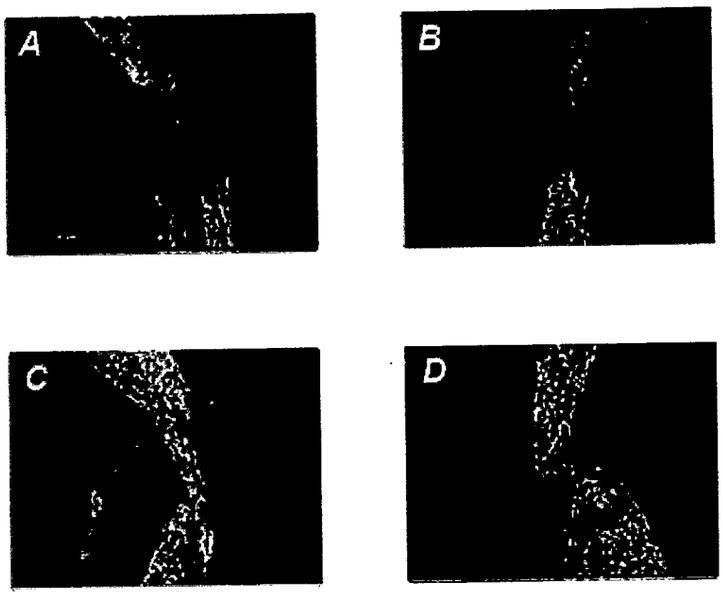

A
B
C
D

Fig. 15

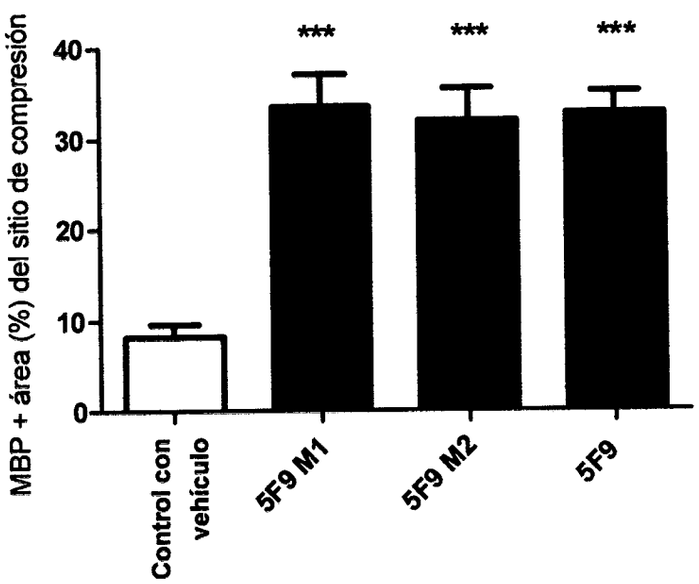

MBP + área (%) del sitio de compresión
40
30
20
10
0
***
***
***
Control con vehículo
5F9 M1
5F9 M2
5F9

Fig. 16

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

000307

PATENTE DE INVENCION ___ PCT __X__ MODELO DE UTILIDAD ___ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional :

(71)Solicitante(s) **ABBOTT GMBH & CO. KG y ABBOTT LABORATORIES**

(72) Inventor(es) **BERNHARD K. MÜLLER, MARTIN SCHMIDT, EVE H. BARLOW, MARY E. LEDDY, CHUNGMING HSIEH, PHILLIP D. BARDWELL**

(74) Apoderado: **DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	32)	Fecha	(33)	País
		61/032.707		29/02/2008		US
		61/090.743		21/08/2008		US

(85) Fecha inicio fase nacional:
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: **27/02/2009**
No. de solicitud **PCT/EP2009/001437**

(87) Publicación internacional
Fecha: **03/09/2009**
N° publicación: **WO 2009/106356 A1**

(54) Titulo: **ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROTEINA RGM A Y SUS USOS**

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES 000208
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud:

22) Fecha de solicitud:

(30) Prioridad (31) N° Prioridad 32) Fecha (33) País
61/032.707 29/02/2008 US
61/090.743 21/08/2008 US

(51) Int. Cl.:

(71)Solicitante(s) **ABBOTT GMBH & CO. KG**
ABBOTT LABORATORIES

(72) Inventor(es) **BERNHARD K. MÜLLER**
MARTIN SCHMIDT
EVE H. BARLOW
Y OTROS

(74) Apoderado: **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

(85) Fecha limite inicio fase nacional:
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: **27/02/2009**
N° de solicitud **PCT/EP2009/001437**

(87) Publicación internacional
Fecha: **03/09/2009**
N° publicación: **WO 2009/106356 A1**

(54) Titulo: **ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROTEINA RGM A Y SUS USOS**

Reivindicación(es):

