



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-31001

54. TÍTULO

MOLECULAS DE UNION DE NOGO-A Y USO FARMACEUTICO DE LAS MISMAS.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

C07K16/00, 16/08, A61K39/395, 39/44, 38/16

71. SOLICITANTE

NOVARTIS AG Y UNIVERSITAT ZURICH

DOMICILIO

BASILEA, SUIZA Y ZURICH, SUIZA

74. APODERADO

JIMENA ESCOBAR URIBE

22. BOGOTÁ, D. C.,

Marzo - 29 - 2006.

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

19-04-2005

SOLICITUD DE



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I



Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre **Novartis AG y**
University of Zürich
Direccion **Lichtstrasse 35, CH -4002 Basilea,**
Suiza y
Prorektorat Forschung Ramistrasse
71, CH-8006 Zürich Suiza
Nacionalidad o Domicilio **Basilea, Suiza y**
Zürich Suiza
Lugar de Constitución **Suiza**
Teléfono Fax
E-mail

IDENTIFICACIÓN

CC ☐

NIT ☐

CE ☐

Otro ☐

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre **JIMENA ESCOBAR URIBE**
Direccion **Cra 11A No 94-76 (Of 305)**
Teléfono **6 162051/61** Fax **6 161889**
E-mail **tm-patent@escobaruribe.com**

IDENTIFICACION

CC ☒

NIT ☐

CE ☐

Otro ☐

Numero 39 779 452T P 68228

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre **VER ANEXO**
Direccion
Nacionalidad o domicilio

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No **PCT/EP2004/010489** Fecha **17 de septiembre de 2004**

Publicación Internacional No **WO 2005/028508 A2** Fecha **31 de marzo de 2005**

6 **TITULO (54)** **MOLECULAS DE UNION DE NOGO-A Y USO FARMACEUTICO**
DE LAS MISMAS.

7 **Clasificación Internacional (51)**

C07K 16/00, G16/08, A61K39/395, A61K44/39/13

8 **Prioridad**

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen
Reino Unido de la Gran
Bretaña

(32) Fecha
19 de septiembre de 2003

(31) Numero de Solicitud
0321997 9

9 **Comprobante de pag** No **06 - 21.184**

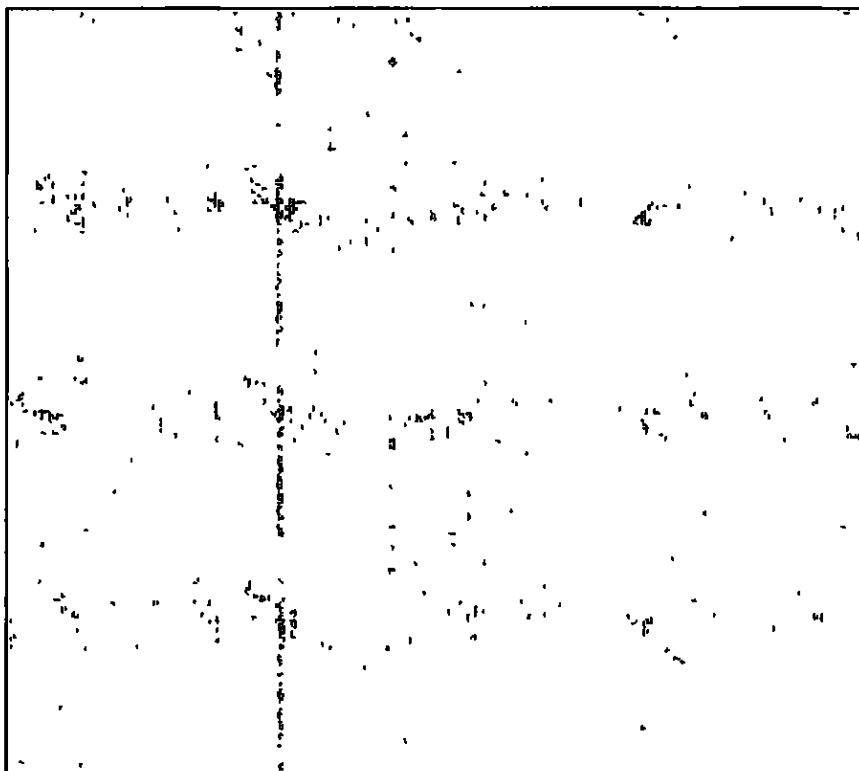
Fecha **16 de marzo de 2006**

10

ANEXOS

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona
- ☐ Poderes si fuere el caso **Novartis AG Protocolo No. 17.398**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ 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 de 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 12 X 12
- ☐ 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
- ☐ Otros "Opinión escrita"

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBEFIRMA: *Jimena Escobar Uribe*

C.C. 39.779.452 DE Usaquén T.P. 68.228

As. 2946/PCT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT.: 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 21,184
FECHA : MARZO 16 DE 2006

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO	
Radicacion : 06031001 00000000	Folios: 197
Fecha (AMD): 2006-03-29 14:29:33	
Tramite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC	
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES	

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ESCOBAR URIBE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	48487977	15/03/2006	6,184,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXOS

INVENTORES

1.)

BARSKE, Carmen

(Birkenweg 10, 79540 Loerrach, Alemania);

2.)

FRENTZEL, Stefan

(Theodor-Heuss-Strasse 46, 79539 Lörrach, Alemania);

3.)

MIR, Anis, Khusro

(6, rue des Vosges, F-68870 Bartenheim, Francia);

4.)

SCHWAB, Martin, E.

(Berninastrasse 96, CH-8057 Zürich, Suiza);

5.)

VITALITI, Alessandra

(CH-6981 Bedigliora, Suiza).

4

Solicito expresamente a nombre de las sociedades **NOVARTIS AG.**, sociedad constituida de conformidad con las leyes de suiza, domiciliada en Lichtstrasse 35, CH-4002 Basilea, Suiza y **UNIVERSITY OF ZÜRICH**, sociedad constituida de conformidad con las leyes de Suiza, domiciliada en Prorektorat Forschung, Rämistrasse 71, CH-8006 Zürich, Suiza el otorgamiento de Patente para la invención titulada "**MOLECULAS DE UNION DE NOGO-A Y USO FARMACEUTICO DE LAS MISMAS**".

Clase: C07K 16/00


JIMENA ESCOBAR URIBE
C.C. 39.779.452 de Usaquen.
T.P. 68.228

POWER OF ATTORNEY

The undersigned Prof. Dr. A. Borbély
acting on behalf of and representing
University of Zürich.

domiciled at Ramistrasse 71, CH-8006
hereby appoints Zürich, Switzerland
JIMENA ESCOBAR-URIBE and/or IGNACIO
ESCOBAR-URIBE

domiciled at Bogota, Colombia

CARRERA 11 A No. 94-76 OF. 305-306

as our true and legal attorneys with the necessary
powers 1 to apply to the administrative, judicial and
police authorities of the Republic of Colombia, in any
instance or appeal, for obtaining registration of
patents, utility models, industrial designs, commercial
ensigns and names, trademarks, domain names,
copyrights and neighbouring rights, plant varieties,
health licenses as well as their assignments,
extensions, renewals, changes of name and
domicile, 2 to prepare, apply for, obtain, execute and
register contracts, licenses, authorizations and
registrations of any kind, 3 to intervene as plaintiffs
or defendants, in any instance or appeal, before any
judge, court, tribunal, corporation, public officer or
authority in any judicial, administrative or police
action, such as, actions dealing with commercial
ensigns and names; oppositions against trademark
registrations; caducity and nullity actions; recovery
actions, actions arising from obtainment and working
of license agreements; actions dealing with unfair
competition; criminal actions; actions claiming
indemnity for damages, complaints or remarks on all
sort of industrial property matters, the performance of
precautionary measures, and in any other similar
action, measure or appeal related to industrial
property matters, copyrights and neighbouring rights
and obtention of plant varieties rights. To this effect,
we hereby authorize them to file applications, make
descriptions, amendments, protests, declarations,
oppositions, cancellations, appeals and claims; to
pay taxes, quotas and liens as provided by law; to
waive or abandon granted rights or rights in process
of being granted, to receive all kind of documents
and securities, to issue the respective releases and,
in general to take, before said authorities, pertinent
steps to the above-mentioned purposes and take all
measures they may deem advisable to protect our
interests, with all other necessary legal faculties, and
we hereby declare as good and valid whatever the
attorneys should do to our benefit.

This power comprises the authority to ratify or
confirm on our behalf any action, as well as the
faculty of receiving, desisting, transacting,
compromising, conciliating, substituting and revoking
substitutions, taking notifications and appointing
judicial or extra-judicial attorneys

Signed at Zurich
on

Universitat Zürich

Prof. Dr. A. Borbély
Vice President Research

DOCUMENTO DE PODER

El suscrito Prof. Dr. A. Borbély
obrando en nombre y representación de con
Universidad de Zürich.

con domicilio en Ramistrasse 71, CH-8006
nombra a Zürich, Suiza

JIMENA ESCOBAR-URIBE y/o IGNACIO
ESCOBAR-URIBE

domiciliados en Bogotá, Colombia

CARRERA 11 A No. 94-76 OF. 305-306

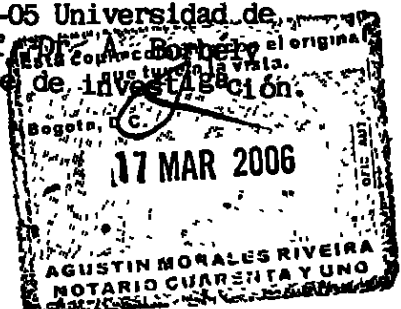
apoderados verdaderos y legales con poder
especial, amplio y suficiente 1 para recabar de las
oficinas y autoridades colombianas administrativas,
judiciales y de policía en cualquier instancia o
recurso, la obtención de patentes de invención,
modelos de utilidad, diseños industriales, registro de
marcas, nombres de dominio, registro de derechos
de autor y derechos conexos, registro de variedades
vegetales, depósito de nombres comerciales y
enseñas, registros sanitarios, así como sus
traspasos, prórrogas, renovaciones, cambios de
nombre y de domicilio, 2 elaborar, tramitar, solicitar,
obtener, realizar, ejecutar y registrar contratos,
licencias, autorizaciones y registros de cualesquiera
clase, 3 intervenir como demandante o como
demandado en cualquier instancia y recurso, y ante
cualquier juez, entidad, corporación, funcionario
público o autoridad en acciones judiciales,
administrativas y de policía, tales como acciones
derivadas del nombre o enseña comerciales,
observaciones u oposición al registro de marcas;
acciones de caducidad y nulidad; acciones
revindicatorias, acciones derivadas de la obtención o
explotación de licencias; acciones de competencia
desleal; demandas penales y civiles; acciones de
indemnización de perjuicios, reclamos u
observaciones a cualquier asunto sobre propiedad
industrial; el ejercicio de medidas cautelares y
cualesquiera otras acciones, medidas o recursos
similares relacionados con la propiedad industrial, los
derechos de autor y derechos conexos y los
derechos de obtentor de variedades vegetales. A
este efecto, los facultamos para elevar solicitudes,
formular descripciones, enmiendas, protestas,
declaraciones, oposiciones, cancelaciones,
apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y
gravámenes prescritos por la ley, renunciar o desistir
a derechos concedidos o en curso de concesión,
recibir toda clase de documentos y valores dando el
descargo respectivo, y, en general, para dar ante
dichas autoridades todos los pasos necesarios al
efecto indicado y tomar todas las medidas que
creyeran conducentes al resguardo de nuestros
intereses, con todas las demás facultades
necesarias y por este documento desde ahora
declaramos válido y bueno todo cuanto los
apoderados hicieron en nuestro beneficio.

Este poder comprende la facultad de ratificar o
confirmar en nuestro nombre lo actuado, así como la
facultad de desistir, transigir, comprometer, conciliar,
sustituir y revocar sustituciones, recibir notificaciones
y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Firmado en

6 Zürich 13-6-05 Universidad de

Zürich Prof. Dr. A. Borbély
Vice-presidente de Investigación



Official Certification

Seen for authentication of the foregoing signature of

Alexander Andreas Borbély, Prof Dr, born 25th March 1939, Swiss citizen of Kusnacht ZH, residing (according to his information) at Rutlistrasse 48, Gockhausen (Dubendorf), CH-8044 Zurich (Switzerland), who is personally known to us.

The signature has been acknowledged in our presence by the authorized agent, Mr Adrian Philippe Sigrist, born 27th March 1965, Swiss citizen of Kriens LU, residing (according to his information) at Gfennstrasse 12a, CH-8600 Dubendorf (Switzerland)

Zurich, this 29th June 2005

B No. 1221
Fee: Fr. 20.--



NOTARIAT FLUNTERN-ZÜRICH

J. Morger, Notary public

APOSTILLE / APOSTILHA

(Convenio de la Haya de 5 de octubre 1961)
(Convenção de Haia de 5 de Outubro de 1961)

1. País: Confederación Suiza, cantón de Zurich
Confederação Sulça, Cantão de Zurique
El presente documento público / Este documento público

2. Ha sido firmado por Jürg Morger
foi assinado por

3. Actuando en calidad de Notar
na sua qualidade de

4. Se halla sellado/timbrado con/está provido do selo/ carimbo do (da)
Notariat Fluntern-Zürich

Certificado

5. En/em 8090 Zurich/Zurique 6. El/no día - 1. Juli 2005

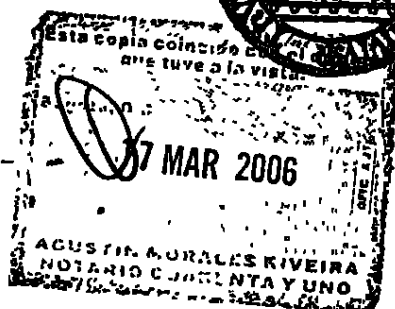
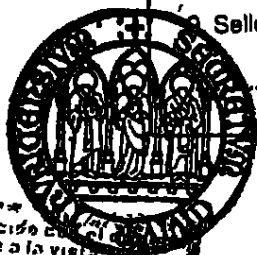
7. Por la Cancillería de Estado del cantón de Zurich
pela Chancelaria de Estado do Cantão de Zurique

8. Con el número/sob o No 1752/2005

9. Sello/timbre/selo/carimbo 30.-

10. Firma/Assinatura

A. Bachmann
A. Bachmann



Traducción oficial hecha por Jimena Escobar Uribe, traductora e intérprete oficial según resolución No. 0369 del Ministerio de Justicia, del documento legalizado mediante la APOSTILLA # 11752 de 1 de julio de 2005 expedida en el Cantón de Zurich, Suiza, el cual corresponde a un documento de poder en inglés con su correspondiente traducción al español (razón por la cual no se hace traducción del mismo texto), otorgado por la sociedad UNIVERSITAT ZÜRICH, domiciliada en Zürich, Suiza, a Jimena Escobar-Urbe y/o Ignacio Escobar-Urbe firmada por el Profesor Dr. A. Borbély, Vice-presidente de investigación.

CERTIFICACION OFICIAL

Vista para autenticación de la correspondiente firma de: Alexander Andreas Borbély, Profesor Doctor, nacido el 25 de marzo de 1939, Suiza ciudadano Suizo de Kusnacht ZH, residente (de acuerdo con su información) en Rutistrasse 48, Gockhausen (Dubendorf), CH-8044 Zürich (Suiza), a quien personalmente conocemos.

La firma ha sido reconocida en nuestra presencia por el agente autorizado, Sr. Adrian Phillipe Sigris, nacido el 27 de marzo de 1965, ciudadano Suizo de Kriens LU, residente (de acuerdo con su información) en Gfennstrasse 12a, CH-8600 Dubendorf (Suiza).

Zürich, este 29 de junio de 2005.

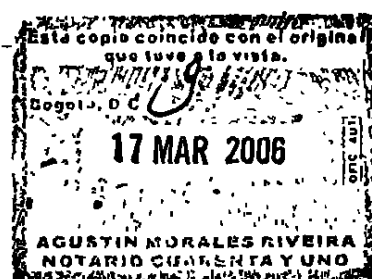
B No. 1221

Tasa: 20 francos

Sello: Notario del Cantón de Zürich.

Notario del Cantón de Zurich
(fdo) J. Morder, Notario público.

Jimena Escobar Uribe
JIMENA ESCOBAR URIBE
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0369 Min. Justicia 1995



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

Tramite

254985

Presidencia

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 NOV 29 A 9:41

Lucas

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

Esta copia coincide con el original
que tuve a la vista
En Bogotá, D.C.
17 MAR 2006
ACUSTIN MOHALES RIBEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

Bildungsdirektion Kanton Zürich
Hochschulamt



Bl, HSA, Postfach, 8090 Zürich

Zurich, 18. August 2005

Certificate

We, the Ministry of Education of the Canton of Zurich hereby certify that

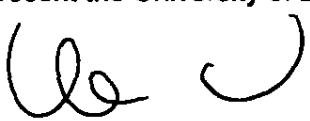
the **University of Zurich**

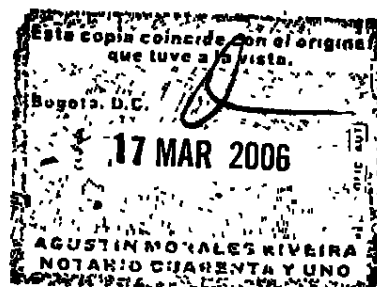
with main offices at Rämistrasse 71, CH-8006 Zurich, Switzerland

is a public university existing and operating under the laws of the Canton of Zurich and that

Prof. Dr. Alexander Borbély

is Vice President for Research of the University of Zurich and in this capacity authorized to represent the University of Zurich.


Dr Sebastian Brändli
Amtschef Hochschulamt



(Convenio de la Haya de 5 de octubre 1961)
(Convenção de Hala de 5 de Outubro de 1961)

2. Ha sido firmado por *John W. Sebastian*
foi assinado por *Sebastian*

3. Actuando en calidad de Artista
na sua qualidade de Actor

4. Se halla sellado/limbrado con/está provisto do selo/ carimbo do (da)

Certificado

5. En/em 8090 Zurich/Zürique 6. El/no día 14. Sep. 2005.....

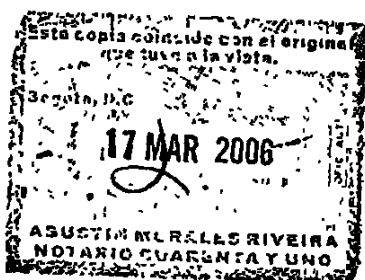
7. Por la Cancilleria de Estado del cantón de Zurich
pela Chancelaria de Estado do Cantão de Zurigo

8 Con el número/sob o No. 16464/1003

9 Sello/timbre/selo/carimbo

10. Firma/Assinatura

1. Schärer



Traducción oficial hecha por Jimena Escobar Uribe , traductora intérprete oficial según resolución No. 0369 del Ministerio de Justicia, del documento legalizado mediante la APOSTILLA N . 16464 de 14 de septiembre de 2005 expedidas en el Cantón de Zurich, Suiza, el cual corresponde a una certificación expedida por el Dr. Sebastián Brändli sobre la existencia y representación de la Universidad de Zürich.

Zürich, 18 de agosto de 2005

CERTIFICACION

Nosotros, el Ministerio de Educación del Cantón de Zürich por medio del presente certificamos que

la Universidad de Zürich con oficinas principales en Rämistrasse 71, CH-8006 Zürich, Suiza

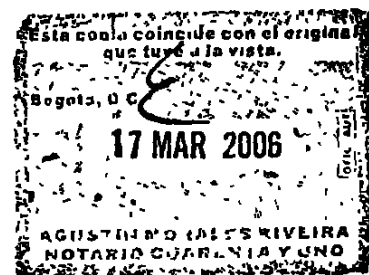
es una universidad pública que existe y opera bajo las leyes del Cantón de Zürich y que

el Profesor Dr. Alexander Borbély

es Vice-presidente de Investigación de la Universidad de Zürich y en esta calidad está autorizado para representar a la Universidad de Zürich.

(fdo) Sebastián Brändli
Sello.


JIMENA ESCOBAR URIBE
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No 0369 Min. Justicia 1995



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 NOV 29 A 9:41

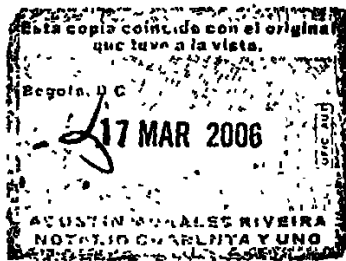
UCB
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BUENOS AIRES

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

Tienden
25498-

escogida
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO PRESENTE
LAS FIRMAS DE LOS

folio 9 para publicacion.
2006-07-11



RESUMEN

La presente invención proporciona una molécula de unión que es capaz de unirse al polipéptido NogoA humano o NiG humano o NiG-D20 humano o NogoA_342-357 humano, con
5 una constante de disociación de <1000 nM, un polipéptido que codifica dicha molécula de unión; un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido; un sistema de expresión que comprende un polinucleótido capaz de producir una molécula de unión; una célula huésped aislada que comprende un sistema de
10 expresión según se define anteriormente, el uso de tal molécula de unión como un fármaco, especialmente en el tratamiento de reparación de nervios, una composición farmacéutica que comprende dicha molécula de unión; y un método de tratamiento de enfermedades asociadas con la reparación de nervios.

10

MOLECULAS DE UNION DE NOGO-A Y USO FARMACEUTICO DE LAS MISMAS

Esta invención se refiere a moléculas de unión de
5 NogoA, tal como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales o
fragmentos Fab de los mismos

La regeneración neuronal después de un daño en el
sistema nervioso central de un adulto (CNS) está limitado debido
a la presencia del ambiente de mielina inhibidora que envaina
10 axones y la formación de tejido de cicatrización. En los últimos
años se han obtenido importantes logros en el entendimiento
molecular del por qué el sistema nervioso central es incapaz de
repararse espontáneamente después de un daño. Las moléculas
inhibidoras en la mielina son el impedimento principal para la
15 regeneración axonal, particular e inmediatamente después del
daño. Por lo que NogoA, glicoproteína asociada con mielina
(MAG) y glicoproteína de mielina-oligodendrocito (OMgp) han
sido caracterizados como potentes inhibidores de excrescencia
de neurita. Además, la mielina también contiene otros
20 componentes inhibidores, tales como, proteoglicanos de sulfato
de condroitina. El Nogo-A es un miembro de la familia de
proteína de retículo y tiene por lo menos dos dominios
biológicamente activos y farmacológicamente distintos
denominados Amino-Nogo y Nogo-66. Mientras que el sitio de
25 receptor para el primero es aún desconocido, Nogo-66 inhibe el

crecimiento neuronal *in vitro* e *in vivo* a través del receptor neuronal NgR. Además de Nogo-66, MAG y OMgp también se unen a NgR con afinidad e inhiben la excrescencia de neurita

Los nuevos aspectos de investigaciones potenciales actualmente perseguidos para mejorar la reparación de nervios incluyen digestión de tejido de cicatrización utilizando una enzima, condroitinasa ABC, técnicas de unión utilizando células envainadoras olfativas y células del tallo y factores de crecimiento de proteína para reforzar el crecimiento neuronal.

Las acciones de bloqueo de inhibidores de excrescencia de neurita a través de la modulación de mediadores de señalización intracelular tales como Rho, una tris-fosfatasa de guanosina unida a membrana (GTPase), parece ser un enlace clave en la inhibición de crecimiento axonal. El monofosfato de adenosina cíclica (cAMP), el cual puede superar la inhibición asociada con mielina *in vitro* e inducir la generación *in vivo*. El uso del inhibidor de péptido de receptor NgR (NEP-1-40) para inducir el crecimiento adicional neuronal y recuperación funcional en ratas después de daño en la espina

Además de utilizar los aspectos descritos anteriormente, también se ha puesto mucha atención en el uso de ciertos anticuerpos monoclonales para neutralizar las moléculas inhibidoras de crecimiento de neurita del sistema nervioso central y periférico, en particular para neutralizar la actividad inhibidora de crecimiento de neurita de Nogo-A. De

esta manera, se ha mostrado que el anticuerpo monoclonal IN-1 o su fragmento IN-1 Fab inducen la excreción de neurita *in vitro* y mejoran el brote y la regeneración *in vivo* (Schwab ME y otros, (1996) *Physiol. Rev.* 76, 319-370). Las pruebas de diferentes dominios del NogoA para actividad inhibidora de crecimiento de neurita ha delineado varios dominios inhibidores en la molécula (Chen y otros, (2000) *Nature* 403-439; GrandPre y otros, (2000) *Nature* 403, 439-444, Prinjha y otros, (2000) *Nature* 403, 383-384

10 Las inmunoglobulinas naturales o anticuerpos comprenden una molécula multimérica generalmente con forma de Y, que tiene un sitio de unión de antígeno en el extremo de cada brazo superior. El resto de la estructura, en particular, el tallo de Y media las funciones efectoras asociadas con las
15 inmunoglobulinas Los anticuerpos consisten de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras Tanto las cadenas pesadas como las ligeras comprenden un dominio variable y una parte constante. Un sitio de unión de antígeno consiste del dominio variable de una cadena pesada asociada con el dominio variable de una cadena ligera Los dominios variables de las cadenas
20 pesada y ligera tienen la misma estructura general Más particularmente, las características de unión de antígeno de un anticuerpo son esencialmente determinadas a través de regiones específicas en el dominio variable de las cadenas pesada y
25 ligera, las cuales son denominadas regiones hipervariables o

14
13

regiones de determinación de complementariedad (CDRs). Estas tres regiones de hipervariables alternan con cuatro regiones de estructuras (FRs), cuyas secuencias son relativamente conservadas y las cuales no están directamente involucradas en la unión. Las CDRs forman lazos y se mantienen en cercanía a través de las regiones de estructura, las cuales enormemente adoptan una conformación de β -lámina. Las CDRs de una cadena pesada junto con las CDRs de la cadena ligera asociada esencialmente constituyen el sitio de unión de antígeno de la molécula de anticuerpo. La determinación de lo que constituye un FR o una región CDR usualmente se hace comparando la secuencia de aminoácido de un número de anticuerpos desarrollados en la misma especie. Las reglas generales para identificar las regiones de CDR y FR son generalmente conocidas por algún experto en la técnica, y, por ejemplo, pueden encontrarse en el sitio web (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>)

Ahora sorprendentemente se ha encontrado que un cuerpo humano monoclonal novedoso (de aquí en adelante denominado "3A6") desarrollado en ratones Medarex (genéticamente ratones reconstituidos con genes de inmunoglobulina humana) contra NiG humana y del tipo IgG tienen mejores propiedades que los anticuerpos NogoA de la técnica anterior (Schwab ME y otros (1996) *Physiol Rev.* 76, 319-370), especialmente con respecto a la afinidad de unión a

13
14

NogoA de diferentes especies incluyendo homo sapiens y con respecto a su actividad neutralizante de excreción de neurita Nogo-A superior a una concentración dada de anticuerpo. Además, ahora es posible construir otras moléculas de unión de NogoA teniendo las mismas regiones hipervariables como dicho anticuerpo.