1. Una proteína de unión CARACTERIZADA PORQUE se disocia de RGM A humana (hRGM A) con una K_D de 1 x 10^{-7} M o menos, y una constante k_{off} de 1 x 10^{-2} s^{-1} o menos, ambas determinadas por resonancia de plasmón superficial.
2. Una proteína de unión CARACTERIZADA PORQUE se une a RGM A humana y neutraliza la actividad de inhibición del desarrollo de las neuritas de RGM A humana, lo cual puede determinarse con un ensayo in vitro convencional.
3. La proteína de unión de una de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE tiene al menos una de las siguientes características funcionales adicionales:
unión a RGM A de rata,
unión a RGM C humana, y
unión a RGM C de rata.
4. La proteína de unión de una de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión modula la capacidad de RGM A unirse a al menos uno de sus receptores.
5. La proteína de unión de la reivindicación 4, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión interactúa con el dominio de unión al receptor de RGM A humana.
6. La proteína de unión de la reivindicación 4, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión modula al menos una de las siguientes interacciones:
unión de RGM humana A a BMP-4 humana,
unión de hRGM A a la neogenina humana,
unión de hRGM C a la neogenina humana,
unión de RGM A humana a BMP-2 humana.
7. Una proteína de unión de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE es un anticuerpo humanizado.
8. Una proteína de unión de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE comprende un dominio de unión a antígeno, donde dicha proteína de unión es capaz de unirse a un epitope de una molécula RGM, donde dicho dominio de unión a antigeno comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

GTTPDY	(SEQ ID N° 59),
FQATHDPLT	(SEQ ID N° 62),
ARRNEYYGSSFFDY	(SEQ ID N° 65),
LQGYIPPRT	(SEQ ID N° 68), y

secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50% con una de dichas secuencias
9. Una proteína de unión CARACTERIZADA PORQUE comprende un dominio de unión a antígeno, donde dicha proteína de unión es capaz de unirse a un epitope de una molécula RGM, donde dicho dominio de unión a antígeno comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

GTTPDY	(SEQ ID N° 59),
FQATHDPLT	(SEQ ID N° 62),
ARRNEYYGSSFFDY	(SEQ ID N° 65),
LQGYIPPRT	(SEQ ID N° 68), y

secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50% con una de dichas secuencias.
10. Una proteína de unión de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE comprende además al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 57, 58, 60, 61, 63, 64, 66, 67, y secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50% con una de dichas secuencias.
11. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE dicha al menos una CDR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

SEQ ID N° 57	Residuos 31-35 de SEQ ID N° 34
SEQ ID N° 58	Residuos 50-66 de SEQ ID N° 34
SEQ ID N° 59	Residuos 99-104 de SEQ ID N° 34
SEQ ID N° 60	Residuos 24-39 de SEQ ID N° 10
SEQ ID N° 61	Residuos 55-61 de SEQ ID N° 10
SEQ ID N° 62	Residuos 94-102 de SEQ ID N° 10
SEQ ID N° 63	Residuos 31-35 de SEQ ID N° 55
SEQ ID N° 64	Residuos 50-66 de SEQ ID N° 55
SEQ ID N° 65	Residuos 97-110 de SEQ ID N° 55
SEQ ID N° 66	Residuos 24-34 de SEQ ID N° 56
SEQ ID N° 67	Residuos 50-56 de SEQ ID N° 56
SEQ ID N° 68	Residuos 89-97 de SEQ ID N° 56.

...

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-117825- -00000-0000

Fecha: 2010-09-23 13:26:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 268

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

LISTA DE CHEQUEO
ADMISION A TRAMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION [ ] **MODELO DE UTILIDAD** [ ] **Art. 33 Decisión 486/00**

- [ ] Indicación que se solicita una patente
- [ ] Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- [ ] Descripción de la invención
- [ ] Dibujos de ser estos pertinentes
- [ ] Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa [ ] Incompleta [ ]

PATENTE DE INVENCION PCT [X] **MODELO DE UTILIDAD PCT** [ ] **Art. 33 Decisión 486/00 Circular Única**

- [X] Indicación que se solicita una PCT
- [X] Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- [X] Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- [ ] Dibujos de ser estos pertinentes
- [X] Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa [X] Incompleta [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ] **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- [ ] Indicación que se solicita diseño industrial
- [ ] Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- [ ] Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- [ ] Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa [ ] Incompleta [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ] **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- [ ] Indicación que se solicita un esquema de trazado
- [ ] Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- [ ] Representación gráfica de un esquema de trazado
- [ ] Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa [ ] Incompleta [ ]

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
Apoderado(a) y/o Representante de
ABBOTT LABORATORIES

REFERENCIA	Radicación No.	10 117825
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/001437
	Fecha inicio fase nacional	29/09/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	№ 13146

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado por la sociedad ABBOTT GMBH & CO. KG., con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante.

2. El solicitante debe presentar un nuevo titulo que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el titulo relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continua en la página siguiente...

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 08 OCT. 2010.
adpa11