Por consiguiente, la invención proporciona moléculas de unión para una región particular o epítipo de NogoA (de aquí en adelante denominada como "las moléculas de unión de la invención" o simplemente "moléculas unión"). Preferiblemente, las moléculas de unión de la invención se unen a NogoA₃₄₂₋₃₅₇ humano (epítipo de 3A6 en NiG humano, =SEC ID NO:6), NogoA humano (SEC ID NO:5) o NiG humano (que es el fragmento inhibidor de excrecencia de neurita más potente de NogoA y comienza en el aminoácido No 186 y termina en el aminoácido No. 1004 de NogoA humano =SEC ID NO 5) con una constante de disociación de (Kd) < 1000 nM, muy preferiblemente con una Kd < 100 nM, y de preferencia con una Kd < 10 nM. La reacción de unión puede ser mostrada a través de métodos estándares (ensayos cualitativos) incluyendo, por ejemplo, el método de ELISA descrito en el Ejemplo 6 y el método de afinidad de biosensor descrito en el Ejemplo 7. Además, la unión de NogoA humano y con mucha importancia la eficiencia puede ser mostrada en un ensayo de excreción de neurita, por ejemplo, como se describe más adelante

16
5

De esta manera, en una modalidad preferida adicional, las moléculas de unión (a una concentración de 100 µg/ml, de preferencia 10 µg/ml, preferiblemente a 1.0 µg/ml, muy preferiblemente a 0.1 µg/ml) mejoran el número de neuritas de
5 células de gránulo cerebelares sobre un sustrato de extracto de proteína de cerebro de mono en por lo menos un 20%, de preferencia 50%, muy preferiblemente 80%, comparado con el número de neuritas de células de gránulo cerebelares de rata, las cuales son tratadas con un anticuerpo de control que no
10 inhibe al NogoA humano, NiG humano o NogoA_342-357, como polipéptido (es decir, que tiene una constante de disociación de >1000 nM

En una modalidad adicional preferida, las moléculas de unión de la invención comprenden por lo menos un
15 sitio de unión de antígeno, dicho sitio de unión de antígeno comprendiendo en secuencia, las regiones hipervariables CDR-H1-3A6, CDR-H2-3A6 Y CDR-H3-3A6; dicha CDR-H1-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de SEC ID NO.8, dicha CDR-H2-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de SEC ID
20 NO 9, y dicha CDR-H3-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de SEC ID NO.10, y dirigir sus equivalentes

En un aspecto más de la invención, la molécula de unión de la invención comprende por lo menos un sitio de unión de antígeno, dicho sitio de unión de antígeno comprende ya sea
25 a) en secuencia, las regiones hipervariables CDR-

17
16

5 H1-3A6, CDR-H2-3A6 y CDR-H3-3A6; dicha CDR-H1-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de SEC ID NO.8, dicha CDR-H2-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de SEC ID NO 9, y dicha CDR-H3-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de SEC ID NO.10; o

10 b) en secuencia, las regiones hipervariables CDR-L1-3A6, CDR-L2-3A6 y CDR-L3-3A6, dicha CDR-L1-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de SEC ID NO 11, dicha CDR-L2-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de SEC ID NO.12, y dicha CDR-L3-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de SEC ID NO.13, o

c) sus equivalentes directos

15 En un aspecto adicional de la invención, la molécula de unión de la invención comprende por lo menos:

20 a) un primer dominio comprendiendo en secuencia las regiones hipervariables CDR-H1-3A6, CDR-H2-3A6 y CDR-H3-3A6; dicha CDR-H1-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de SEC ID NO.8, dicha CDR-H2-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de SEC ID NO 9, y dicha CDR-H3-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de SEC ID NO.10, y

25 b) un segundo dominio que comprende en

16
17

5 secuencia las regiones hipervariables CDR-L1-3A6, CDR-L2-3A6 y CDR-L3-3A6 dicha CDR-L1-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de SEC ID NO 11, dicha CDR-L2-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de SEC ID NO 12, y dicha CDR-L3-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de SEC ID NO 13; o

c) equivalentes directos de los mismos

10 Además, la invención proporciona la siguiente molécula de unión de la invención, la cual comprende por lo menos un sitio de unión de antígeno comprendiendo.

a) ya sea la parte variable de la cadena pesada de 3A6 (SEC ID NO 2); o

15 b) la parte variable de la cadena ligera de 3A6 (SEC ID NO 3), o sus equivalentes directos.

 Cuando el sitio de unión de antígeno comprende tanto el primero como el primero como el segundo dominios, éstos pueden ser localizados en la misma molécula de péptido o, de preferencia, cada domino puede estar en una cadena diferente, el primer dominio siendo parte de una cadena pesada de inmunoglobulina o su fragmento y el segundo dominio siendo parte de una cadena ligera de inmunoglobulina o un fragmento de la misma

25 Ejemplos de moléculas unión de unión de la invención incluyen anticuerpos así producidos por células B o

hibridomas y anticuerpos humanos o quiméricos o humanizados o cualquier fragmento de los mismos, por ejemplo, $F(ab')_2$, y fragmentos Fab, así como anticuerpos de cadena individual o de dominio individual.

5 Un anticuerpo de cadena individual consiste de los dominios variables de cadenas pesada y ligera del anticuerpo covalentemente unidos a través de un enlazador de péptido usualmente consistiendo de 10 a 30 aminoácidos, de preferencia de 15 a 25 aminoácidos. Por lo tanto, dicha estructura no
10 incluye la parte constante de las cadenas pesada y ligera y se cree que el pequeño separador de péptido debe ser menos antigénico que una parte constante entera. Por "anticuerpo quimérico" se quiere dar a entender un anticuerpo en el cual la
15 sesiones constantes de cadenas pesada o ligera o ambas son de origen humano, mientras que los dominios variables tanto de cadenas pesada como ligera son de origen no humano (por ejemplo, murino). Por "anticuerpo humanizado" se quiere dar a
20 entender un anticuerpo en donde las regiones hipervariables (CDRs) son de origen no humano (por ejemplo, de murino), mientras que todas o sustancialmente todas las otras partes de la inmunoglobulina, por ejemplo, las regiones constantes y las partes altamente conservadas de los dominios variables, es decir, las regiones de estructura, son de origen humano. Un anticuerpo humanizado, sin embargo, puede retener algunos
25 aminoácidos de la secuencia de murino en la parte de las

30
H

regiones de estructura adyacentes a las regiones hipervariables.

Las regiones hipervariables pueden estar asociadas con cualquier tipo de regiones de estructura, preferiblemente de origen murino o humano. Las regiones de estructura adecuadas se describen en "Sequences of proteins of immunological interest", Kabat E. A. y otros, departamento de E.U.A. De salud y servicios humanos, servicio de salud pública, Instituto Nacional de Salud. Preferiblemente, la parte constante de una cadena pesada humana de las moléculas de unión puede ser del tipo IgG4 incluyendo subtipos, preferiblemente la parte constante de una cadena ligera humana puede ser del tipo κ o λ , muy preferiblemente del tipo κ .

Se pueden desarrollar anticuerpos monoclonales desarrollados contra una proteína naturalmente encontrada en todos los seres humanos, en un sistema no humano, por ejemplo, en ratones. Como una consecuencia directa de esto, un anticuerpo xenogénico según producido por un hibridoma, cuando se administra a seres humanos, produce una respuesta inmune indeseable, la cual predominantemente es mediada por la parte constante de la inmunoglobulina xenogénica. Esto claramente limita el uso de dichos anticuerpos ya que éstos no pueden ser administrados durante un periodo prolongado de tiempo. Por lo tanto, se prefiere particularmente utilizar anticuerpos de cadena individual, de dominio individual, quiméricos o humanizados, los cuales probablemente no

31
40

producirán una respuesta alogénica sustancial cuando se administran a seres humanos

En vista de lo anterior, una molécula de unión muy preferida de la invención se selecciona a partir de un anticuerpo quimérico, que comprende por lo menos:

- a) una cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de la misma que comprende (i) un dominio variable comprendiendo en secuencia las regiones hipervariables CDR-H1-3A6, CDR-H2-3A6 y CDR-H3-3A6, y (ii) la parte constante o su fragmento de una cadena pesada humana, dicha CDR-H1-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de (SEC ID NO 8), dicha CDR-H2-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido (SEC ID NO 9), y dicha CDR-H3-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de (SEC ID NO 10), y
- b) una cadena ligera de inmunoglobulina o un fragmento de la misma que comprende (i) un dominio variable comprendiendo en secuencia las regiones hipervariables CDR-L1-3A6, CDR-L2-3A6 y CDR-L3-3A6, (ii) la parte constante o su fragmento de una cadena ligera humana, dicha CDR-L1-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de (SEC ID NO 11), dicha CDR-L2-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de

zh
N

(SEC ID NO:12), y dicha CDR-L3-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de (SEC ID NO 13), o

c) sus equivalentes directos.

5 Alternativamente, una molécula de unión de la invención puede ser seleccionada a partir de una molécula de unión de cadena individual que comprende un sitio de unión de antígeno, comprendiendo.

10 a) un primer dominio comprendiendo en secuencia la hipervariable CDR-H1-3A6, CDR-H2-3A6 y CDR-H3-3A6, dicha CDR-H1-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de (SEC ID NO 8), dicha CDR-H2-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de (SEC ID NO 9), y dicha CDR-H3-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de (SEC ID NO.10); y

15 b) un segundo dominio que comprende en secuencia la hipervariable CDR-L1-3A6, CDR-L2-3A6 y CDR-L3-3A6 dicha CDR-L1-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de (SEC ID NO 11), dicha CDR-L2-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de (SEC ID NO.12), y dicha CDR-L3-3A6 teniendo la secuencia de aminoácido de (SEC ID NO 13); y

20 c) un enlazador de péptido que se une ya sea a la

25

73
22

extremidad N-terminal del primer dominio y a la
extremidad C-terminal del segundo dominio o a
la extremidad C-terminal del primer dominio y a
la extremidad N-terminal del segundo dominio;

5 sus equivalentes directos.

Como es bien conocido, los cambios menores en una
secuencia de aminoácido tal como eliminación, adición o
sustitución de uno o varios aminoácidos puede conducir a una
forma alélica de la proteína original, la cual tiene propiedades
10 sustancialmente idénticas. De esta manera, por el término "sus
equivalentes directos" se quiere dar a entender ya sea cualquier
molécula de unión de dominio individual de la invención
(molécula X),

(i) en donde cada una de las regiones
15 hipervariables CDR-H1 CDR-H2, y CDR-H3 de
la molécula de unión es por lo menos 50 u 80%
homóloga, de preferencia por lo menos 90%
homóloga, muy preferiblemente por lo menos
95, 96, 97, 98, 99% homóloga a las regiones
20 hipervariables equivalentes de CDR-H1-3A6
(SEC ID NO:8), CDR-H2-3A6 (SEC ID NO:9) y
CDR-H3-3A6 (SEC ID NO 10), mientras que
CDR-H1 es equivalente a CDR-H1-3A6, CDR-H2
es equivalente a CDR-H2-3A6, CDR-H3 es
25 equivalente a CDR-H3-3A6, y

124
23

- 5 (ii) que es capaz de unirse al NogoA, NiG humano, o NogoA_342-357 humano, preferiblemente con una constante de disociación de (Kd) < 1000 nM, de preferencia Kd < 100 nM, y muy preferiblemente Kd < 10 nM, o cualquier molécula de unión de la invención teniendo por lo menos dos dominios por sitio de unión (molécula X'),
- 10 (iii) en donde cada una de las regiones hipervariables CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 es por lo menos 50 u 80% homóloga, de preferencia por lo menos 90% homóloga, muy preferiblemente por lo menos 95, 96, 97, 98, 99% idéntica a las regiones
- 15 hipervariables equivalentes de CDR-H1-3A6 (SEC ID NO.8), CDR-H2-3A6 (SEC ID NO:9), CDR-H3-3A6 (SEC ID NO.10), CDR-L1-3A6 (SEC ID NO.11), CDR-L2-3A6 (SEC ID NO.12) y CDR-L3-3A6 (SEC ID NO.13), mientras que
- 20 CDR-H1 es equivalente a CDR-H1-3A6, CDR-H2 es equivalente a CDR-H2-3A6, CDR-H3 es equivalente a CDR-H3-3A6, CDR-L1 es equivalente a CDR-L1-3A6, CDR-L2 es equivalente a CDR-L2-3A6, CDR-L3 es
- 25 equivalente a CDR-L3-3A6; y

(iv) que es capaz de unir al NogoA humano, NiG humano, o NogoA_342-357 humano, preferiblemente con una constante de disociación de (Kd) < 1000 nM, de preferencia Kd < 100 nM, y muy preferiblemente Kd < 10 nM

De esta manera, otras modalidades de la invención son, por ejemplo, una molécula de unión que es capaz de unirse al NogoA humano, NiG humano, o NogoA_342-357 humano con una constante de disociación de <1000 nM y comprende por lo menos un sitio de unión de antígeno, dicho sitio de unión de antígeno comprendiendo ya sea:

- en secuencia las regiones hipervariables CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, de las cuales cada una de las regiones hipervariables son por lo menos 50%, de preferencia 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99% homólogas a sus regiones hipervariables equivalentes CDR-H1-3A6 (SEC ID NO 8), CDR-H2-3A6 (SEC ID NO 9), CDR-H3-3A6 (SEC ID NO:10); o
- en secuencia las regiones hipervariables CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, de los cuales cada una de las regiones hipervariables son por lo menos 50%, de preferencia 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99% homólogas a sus regiones hipervariables equivalentes CDR-L1-3A6 (SEC ID NO 11), CDR-L2-3A6 (SEC ID NO:12) y CDR-L3-3A6 (SEC ID

26
25
2

NO:13)

Además, una molécula de unión es capaz de unir el NogoA humano, NIG humano o NogoA_342-357 humano con una constante de disociación de <1000 nM y que comprende

- 5 • un primer sitio de unión de antígeno comprendiendo en secuencia las regiones hipervariables CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, de las cuales cada una de las regiones hipervariables son por lo menos 50%, de preferencia 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99% homólogas a sus regiones hipervariables equivalentes CDR-H1-3A6 (SEC ID NO.8), CDR-H2-3A6 (SEC ID NO 9), CDR-H3-3A6 (SEC ID NO.10), y
- 10 • un segundo sitio de unión de antígeno que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, de los cuales cada una de las regiones hipervariables son por lo menos 50%, de preferencia 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99% homólogas a sus regiones hipervariables equivalentes CDR-L1-3A6 (SEC ID NO 11), CDR-L2-3A6 (SEC ID NO.12) y CDR-L3-3A6 (SEC ID NO:13).
- 15
- 20

Esta constante de disociación conveniente puede ser probada en varios ensayos incluyendo, por ejemplo, el método de afinidad de biosensor descrito en el Ejemplo 7. Además, la unión y el efecto funcional de las moléculas de unión pueden ser mostrados en un bioensayo, por ejemplo, como se describe más

25

27
26

adelante

La parte constante de una cadena pesada humana puede ser del tipo $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, $\alpha 1, \alpha 2$, δ o ϵ , preferiblemente del tipo γ , muy preferiblemente del tipo $\gamma 4$, mientras que la parte
5 constante de una cadena ligera humana puede ser del tipo κ o λ (el cual incluye los subtipos $\lambda 1$, $\lambda 2$; y $\lambda 3$, pero de preferencia es del tipo κ). La secuencia de aminoácido de todas estas partes constantes se proporciona por Kabat y otros (Supra)

Dentro del alcance de la invención también se
10 incluyen conjugados de las moléculas de unión de la invención, por ejemplo, conjugados de enzima o toxina o radioisótopo

"Polipéptido", si no se especifica de otra manera aquí, incluye cualquier péptido o proteína que comprende aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces de péptido,
15 teniendo una secuencia de aminoácido empezando en la extremidad N-terminal y finalizando en la extremidad C-terminal. De preferencia, el péptido de la presente invención es un anticuerpo monoclonal, muy preferido es un anticuerpo monoclonal quimérico (también llamado V-injertado) o
20 humanizado (también llamado CDR-injertado). El anticuerpo monoclonal humanizado (CDR-injertado) puede o no incluir otras mutaciones introducidas en las secuencias de estructura (FR) del anticuerpo aceptor

Un derivado funcional de un polipéptido como se
25 utiliza aquí, incluye una molécula que tiene una actividad

26
29

biológica cualitativa en común con un polipéptido de la presente invención, es decir, que tiene la habilidad de unirse al NogoA humano, NiG humano, o NogoA_342-357 humano. Un derivado funcional incluye fragmentos y análogos de péptido de un polipéptido de acuerdo con la presente invención. Los fragmentos comprenden regiones dentro de la secuencia de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada. El término "derivado" se utiliza para definir variantes de secuencia de aminoácido, y modificaciones covalentes de un polipéptido de acuerdo con la invención, por ejemplo, de una secuencia especificada. Los derivados funcionales de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada, por ejemplo, de la región hipervariable de la cadena ligera y la cadena pesada, preferiblemente tienen por lo menos alrededor de 65%, de preferencia por lo menos alrededor de 75%, preferiblemente por lo menos alrededor de 85%, y muy preferiblemente por lo menos alrededor de 95, 96, 97, 98, 99% de homología de secuencia total con la secuencia de aminoácido de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada, y sustancialmente retienen la habilidad de unión al NogoA humano, NiG humano o NogoA_342-357 humano.

El término "modificación covalente" incluye modificaciones de un polipéptido de acuerdo con la presente

2A
98

invención, por ejemplo, de una secuencia especificada, o un
fragmento del mismo con un agente de derivatización orgánico
proteínico o no protéico, fusiones a secuencias de
polipéptido heterólogas, y modificaciones de post-traducción
5 Los polipéptidos modificados covalentes, por ejemplo, de una
secuencia especificada, siguen teniendo la habilidad de unión al
NogoA humano, NIG humano o NogoA_342-357 humano a través
de entrelazamiento. Las modificaciones covalentes
tradicionalmente son introducidas haciendo reaccionar residuos
10 de aminoácido objetivo con un agente de derivatización orgánico
que es capaz de reaccionar con los lados seleccionados o
residuos terminales, o mediante mecanismos de anclaje de
modificaciones de post-traducción que funcionan en células
huésped recombinantes seleccionada. Ciertas modificaciones
15 post-traducción son el resultado de la acción de células huésped
recombinantes sobre el polipéptido expresado. Los residuos
glutaminilo y asparaginilo frecuentemente son desamidados
después de la traducción a los residuos glutamilo y aspartilo
correspondientes. Alternativamente, estos residuos son
20 desamidados bajo condiciones moderadamente ácidas. Otras
modificaciones de post-traducción incluyen hidroxilación de
prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos
serilo, tirosina o treonilo, metilación de los grupos α -amino de
cadenas laterales de lisina, arginina e histidina, ver, por
25 ejemplo, T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular

3/6
PA

Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pág. 79-86 (1983). Las modificaciones covalentes, por ejemplo, incluyen proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, de una secuencia
5 especificada y sus variantes de secuencia de aminoácido, tales como inmunoadhesinas y fusiones N-terminales a secuencias de señal heterólogas

"Homología" con respecto a un polipéptido nativo y su derivado funcional se define aquí como el porcentaje de residuos
10 de aminoácido en la secuencia candidato que son idénticos con los residuos de un polipéptido nativo correspondiente, después de alinear las secuencias y los huecos de introducción, si es necesario, para obtener el porcentaje máximo de homología, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de
15 la identidad de la secuencia. Ni las extensiones N- o C-terminales ni las inserciones deben ser construidas para reducir la identidad o la homología. Los métodos y programas de computadora para la alineación son bien conocidos

"Aminoácido(s)" se refiere a todos los L- α -
20 aminoácidos de existencia natural, por ejemplo, e incluyendo D-aminoácidos. Los aminoácidos son identificados ya sea por designaciones de una sola letra o de tres letras bien conocidas

El término "variante de secuencia de aminoácido" se refiere a moléculas con algunas diferencias en sus secuencias
25 de aminoácido según comparado con un polipéptido de acuerdo

3/18

con la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada. Las variantes de secuencia de aminoácido de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada, siguen teniendo la habilidad de unión a NogoA humano o NiG humano, o muy preferiblemente a NogoA_342-357. Las variantes substitucionales son aquellas que tienen por lo menos un residuo de aminoácido removido y un aminoácido diferente insertado en su lugar en la misma posición en un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada. Esta sustituciones pueden ser individuales, mientras que solamente un aminoácido en la molécula ha sido sustituido, o pueden ser múltiples, en donde dos o más aminoácidos han sido sustituidos en la misma molécula. Las variantes de inserción son aquellas con uno o más aminoácidos insertados inmediatamente adyacentes a un aminoácido en una posición particular en un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada. Inmediatamente adyacentes a un aminoácido se conectan medios ya sea al grupo funcional α -carboxi o α -amino del aminoácido. Las variantes de eliminación son aquellas con uno o más aminoácidos en un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada, removida. En forma ordinaria, las variantes de eliminación tendrán uno o dos aminoácidos eliminados en una región particular de la molécula.

37/13

Una molécula de unión de la invención puede ser producida a través de técnicas de ADN recombinantes. En vista de esto, una o más moléculas de ADN que codifican la molécula de unión deben ser construidas, colocadas bajo secuencias de control apropiadas y transferidas a un organismo huésped adecuado para expresión.

En una forma muy general, por consiguiente se proporcionan

- (i) moléculas de ADN que codifican una molécula de unión de dominio individual de la invención, una molécula de unión de cadena individual de la invención, una cadena pesada o ligera o sus fragmentos de una molécula de unión de la invención, y
- (ii) el uso de las moléculas de ADN de la invención para la producción de una molécula de unión de la invención a través de medios recombinantes.

El presente estado de la técnica es tal que aquellos expertos en la técnica serán capaces de sintetizar las moléculas de ADN de la invención dada la información provista aquí, es decir, las secuencias de aminoácido de las regiones hipervariables y las secuencias de ADN que codifican para ellas.

Un método para construir un gen de dominio variable, por

3/3
Bv

ejemplo, se describe en EP 239 400 y puede ser resumido como sigue. Un gen que codifica un dominio variable de un anticuerpo monoclonal de cualquier carácter específico es clonado. Los segmentos de ADN que codifican las regiones de estructura e hipervariables son determinados y los segmentos de ADN que codifican las regiones hipervariables son removidos, de manera que los segmentos de ADN que codifican las regiones de estructura son fusionados junto con sitios de restricción adecuados en las uniones. Los sitios de restricción pueden ser generados en posiciones apropiadas a través de la mutagénesis de la molécula de ADN a través de procedimientos estándares. Se preparan casetes de CDR sintéticos de estructura de cadena doble a través de síntesis de ADN de acuerdo con las secuencias dadas CDR-H1-3A6, CDR-H2-3A6, CDR-H3-3A6, CDR-L1-3A6, CDR-L2-3A6 y CDR-L3-3A6, anteriores. Estos casetes se proporcionan con extremos adherentes de manera que pueden ser ligados en las uniones a la estructura a través de un protocolo estándar para obtener una molécula de ADN que codifica un dominio variable de inmunoglobulina.

Además, no es necesario tener acceso al ARNm de una línea de célula de hibridoma de producción con el fin de obtener una construcción de ADN que codifica para los anticuerpos monoclonales de la invención. De esta manera, la solicitud de PCT WO 90/07861 proporciona instrucciones completas para la producción de un anticuerpo monoclonal a

34
3
3

través de técnicas de ADN recombinante dando solamente información escrita de la secuencia de nucleótido del gen

El método comprende la síntesis de un número de oligonucleótidos, su amplificación a través del método de PCR, y
5 su división para proporcionar la secuencia de ADN deseada

Los vectores de expresión que comprenden un promotor adecuado o genes que codifican partes constantes de cadena pesada y ligera están públicamente disponibles. De esta manera, una vez que una molécula de ADN de la invención se
10 prepara, ésta puede ser convenientemente transferida en un vector de expresión apropiado

Las moléculas de ADN que codifican anticuerpos de cadena individual también pueden ser preparadas a través de métodos estándares, por ejemplo, como se describe en WO
15 88/1649

En una modalidad particular de la invención, los medios recombinantes para la producción de algunas de moléculas de unión de la invención incluyen primera y segunda construcciones de ADN como se describe a continuación:

20 La primera construcción de ADN codifica una cadena pesada o un fragmento de la misma y comprende.

a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende alternativamente regiones de estructura e hipervariables, dichas regiones hipervariables comprendiendo
25 en secuencia ADN-CDR-H1-3A6 (SEC ID NO:14), ADN-CDR-H2-

346 (SEC ID NO 15) y ADN-CDR-H3-3A6 (SEC ID NO:16); esta primera parte comenzando con un codón que codifica al primer aminoácido del dominio variable y termina con un codón que codifica al último aminoácido del dominio variable, y

- 5 b) una segunda parte que codifica una parte constante de cadena pesada o un fragmento de la misma, que inicia con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena pesada y finaliza con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o un
10 fragmento de la misma, seguido por un codón sin sentido.

Preferiblemente, la segunda parte codifica la parte constante de una cadena pesada humana, muy preferiblemente, la parte constante de la cadena humana y4 Esta segunda parte puede ser un fragmento de ADN de origen genómico
15 (comprendiendo intrones) o un fragmento de ADNc (sin intrones)

La segunda construcción de ADN codifica una cadena ligera o un fragmento de la misma y comprende

- a) una primera parte que codifica un dominio
20 variable comprendiendo alternativamente regiones de estructura e hipervariables, dichas regiones hipervariables comprendiendo en secuencia ADN-CDR-L1-3A6 (SEC ID NO.17), ADN-CDR-L2-346 (SEC ID NO:18) y ADN-CDR-L3-3A6 (SEC ID NO.19), esta primera parte comenzando con un codón que codifica al primer
25 aminoácido del dominio variable y termina con un codón que

3/5

codifica al último aminoácido del dominio variable, y

b) una segunda parte que codifica una parte constante de cadena ligera o su fragmento, que inicia con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena ligera y finaliza con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o un fragmento de la misma, seguido por un codón sin sentido.

Preferiblemente, la segunda parte codifica la parte constante de una cadena ligera humana, muy preferiblemente, la parte constante de la cadena κ humana

La primera o segunda construcción de ADN ventajosamente comprende una tercera parte que está localizada corriente arriba de la primera parte y que codifica la parte de un péptido líder, esta tercera parte comenzando con el codón que codifica al primer aminoácido y finalizando con el último aminoácido del péptido líder. Este péptido es requerido para la secreción de las cadenas a través del organismo huésped en donde se expresan y subsecuentemente es removido por el organismo huésped. Preferiblemente, la tercera parte de la primera construcción de ADN codifica un péptido líder que tiene una secuencia de aminoácido sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácido de la secuencia líder de cadena pesada como se muestra en SEC ID NO 21 (comenzando con el aminoácido en la posición-19 y finalizando con el aminoácido en la posición-1). También preferiblemente, la tercera parte de la

34
18

segunda construcción de ADN codifica un péptido líder que tiene una secuencia de aminoácido como se muestra en SEC ID NO·23 (cadena ligera, empezando con el aminoácido en la posición-18 y finalizando con el aminoácido en la posición-1)

5 Cada una de las construcciones de ADN es colocada bajo el control de secuencia de control adecuada, en particular bajo el control de un promotor adecuado. Se puede utilizar cualquier tipo de promotor, siempre que este esté adaptado al organismo huésped en donde las construcciones de ADN serán
10 transferidas para la expresión. Sin embargo, si la expresión va tomar lugar en una célula de mamífero, particularmente se prefiere utilizar el promotor de un gen de inmunoglobulina.

El anticuerpo deseado puede ser producido en cultivo de célula o en un animal transgénico. Un animal transgénico
15 adecuado puede ser obtenido de acuerdo con métodos estándares que incluyen microinyección en huevos de las primera y segunda construcciones de ADN colocadas bajo las secuencias de control adecuadas que transfieren los huevos así preparados a hembras pseudo-embarazadas apropiadas y
20 seleccionando un descendiente que exprese el anticuerpo deseado

Cuando las cadenas de anticuerpo tienen que ser producidas en un cultivo de célula, las construcciones de ADN primero deben ser insertadas ya sea en un vector de expresión
25 individual en dos vectores de expresión separados, pero

compatibles, los últimos posiblemente siendo preferidos.

Por consiguiente, la invención también proporciona un vector de expresión capaz de replicar en una línea de célula procariótica o eucariótica, el cual comprende por lo menos una
5 de las construcciones de ADN descritas anteriormente

Cada vector de expresión que contiene una construcción de ADN después es transferido a un organismo huésped adecuado. Cuando las construcciones de ADN son separadamente insertadas en dos vectores de expresión, éstas
10 pueden ser transferidas en forma separada, es decir, un tipo de vector por célula, o co-transferidas, esta última posibilidad siendo preferida. Un organismo huésped adecuado puede ser una bacteria, una levadura o una línea de célula de mamífero, ésta última siendo la preferida. Muy preferiblemente, la línea de
15 célula de mamífero es de origen linfoide, por ejemplo, un mieloma, hibridoma o una célula B inmortalizada normal, pero no expresa ninguna cadena pesada o ligera de anticuerpo endógeno

También se prefiere que el organismo huésped
20 contenga un gran número de copias de los vectores por célula. Si el organismo huésped es una línea de célula de mamífero, este objetivo deseable puede ser alcanzado amplificando el número de copias de acuerdo con métodos estándares. Los métodos de amplificación usualmente consisten en seleccionar
25 resistencia incrementada para un fármaco, dicha resistencia

39/80

siendo codificada por el vector de expresión.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para producir una molécula de unión de cadena múltiple de la invención, el cual comprende (i) cultivar un
5 organismo que es transformado con las construcciones, primera y segunda, de ADN de la invención, y (ii) recuperar una molécula de unión activada en la invención a partir del cultivo

Alternativamente, las cadenas pesada y ligera pueden ser separadamente recuperadas y reconstituidas a una
10 molécula de unión activa después de redoblamiento *in vitro*. Los métodos de reconstitución son bien conocidos en la técnica, ejemplos de estos métodos en particular se proporcionan en EP 120 674 o en EP 125 023. Por lo tanto, un procedimiento puede comprender:

15 (i) cultivar un primer organismo que es transformado con una primera construcción de ADN de la invención y recuperar dicha cadena pesada o sus fragmentos del cultivo, y

(ii) cultivar un segundo organismo que es
20 transformado con una segunda construcción de ADN de la invención y recuperar dicha cadena ligera o su fragmento del cultivo, y

(iii) reconstituir *in vitro* una molécula de unión activa de la invención a partir de la cadena pesada o su
25 fragmento obtenido en (i) y la cadena ligera o su fragmento

46
38

obtenida en (ii)

En una forma similar, también se proporciona un procedimiento para producir una molécula de unión de cadena individual o dominio individual de la invención, el cual
5 comprende

- (i) cultivar un organismo que es transformado con una construcción de ADN, respectivamente codificando una molécula de unión de cadena individual o de dominio individual de la invención, y
- 10 (ii) recuperar la molécula del cultivo.

Las moléculas unión de la invención exhiben una muy buena actividad de regeneración de nervios como se muestra en, por ejemplo, el modelo de excreción de neurita de célula de gránulo

15

1. Ensayo de excreción de neurita de célula de gránulo (in vitro)

Se tomo tejido de cerebro (corteza y tallo del cerebro) y para cada ensayo se preparó recientemente extracto
20 de proteína como se describió previamente (Spillmann y otros, 1998, Identification and characterization of a bovine neurite growth inhibitor (bNI-220), Biol Chem. 1998, julio 24; 273 (30): 19283-93). Una pieza de tejido congelado (por ejemplo, 0.25 g) se homogeneizó en 3-4 volúmenes de 60 mM Chaps – 20 mM
25 Tris pH 8.0-1 mM EDTA con bloqueador de proteasa (10 µg/ml de

aprotinina-5 µg/ml, leupeptina-1µg/ml, pepstatina-1 mM PMSF) a 4°C El homogenato se colocó en un aparato giratorio a 4°C durante 30 minutos y se centrifugó a 100,000 g 45 minutos 4°C en un rotor TLA 100 3 (Beckman TL-100 ultracentrifuge) Del
5 sobrenadante, se determinó la concentración de proteína utilizando BioRad Se purificaron células de gránulo cerebelares a partir de puntos disociados de tripsina de tejido cerebelar de rata post-natal de 5-7 días como se describió previamente (Niederost y otros 1999, Bovine CNS myelin contains neurite
10 growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfato proteoglycans, J. Neurosci 1999, octubre 15, 19 (20): 8979-89) Las moléculas de unión de la invención después se pre-incubaron durante 30 minutos en el sustrato de prueba y se removieron antes de que se agregaran las células Se
15 agregaron células de gránulos cerebelar y se incubaron durante 24 horas Para detener el experimento, se agregaron lentamente 2 ml de formaldehído regulado en su pH al 4% a los platos de cultivo Se adsorbió extracto de proteína de membrana de cerebro de mono preparado como se describió
20 anteriormente, durante la noche a 15 µg de proteína por cm² de plato de cultivo en platos de Greinier de 4 cavidades (Greinier, Nuertingen, Alemania) Los platos se lavaron 3 veces con una solución de Hank caliente antes de colocar las neuronas en las placas. Se prepararon células de gránulo cerebelar de rata
25 post-natal (5-7 días) como se describió anteriormente, y se

colocaron en placas a 50,000 células/cm². Las células se cultivaron durante 24 horas en un medio libre de suero, se fijaron y se inmunotñieron con el marcador de neurita MAB 1b (Chemicon monoclonal Ab, 1 200). Para la tinción de los
5 cuerpos de célula, se utilizó DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol, diclorhidrato, de Molecular Probes) después de la tinción con MAB 1b. Para experimentos con anticuerpos, se pre-incubaron los mAbs de anti-Nogo-A o IgG Ab de control en los platos durante 30 minutos y subsecuentemente se removieron

10 Se muestrearon aleatoriamente 4 campos a una distancia definida hacia el borde de la cavidad para cada cavidad utilizando un objetivo de 40 X contando todas las intersecciones de neuritas con una línea colocada a través del centro del campo de observación. Todos los cuerpos de célula
15 que tocan la línea también fueron contados, y se calculó una relación de índice de neuritas por cuerpo de célula para cada cavidad según reportado previamente (Simonen y otros, 2003, Neuron 38, 201-211). Todas las cuentas se realizaron en forma ciega en experimentos codificados y se expresaron como un
20 Índice de neuritas por cuerpo de célula. Los resultados se expresan como neuritis de índice medio/cuerpo de célula.

La mejora de la excreción de neurita de la célula de gránulo cerebelar en el ambiente no permisible del extracto de médula espinal anteriormente preparado a través de incubación
25 con una molécula de unión de la invención pudo ser observada.

43
A2

Por ejemplo, un perfil típico para el efecto neutralizante de 3A6-IgG1 humano y el anticuerpo IgG4 en el modelo de excreción de neurita de célula de gránulo se proporciona a continuación

5		Indice de Neurita/ Cuerpo de célula	% de incremento comparado con IgG de control
	sin anticuerpo	0 87	
	+Control IgG	0 90	
	3A6 IgG1 0.1 µg/ml	1.44	60%
10	3A6 IgG4 0 1 µg/ml	1.43	59%
	+Control IgG	0 92	
	3A6 IgG1 10.0 µg/ml	1.69	84%
	3A6 IgG4 10 0 µg/ml	1.55	68%

15 La actividad neutralizante de las moléculas de la invención también puede ser estimada midiendo el brote regenerativo y la excreción de neurita y recuperación funcional en modelos de daño de médula espinal *in vivo* descritos brevemente más adelante.

20

2. Modelos de daño de médula espinal en ratas y monos (in vivo)

Se dañaron microquirúrgicamente ratas Lewis adultas transectando la mitad dorsal de la médula espinal bilateralmente en el nivel de la octava vértebra torácica La laminectomía,

25

anestesia y cirugía se describen por Schnell y Schwab 1993
(Eur J Neurosci 5. 1156 – 1171)

Trazo neuroanatómico: el motor y el trato corticoespinal sensorial se trazaron inyectando la dextranamina de biotina de trazador de grado anterior (BDA) en la corteza del lado opuesto a la bomba o al injerto. La BDA se transportó a la médula espinal en 10-14 días y se visualizó utilizando diaminobencidina (DAB) como un sustrato como se describe por Brosamle y otros, (2000 J Neurosci. 20 8061-8068)

10 Dos semanas después de un daño de médula espinal destruyendo alrededor de 40% del segmento T8 de médula espinal, principalmente a la mitad dorsal, incluyendo ambos CSTs principales: trazando el CST en animales de control se mostró un grado moderado de brote reactivo del tracto. Este
15 fenómeno corresponde al brote espontáneo en respuesta al daño bien conocido en la literatura. Las ratas dañadas fueron tratadas con las moléculas de unión de la invención o con bombas suministrando las moléculas de unión de la invención, y se pudo ver un brote mejorado en el sitio de lesión y la
20 regeneración de excreción de neurita de axones dañados de neuritas dañadas. Además, los animales pudieron mostrar una recuperación mejorada de las funciones sensoriomotoras. Dichas pruebas funcionales se describieron previamente (Merkler y otros, 2001, J Neuroscience 21,3665-73.

45
A

3. Distribución de tejido de anticuerpos en el sistema nervioso central de monos adultos

El anticuerpo 3A6 se purificó como IgG y se concentró a 3 mg/ml en PBS. Se utilizó IgG derivado de suero de ratón (Chemicon Int., Temecula/CA, USA) o un mAB dirigido contra la auxina de trigo (AMS Biotechnology, Oxon/UK), como tratamientos de control. Se utilizaron dos monos macacos adultos macho (*Macaca Fascicularis*) en este estudio para la infusión intratecal.

10

Procedimientos quirúrgicos

Se indujo anestesia a través de inyección intramuscular de cetamina (Ketalar®, Parke-Davis, 5 mg/kg, i m) Se inyectó, i m , atropina (0.05 mg/kg) para reducir secreciones bronquiales. Un catéter intravenoso se colocó en la vena femoral para una continua perfusión con una mezcla de propofol 1% (Fresenius®) y una solución de glucosa al 4% (un volumen de propofol y 2 volúmenes de solución de glucosa), induciendo una anestesia muy profunda. El animal después se colocó en una estructura de trabajo estereotáxica. Bajo condiciones estériles, se realizó una incisión en la piel de línea media vertical de CD a Th1. El corte de fascia y los procedimientos espinales de CD a Th1 se expusieron. Los músculos para vertebrales se retrajeron y las láminas de C6, C7 y Th1 se disectaron. Una laminectomía de C6 completa y una

25

hemilaminectomia completa y una hemilaminectomia de C7 superior después se realizaron. La dura madre se expuso y se cortó longitudinalmente por arriba de los séptimo y octavo segmentos espinales cervicales, correspondiendo a la zona rostral de la porción espinal cubierta por la sexta lámina cervical. Se insertó un tubo de polietileno (con una longitud de 10 cm), conectado a una bomba osmótica (Alzet®, 2 ML1, flujo 50 µg/hr), suministrando el anticuerpo hNogo-A, por debajo de la dura madre y se empujó algunos milímetros rostralmente y se unió a la dura madre con una sutura. La bomba osmótica se colocó y se aseguró en una cavidad hecha en la masa de músculos traseros pocos centímetros más baja que la laminectomía sobre el lado izquierdo. El tubo se aseguró a lo largo de su trayectoria con suturas al tejido muscular. Los músculos y la piel se suturaron y el animal se recuperó de la anestesia usualmente en 15-30 minutos después de la interrupción de la perfusión venosa con propofol. El animal se trató después de la operación con un antibiótico (ampicilina 10%, 30 mg/kg, s.c.). Se proporcionaron diariamente durante 1 semana dosis adicionales de Carprofen.

Los monos se sacrificaron 8 días después del implante de la bomba osmótica. Primero se indujo la sedación con cetamina, como se mencionó anteriormente, seguido por una anestesia profunda obtenida a través de inyección i.p. De una dosis letal de pentobarbital (90 mg/kg). Los animales fueron

47
46

profundidos trascardiamente con 0.4 litros de salina al 0.9%,
seguido por 4 litros de fijador (solución al 4% de
paraformaldehído en 0.1 M de regulador de pH de fosfato, pH =
7.6). La perfusión se continuó con 3 soluciones de sacarosa de
5 una concentración en incremento (10% en fijador, 20 y 30% en
regulador de pH de fosfato)

Procedimientos histológicos, inmunofluorescencia e histoquímica

Se disectaron cuidadosamente cerebros y médulas
10 espinales de los monos, se crio-protegieron en sacarosa al 30%
y se seccionaron a 40 µm en un crioestato. Para la detección de
mABs infundidos, se utilizó un anticuerpo secundario anti-
humano (Jackson Laboratories). Para una doble marcación, se
pueden utilizar los siguientes anticuerpos: AS472 de conejo
15 (afinidad purificada) para Nogo-A endógeno (Chen, 2000),
anticuerpos de conejo contra GFAP para astrositos, y un
anticuerpo de conejo contra Catepsina D (DAKO) para
localización lisosómica. Todos antisueros fueron visualizados a
través de TRITC o FITC acoplado con anticuerpos secundarios
20 correspondientes, o utilizando el sistema ABC-DAB (Vector)

Las secciones se analizaron a través de
epifluorescencia en un Zeiss Axiophot o a través microscopio
confocal (ZEISS LSM 410).

Las médulas espinales se analizaron en el sitio de
25 infusión y 6 cm de caudal hacia las mismas. Se presentaron

48
A7

altos niveles de 3A6 en el sitio de infusión. En la médula espinal más caudal, el canal central y la superficie de la médula se marcaron fuertemente, mientras que materia gris y la materia blanca mostraron una marcación más homogénea, la cual, sin embargo, es específica y claramente sobre el fondo. Una situación similar se presentó en el cerebro anterior con fuerte marcación de la superficie y ventrículos y buena presentación del anticuerpo Novo-A en el parénquima.

Estos experimentos muestran que la infusión intratecal espinal de anticuerpos contra un antígeno de superficie de célula del sistema nervioso central conduce a una buena distribución del anticuerpo a través de la circulación de CSF en los espacios de licor internos (ventrículos, canal central) y externos. Los anticuerpos de IgG penetran muy bien en el cerebro y el tejido de la médula espinal. Mientras que el IgG de control se eliminó rápidamente, el anticuerpo contra Nogo-A se retuvo en el tejido.

4. Pruebas para la reparación de nervios y mejora funcional en lesiones espinales en monos

Se indujo anestesia a través de inyección intramuscular de cetamina (Ketalar®, Parke-Davis, 5 mg/kg, i.m.) Se inyectó, i.m., atropina (0.05 mg/kg) para reducir secreciones bronquiales. Un catéter intravenoso se colocó en la vena femoral para una continua perfusión con una mezcla de

propofol 1% (Fresenius®) y una solución de glucosa al 4% (un volumen de propofol y 2 volúmenes de solución de glucosa), induciendo una anestesia muy profunda. El animal después se colocó en una estructura de trabajo estereotáxica. Bajo condiciones estériles, se realizó una incisión en la piel de línea media vertical a partir de C2 hacia Th1. El corte de fascia y los procedimientos espinales de C2 a Th1 se expusieron. Los músculos para vertebrales se retrajeron y las láminas de C6, C7 y Th1 se disectaron. Una laminectomía de C6 completa y una hemilaminectomía C7 superior después se realizaron. Con el fin de suministrar las moléculas muy cerca de la lesión, la punta libre de un tubo de polietileno unido a la bomba se fijó por debajo de la dura madre a pocos milímetros en forma rostral hacia la lesión.

Se pueden realizar pruebas de destreza manual de comportamiento de acuerdo con el procedimiento publicado. La destreza manual es entrenada colocando al mono sentado en una silla de primate enfrente de un "tablero de Brinkman" modificado con Perspex (10 cm x 20 cm) conteniendo 50 agujeros aleatoriamente distribuidos; 25 agujeros estando orientados horizontalmente y 25 verticalmente {Liu, 1999 15428/id, Rouiller, 1998 13239/id} 2.7 La regeneración y el brote de fibras pudieron ser analizadas como se describió. El rastreador de grado anterior inyectado en el hemisferio derecho fue dextramina biotinilada (BDA, Molecular Probe®, 10% en

50
A

salina). En el hemisferio izquierdo, se inyectó el rastreador, fluoresceína-dextran, de grado anterior fluorescente (Molecular Probe®, 10% en salina) Se realizó un procedimiento histológico para visualizar los rastreadores como se describió previamente
5 con detalle {Rouiller, 1994 8322/id}

Por lo tanto, la invención también proporciona:

- (i) el uso de las moléculas de unión de la invención en la reparación de nervios de un sistema nervioso de mamífero, en particular un sistema nervioso humano,
- 10 (ii) un método para reparar nervios de un sistema nervioso de mamífero, en particular el sistema nervioso humano, el cual comprende administrar una cantidad efectiva de las moléculas de unión de la invención a un paciente con la necesidad de dicho tratamiento, o
- 15 (iii) una composición farmacéutica para reparar medios de un sistema nervioso de mamífero, en particular el sistema nervioso humano, que comprende las moléculas de unión de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable
- 20 En particular, las moléculas de unión de la invención son útiles para la regeneración axonal y brote mejorado después del daño de fibras nerviosas. De esta manera, las moléculas de la invención tienen una amplia utilidad, en particular, para seres humanos. Por ejemplo, la molécula de unión de la invención es
25 útil en el tratamiento de varias enfermedades del sistema

nervioso periférico (PNS) y central (CNS), es decir, más particularmente en enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ALS),patología de tipo Lewy u
5 otros tipos de demencia en general, enfermedades después de trauma craneal, cerebral o espinal, choque o una enfermedad de desmielinación Dichas enfermedades de desmielinación incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple, desmielinación monofásica, encéfalomielitis, leucoencefalopatía
10 multifocal, panencefalitis, enfermedad de Marchiafava-Biognami, mielmolisis de pontina, adrenoleucodistrofia, enfermedad de Pelizaeus Merzbacter, degeneración esponjosa, enfermedad de Alexander, enfermedad de Canavan, leucodistrofia metacromática y enfermedad de Krabbes. En un ejemplo, se
15 puede utilizar la administración de las moléculas de unión de la invención para tratar una enfermedad de desmielización asociada con la proteína NogoA En otro ejemplo, las células que expresan las moléculas de unión de la invención pueden ser transplantadas a un sitio de daño de médula espinal para
20 facilitar el crecimiento axonal a través de todo el sitio dañado Dichas células transplantadas podrían proporcionar un medio para restaurar la función de la médula espinal después de un daño o trauma Dichas células pueden incluir células envainadoras olfativas y células de tallo de diferentes linajes de
25 nervios fetales o injertos de tejido.

El efecto del bloqueo de Nogo-A retrasado a largo plazo en recuperación funcional y elasticidad neuro-anatómica en ratas adultas después de choque fue el tema de un resumen publicado por Shih-Yen Tsai, Anay Pradham, Josh Rosales, Anis K Mir, Martín E. Schwab, Gwendolyn L. Kartje un 2004. Se administró el anticuerpo anti-amino Nogo-A purificado utilizando bombas osmóticas a ratas adultas 8 semanas después de una oclusión de arteria cerebral media (MCAO). Se examinó la recuperación de la función utilizando la prueba de obtención de extremidad anterior y la prueba de caminata en el daño de escalera. Los resultados preliminares mostraron que aún cuando se trató con un bloqueo de anti-amino Nogo-A 2 meses después del choque, la recuperación de la función se mejoró.

Además, las moléculas de unión de la invención son útiles para el tratamiento de trastornos oculares degenerativos, los cuales pueden directa o indirectamente involucrar la degeneración de células retinales o córneas incluyendo retinopatías isquémicas en general, neuropatía óptica isquémica anterior, todas las formas de neuritis óptica, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, edema macular cistoide (CME), retinitis pigmentosa, enfermedad de Stargardt, degeneración retinal viteliforme de Best, amaurosis congénita de Leber, y otras degeneraciones retinales hereditarias, miopía patológica, retinopatía de prematuros, y neuropatía óptica hereditaria de Leber, los efectos posteriores

53
52

de trasplante de córnea o de cirugía córnea refractiva, y queratitis por herpes.

Además, las moléculas de unión de la invención son útiles para el tratamiento de condiciones psiquiátricas, particularmente esquizofrenia y depresión

Para esas indicaciones, la dosis apropiada, por supuesto, variará dependiendo de, por ejemplo, la molécula de la invención particular que será empleada, el modo de administración y la naturaleza y severidad y la condición que se va a tratar. En general, la dosis preferiblemente estará en la escala de 1 µg/kg/día a 1 mg/kg/día. Las moléculas de unión de la invención son convenientemente administradas a través de bombas o inyectadas como terapéuticos en el sitio lesionado, por ejemplo, pueden ser administradas directamente en el sistema nervioso central intracranealmente o en la espina intratecalmente hacia el sitio lesionado

Las moléculas de unión de la invención pueden provistas solas o en combinación, o en combinación secuencial con otros agentes. Por ejemplo, las moléculas de unión de la invención pueden administradas en combinación con agentes antiinflamatorios tales como, pero no limitándose a, corticoesteroides después de choque o daño de médula espinal como un medio para bloquear un daño adicional neuronal y para la inhibición de regeneración axonal, factores neurotróficos tales como NGF, BDNF, u otros fármacos para enfermedades

54

neurodegenerativas tales como Exelon™ o Levodopa. Otros patrones de combinación adecuados para el tratamiento de choque son Ateplase y Desmoteplase (DSPA, por ejemplo, descritos en WO 90/09438). En una modalidad, la presente invención proporciona una combinación que comprende una molécula de unión de la invención y Desmoteplase, en particular para el tratamiento de choque así como composiciones farmacéuticas que comprenden dicha combinación. Como se utiliza aquí, dos agentes se dicen que se van a administrar en combinación cuando los dos agentes son administrados simultáneamente o se administran independientemente en una forma que los agentes actuarán al mismo tiempo.

La estructura de los ingredientes activos identificados por números de código, nombres genéricos o nombres comerciales puede ser tomada de la edición actual de compendio estándar "The Merck Index", o de base de datos, por ejemplo, patentes internacionales (por ejemplo, publicaciones mundiales de IMS) u otras bases de datos provistas por la salud de IMS. Su contenido correspondiente se incorpora aquí por referencia. Cualquier experto en la técnica está totalmente habilitado para identificar los ingredientes activos y, basándose en estas referencias, asimismo habilitados para fabricar y probar las indicaciones farmacéuticas y propiedades en modelos de prueba estándares, tanto *in vitro* como *in vivo*.

58
A

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser fabricadas en una forma convencional. Por ejemplo, una composición de acuerdo con la invención, comprendiendo las moléculas de la invención, preferiblemente se proporciona en
5 forma liofilizada. Para una administración inmediata, se disuelve en un vehículo acuoso adecuado, por ejemplo, agua estéril para inyección o salina fisiológica regulada en su pH estéril

Para ayudar a hacer composiciones adecuadas, las
10 moléculas de unión de la invención y opcionalmente un segundo fármaco que mejore el efecto de las moléculas de unión de la invención, pueden ser empacados en forma separada dentro del mismo recipiente, con instrucciones para el mezclado o administración concomitante. Se proporcionan anteriormente
15 candidatos de fármaco secundarios y opcionales

El efecto sinérgico de una combinación de las moléculas de unión de la invención y factores de crecimiento tales como NGF, pueden ser demostrados *in vivo* a través de los modelos de daño de médula espinal.

20 La invención se entenderá más completamente haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, éstos no deben ser construidos como limitantes del alcance de la invención

En los siguientes ejemplos, todas las temperaturas
25 están en grados Celsius (°C)

56
56

El anticuerpo monoclonal de atención en los ejemplos es una molécula de unión de acuerdo con la presente invención, que comprende la parte variable de la cadena ligera (SEC ID NO:3) y la parte variable de la cadena pesada (SEC ID NO.2).

5 Se utilizaron las siguientes abreviaturas:

	ELISA	ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzima
	FACS	clasificación de célula activada por fluorescencia
	FITC	isotiocianato de fluoresceína
10	FBS	suero de bovino fetal
	HCMV	promotor de citomegalovirus humano
	IgG	isotipo G de inmunoglobulina
	MAb	anticuerpo monoclonal
	PBS	salina regulada en su pH con fosfato
15	PCR	reacción de cadena de polimerasa

Ejemplo 1: Métodos

Generación de construcciones de expresión de Nogo-A humano (pRK7-hNogo-A): se clasificó una colección de ADNc humano construido en lambda gt10 (Clontech) con grupos de filtro por duplicado utilizando procedimientos estándares. Los fragmentos de Nogo-A humano se amplificaron a través de PCR a partir de ADNc de cerebro entero humano (Clontech) utilizando un protocolo estándar y subsecuentemente se clonó a pBluescript, fueron digeridos y se asilaron, o se utilizaron como

20

25

sondas de clasificación en forma directa. Se utilizó un fragmento de XhoI/SmaI de 400 bp como la sonda 5', y la sonda 3' se amplificó con los cebadores CA-NA-2F' 5'-AAG CAC CAT TGA ATT CTG CAG TTC C-3' (SEC ID NO 29) y CA-NA-3R 5'-
5 AAC TGC AGT ACT GAG CTC CTC CAT CTG C-3' (SEC ID NO.30). Se aislaron clones positivos, se subclonaron y se confirmó la secuencia. Para obtener un ADNc de Nogo-A humano de longitud completa, se ensamblaron clones de traslape utilizando un sitio de restricción único EcoRI en la
10 secuencia de Nogo-A humano y se subclonaron en el vector, denominado PbsnogoA. Para obtener pRK7-hNogo-A, se insertó el ADNc de longitud completa en el vector de expresión eucariótico pRK-1 a través de clonación direccional

Plásmidos de expresión (ET28a-hNiG) de NiG humano
15 *(hNiG) para producción bacteriana:* Se subclonó un fragmento de ADN que codifica hNiG en BamHIXhoI de pET28a (Novagen), después de amplificación de PCR de la región de codificación respectiva de PbsnogoA, en un marco con la etiqueta His- y T7 N-termina para expresión bacteriana, utilizando grupos de
20 cebador anterior 5'-GTC GCG GAT CCA TGG AGA CCC TTT TTG CTC TTC-3' (SEC ID NO.31), inverso 5'-GTT CTC GAG TTA TGA AGT TTT ACT CAG-3' (SEC ID NO 32) El plásmido final se denominó pET28a-hNiG. Después, el hNiG fue expresado en E Coli BL21 pRP a través de la inducción con 1 mM de isopropil-
25 beta-D-tiogalactopiranosida (IPTG)

Generación del plásmido de expresión NiG-exón-3 de ratón (mNiG-exón-3). La región que codifica el exón 3 de ratón se amplificó a partir de la plantilla de BAC de genoma de ratón con los cebadores: anterior 5'-GTG CGG ATC CAT GGA TTT
5 GAA GGA GCA GC-3' (SEC ID NO 33); inversa 5'GTT TCT GCA GTG AAG TTT TAT TCA GCT C-3' (SEC ID NO.34), y se subclonó en los sitios de clonación BamHI/XhoI de pET28a. La construcción de plásmido final se denominó pET28a-mNig-exón3

Clonación de NiG de mono. Se aisló ARN polIA de
10 tejido de cerebro de mono congelado y el ADNc se sintetizaron utilizando un cebador oligo dT. Dos fragmentos traslapantes cubriendo la región 5' y 3' del ADNc fueron amplificados a través de PCR utilizando cebadores de secuencia específica y una enzima de prueba de lectura. Los cebadores se designaron
15 utilizando la secuencia conocida del ADNc de NiG humano. Para la amplificación del fragmento 5' los cebadores son 5'-TCCACCCCGGCCGCGCCCAA-3' (SEC ID NO:35) y 5'-AATGATGGGCAAAGCTGTGCTG-3' (SEC ID NO 36), para el fragmento 3', 5'GGTACAAAGATTGCTTATGAAACA-3' (SEC ID
20 NO:37) y 5'-AGCAGGGCCAAGGCAATGTAGG-3' (SEC ID NO 38). Los dos fragmentos después se subclonaron y para cada fragmento por lo menos se secuenciaron 4 clones independientes. El ADNc de longitud completa fue ensamblado a través de PCR de traslape utilizando los cebadores mencionados
25 anteriormente y el producto resultante se clonó y se secuenció

5A
75

de nuevo

La producción de proteína de Nogo NiG recombinante se definió como antes. La colección de eliminación de Nogo-A bacteriano se expresó en *Escherichia coli*. Se extrajeron las proteínas ya sea a través de aplicación de sonido repetido en regulador de pH de sonido (20 mM Tris, 50 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 8.0) con 0.75 mg/ml de lisozima, a través de solubilización con B-Per™ (Pierce) o con 8 M de urea. Se obtuvo el NiG expresado con el líder pelB del espacio periplásmico de acuerdo con el protocolo de Novagen para la purificación de proteína periplásmica. Los sobrenadantes de las construcciones PET28 se purificaron utilizando el método CO^{2+} -Talcon™ Metal Affinity Resin (Clontech) en un procedimiento intermitente. 8 M de urea y los lisatos solubilizados B-Per™ se llevaron a condiciones de no desnaturalización sustituyendo en forma incrementada el regulador de pH con regulador de pH de sonido durante el procedimiento intermitente de resina. Las proteínas se eluyeron con 250 mM de imidazol en regulador de pH de sonido en una columna de gravedad (BioRad). Las proteínas de NiG se purificaron adicionalmente a través de filtración de gel en Superdex 200 HiLoad 16/60. Los sobrenadantes de las construcciones de pGEX-6P se purificaron con una columna de G-sefarosa en un procedimiento intermitente de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Amersham Pharmacia). Se realizó la escisión de GST-Nogo-66 incubando

66
09

GST-Nogo-66 solubilizado con proteasa Pre-Scission y subsecuente purificación mediante HPLC. Se realizó la electroelución de gel a través de SDS-PAGE de preparación de Nogo recombinante purificado con IMAC y la elución con BioRad Electro-Eluter en 50 mM de Tris, pH 7.4, 100 mM de NaCl, 0.2% (p/v) CHAPS durante 1 hora a 250 mA y seguido por 30 segundos de polaridades invertidas de electrodo. Se determinaron las concentraciones de proteína de proteínas purificadas mediante cromatografía, utilizando Pierce Coomassie Stain and BSA como proteína estándar. Se calcularon las concentraciones de proteína de gel que eluyó proteínas basándose en una intensidad de banda de geles teñidos con plata (Merril CR, Dunau ML, Goldman D (1981). Una rápida tinción de plata sensible para polipéptidos en geles de poliacrilamida. *Analyt. Biochem.* 110:201-207) con BSA como un estándar.

Ejemplo 2: Generación De Mab De 3a6-Igg Humano

Se inmunizaron subcutáneamente ratones Medarex (recombinantemente reconstituidos con genes de inmunoglobulina humana) con NiG humano, correspondiendo a una secuencia particular en Nogo-A humano. Se generó el anticuerpo monoclonal 3A6 a través de tecnología de hibridoma estándar mediante la fusión de las células del bazo del ratón con una línea de célula de hibridoma.

La inmunización de ratones Medarex se realizó con NiG humano 70 ug/ratón en la parte posterior del cuello y costados, concentración s.c. 1.5 mg en 1.9 ml de V/v mezclado con auxiliar de titulación máxima. La inyección de 180 µl s.c./ratón y subsecuentemente se reforzaron varias veces.

La determinación de las titulaciones Ab de anti-Nogo en el suero con ELISA se realizó en placas de 96 cavidades que fueron cubiertas con 8 ug/ml de NiG humano en PBS (100 µl/cavidad). Se incubaron 4 horas a temperatura ambiente (RT).

10 Las placas se salpicaron y se volvieron a llenar con 200 µl/cavidad con regulador de pH de bloqueo (PBS+5% BSA), se cubrieron y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4 grados, después se lavaron 4 veces con agua corriente, se volvieron a llenar con PBS y se salpicaron.

15 Se diluyó suero de ratón en PBS+10% FCS (100 µl/cavidad), y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4 grados. Las diluciones de suero de ratón utilizadas fueron 1:100, 1:1000, 1:10,000, 1:30,000. Se repitió el paso de lavado. Se diluyó el conjugado Ab de HRP específico de Fc de

20 IgG de anti-humano de F(ab')₂ de cabra en PBS/0.1% BSA/0.1% Noridet 40 (100 µl/cavidad) y se incubó 2 horas temperatura ambiente o durante la noche a 4 grados. Se repitió el paso de lavado. Se agregaron 100 µl/cavidad del substrato de POD de azul BM y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente

25 durante 15 minutos y se agregaron 50 µl/cavidad de 1 M H₂SO₄

61

para retener la reacción del sustrato HPR. La O·D se determinó utilizando un lector de microplaca fijado a 450 nm. Se realizó la clasificación de hibridomas y clones con ELISA como se describió anteriormente. El NiG humano (8 µg/ml, E. Coli).

5 Isotipificación de IgG con ELISA. Se realizaron experimentos para determinar la subclase de IgG de los anticuerpos. Las placas se cubrieron con NiG humano y se utilizaron sobrenadantes de cultivo a diluciones de 1·10 a 1·100. Se evaluó la reactividad de los anticuerpos utilizando un panel de

10 mAbs conjugado con HRP de la subclase IgG antihumano de ratón (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) a través de incubación durante 4 horas. Se utilizó mAb de IgG 1 anti-MCP1 como control positivo. El ensayo de ELISA se realizó como se describió anteriormente. Se realizó la generación de hibridomas a partir de los ratones

15 con las titulaciones suero más altas contra NiG humano en el ELISA y se seleccionó para fusión. El ratón fue sacrificado a través de inhalación de CO₂. Se tomó asépticamente el bazo y se hizo una suspensión de célula individual. Se lavó en calcio de PBS, libre de magnesio. Las células de mieloma de ratón

20 (PAIO) se lavaron en PBS. Se agregaron números iguales de 50 millones de células de bazo de ratón con células de mieloma de ratón y se hicieron girar a temperatura ambiente durante 10 minutos, 900 RPM. El sobrenadante se retiró cuidadosamente y completamente. Se agregaron gota a gota 1 ml de PEG 4,000

25 como agente de fusión (50:50 en PBS) bajo agitación con luz.

63
Q

durante 2-3 minutos a temperatura ambiente Se agitó moderadamente en un baño de agua a 37 grados durante 90 segundos. Se agregaron gota a gota de 5 a 10 ml del medio RPMI 1640 durante 5 minutos para diluir el PEG, a temperatura ambiente durante 10 minutos Se agregaron otros 20 ml de medio libre de suero y se centrifugó. Se volvió suspender en una cantidad apropiada del medio HAP (RPMI más 10% FCS + 20 ml/litro 50x HAT). Las células fusionadas se colocaron en placas en 100 µl/cavidad, en cavidades conteniendo una capa alimentadora de células peritoneales de ratones Balb/c (1 ml/cavidad)

La preparación de células peritoneales de ratón se realizó 24 horas antes y se prepararon cultivos de 1 ml en el medio Hat, una placa Costar de 24 cavidades El rendimiento de un ratón es suficiente para una placa de 24 cavidades igual a aproximadamente 2,000 células/cavidad Después del sacrificio, la cavidad peritoneal se lavó en 5 ml de 0.34 M de sacarosa, utilizando una jeringa de 10 ml y un calibre de aguja 18 Se reunieron grupos de 6 ratones en un tubo, se centrifugaron y se volvieron a suspender en el medio HAT y se formaron alícuotas en las cavidades

El medio de cultivo fue RPMI 1640 con Glutamax, conteniendo 100 µM de hipoxantina, 1.6 µM de timidina, 0.4 µM de aminoptina, 50 µM de beta-mercaptoetanol, 50 µg/ml de gentamicina, FCS inactivado con calor al 10% El medio se

6A
6B

intercambió con 50% cada tercer o cuarto día, dependiendo de la velocidad de crecimiento y de la aparición de hibridomas y después de 14 días de que el medio de HAT se intercambié con un medio de HT dejando fuera aminoptina. La clasificación de hibridomas y la generación de clones así se probaron sobrenadantes cuando las cavidades alcanzaron aproximadamente 80% de confluencia a una dilución de 1:3 en ELISA como se describió anteriormente. Se realizó la clonación de célula individual a partir de hibridomas que fueron positivos para Ab anti-Nogo mediante dilución de limitación. La clonación se realizó mediante dilución de limitación, colocando en placas 0.5 células/100 µl/cavidad. Se establecieron 4 x 96, 100 µl cavidades. Se utilizaron células de PE de ratón para la capa alimentadora. El crecimiento clonal se verificó microscópicamente, se agregaron 100 µl del medio un día antes de realizarse la clasificación. Las velocidades de crecimiento de hibridomas individuales variaron, pero aproximadamente 10 días se necesitaron para que los cultivos estuvieran lo suficientemente densos para producir suficiente anticuerpo. La clasificación de sobrenadante se realizó a una dilución de 1:10, 1:100. La expansión de cultivo de clones positivos se realizó y se adaptó para reducir condiciones de suero de 1% para la producción en botellas de rodillo y la purificación se realizó a partir de sobrenadantes de cultivo utilizando afinidad de proteína A.

65
6A

Ejemplo 3: Producción Y Purificación De Mab De 3a6 De Ratón Y Fab 3a6

Se utilizó una columna de Sepharose Cl-4B de proteína A (Pharmacia; altura del lecho 11 cm) En resumen, el
5 sobrenadante de cultivo después de una corrección del pH a 8.1 se cargó a 5 ml/minuto y la columna se lavó a una línea de base a 8 ml/minuto utilizando 100 mM Na_2HPO_4 , pH 8.1. El material unido se eluyó finalmente a 8 ml/minuto utilizando 50 mM NaH_2PO_4 , pH 3.0, 140 mM NaCl e inmediatamente se neutralizó
10 (pH 7.0) con 5 N de NaOH y se filtró en forma estéril. Se verificó la absorbancia 280 nm La porción del material purificado finalmente se concentró adicionalmente a través de ultrafiltración y/o se dializó contra PBS. Todos los reguladores de pH utilizados en la purificación se filtraron en un dispositivo
15 de flujo tangencial 10 kDa ULTRASETTE™ (Filtron Technology Corporation) con el fin de remover posibles tontaminaciones de endotoxina. Por la misma razón, la resina de proteína A se lavó extensamente con etanol al 20% y todas las tuberías/bombas se trataron con 0.1 M de NaOH antes de uso Se midió la
20 concentración de proteína espectrofotométricamente a 280 nm utilizando una absorción de referencia de 1.35 para 1 mg/ml. La pureza se analizó en forma rutinaria a través de SDS-PAGE bajo condiciones de reducción utilizando geles de gradiente Novex al 4-20%. Se midió el contenido de endotoxina a través de la
25 reacción de lisato de Limulus Amoebocyte (LAL) clásico de

66
65

acuerdo con las instrucciones del fabricante (Endotell Ag, Allschwil, Suiza).

Generación de fragmentos F_{ab} Una porción de mAb de 3A6 de ratón se dializó extensamente contra 100 mM de acetato de sodio, pH 5.5, 2 mM de EDTA y se ajustó a una concentración de 6 mg/ml. Se generaron fragmentos de F_{ab} a través de digestión con papaina (relación p/p 1 200) en presencia de 0.25 mM de cisteína. La reacción se dejó proseguir durante 16 horas a 37°C y después se detuvo a través de la adición del inhibidor de papaina específico E64 (N-[N-(L-3-trans-carboxirana-2-carbonil)-L-leucil]-agmatina) en un gran exceso (10 μ M). El anticuerpo ingerido después se pasó a través de una columna de proteína A de flujo rápido de Sepharose con el fin de remover el material intacto y los fragmentos de F_c . La fracción de F_{ab} se dializó extensamente contra PBS y se concentró a aproximadamente 3 mg/ml. (La papaina y E64 son de Roche Molecular Biochemicals)

Ejemplo 4: Hplc, Espectrometría De Masa Y Secuenciación De Aminoácido N-Terminal De La Región V_L Y V_H

a) Reducción y alquilación: se disolvieron anticuerpos 3A6 secos, purificados en 40 μ l de 8 M de urea, 0.4 M de NH_4HCO_3 , pH 8.3. 60 μ g de DTT (Calbiochem), predisoluto en 10 μ l del mismo regulador de pH como la proteína, fueron

47
80

agregados Se realizó la reducción a 50°C durante 30 minutos bajo argón (100 veces el exceso molar de DTT sobre tioles de proteína). Después de la reducción, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente Se agregaron 304 µg de yodoacetamina
5 (Sigma Ultra, I-1149) en el mismo regulador de pH como la proteína. Se realizó la carboxamidometilación a temperatura ambiente durante 15 minutos en la oscuridad. Se agregó 1 µl de β-mercaptoetanol para extinguir la reacción

b) Aislamiento de cadena pesada y ligera. Se
10 aislaron cadenas pesada y ligera carboxiamidometiladas del anticuerpo a través de cromatografía de líquida de alta presión de fase inversa (RP-HPLC) en un sistema de 1090 M de HPLC de Helett Packard con un sistema de bombeo DR5 y un detector de UV de arreglo de diodo Las condiciones para la cromatografía
15 fueron: columna de 2.1 x 100 mm de PerSeptive Biosystems Poros empacada con un material de R1/H; flujo de 0.5 ml/minuto; solventes: (A) TFA al 0.1% en agua y (B) TFA al 0.09%/acetonitrilo/agua, 9:1, gradiente 25-70% B en 8 minutos a 80°C; detección a 218/280 nm

20 c) LC-ESI-MS: Se realizó la espectrometría de masas utilizando un espectrómetro de masas en tandem híbrido de tiempo de vuelo de 4 polos Q-Tof (Micromass, Manchester, UK) equipado con una fuente de ionización de electroaspersión de tipo Z Micromass (ESI). La escala de masa de adquisición
25 típicamente es m/z 500-2000. Los datos se registraron y se

6/8
67

procesador utilizando el software MassLynx. Se logró la calibración de la escala de 502-2500 m/z utilizando los picos de ión de carga múltiple de mioglobina de corazón de caballo (MW 16951.5).

- 5 d) HPLC-MS de cadena pesada y ligera. La separación de la cadena pesada y ligera reducida y carboxamidometilada se realizó en un sistema de HPLC HP1100 (Hewlett Packard, Palo alto, CA, USA), empleando una columna de 1 mm x 150 mm de LC Packing empacada con Perseptive Biosystems POROS R1/H. La columna se mantuvo a 60°C. Se inyectaron volúmenes de muestra de 10 µl en la columna utilizando un automuestreador CTC PAL (CTC, Zwingen, Suiza), se filtró con una válvula de HPL modelo C6UW Valco (Valco, Houston, TX, USA) y un lazo de inyección de 10 µl. La HPLC se controló a través de software MassLynx (Micromass, Manchester, UK). La detección de UV es a 214 nm. El eluyente A es agua conteniendo TFA al 0.05%. El eluyente B es una mezcla de 1:9 de agua acetonitrilo conteniendo 0.045% de TFA. Un gradiente de 20% B a 90% B se operó en 20 minutos a 80°C. La velocidad de flujo típicamente fue de 60 µl/minuto. El flujo total a partir del sistema LC se introdujo en la célula de detección UV, después la fuente ESI sin ninguna separación. El sistema HPLC se controló y la señal del detector UV se procesó utilizando el software MassLynx (Micromass, Manchester, UK). Se detectaron las siguientes 5 señales.

6A
6B

Tabla 1:

5	Medido	Interpretación de Señal
	A = 50614 2 Da	Cadena pesada con carxamidometil- cisteína (CAMCys)
	B = 5077645 Da	Señal A+162 Da (= hexosa)
	E = 23727 8 Da	Cadena ligera con CAMCys

e) Secuenciación de aminoácido N-terminal de las regiones V_L y V_H. Se utilizaron picos de cadenas pesada + ligera reunidos a partir de HPLC para análisis de secuencia. Se determinaron las secuencias de aminoácido en un sistema de secuenciación de proteína N-terminal G1000A de Hewlett Packard. El sistema realiza la química Edman automática en muestras de proteína en muestras de proteína retenidas en columnas bifásicas de adsorción de miniatura. Se utilizó un método de química optimizada (doble acoplamiento 3.0) para mejorar la eficiencia química, reducir al mínimo las interrupciones y con esto extender el análisis de secuencia aproximadamente 50 residuos. Se realizó el análisis de PTH-aminoácidos en un sistema de HPLC de Hewlett Packard HP 1090 en línea, equipado con un sistema de bombeo ternario y una columna de PTH de agujero estrecho (2 1 mm x 25 cm).

Resultados

A partir del análisis de masas, se determinaron las cadenas pesada y ligera homogéneas de 3A6-IgG1 de ratón. La

cadena pesada está individualmente glicosilada El análisis total de masas de la cadena pesada y ligera muestra una masa individual para ambas cadenas. La cromatografía de HPLC de 3A6-IgG1 de ratón muestra un pico individual Después de
5 purificación de HPLC seguido por la reducción y alquilación de cadena pesada y ligera están disponibles Se realizó la degradación de secuencia N-terminal en la cadena ligera y la cadena pesada Los aminoácidos de la secuencia N-terminal de la cadena ligera y la cadena pesada se identificaron a través de
10 degradación de secuencia.

Cadena Ligera

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS

15 Cadena Pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF

Ejemplo 5: Clonación De Los Genes De Cadena Pesada Y Ligera De mAb De 3a6 Humano

20 Se preparó ARN total a partir de 10^7 células de hibridoma (clon 3A6) utilizando el reactivo TriPure (diagnóstico Roche, Alemania, No. De catálogo 1667157) de acuerdo con las instrucciones del fabricante Para la síntesis de ADNc, se aisló ARNm del ARN total preparado anteriormente utilizando la resina
25 Oligotex Resin (Qiagen, Alemania, No. De catálogo 70022)

7/20

Se generó ADNc a través de transcripción inversa utilizando las siguientes condiciones: 2 µl de ARNm, y 2 µl 10 veces de regulador de pH de transcripción inversa, 2 µl de cebador (dT)₂₀ (10 µM), 0.5 µl de Rnasin (Promega, 40 U/ml), 2 µl dNTPs (5 mM cada uno), 1 µl de transcriptasa inversa Omniscript™ (Qiagen, No. De catálogo 205110), 10.5 µl de ddH₂O, reacción: 1 hora a 37°C. Para amplificación de PCR del ADNc que codifica para las regiones V_H y V_L, se utilizó la polimerasa de ADN ProofStart™ de enzima a prueba de lectura.

10 PCR de cadena ligera y pesada. En mezcla de reacción: 2 µl de DNAc, 5 µl 10 veces regulador de pH de reacción, 3 µl de dNTPs (5 mM cada uno), 2 µl de cebador 5' (10 µM) (ver Cuadro 2), 2 µl de cebador 3' (10 µM) (ver Cuadro 2), 1 µl de ProofStart (Qiagen, No. De catálogo 202203), 36 µl

15 ddH₂O. Condiciones de PCR: 95°C/5 minutos (95°C/40 segundos, 53°C/ 1 minuto, 72°C 1 minuto) x 35, 72°C/10 minutos. Los productos de PCR resultantes se ligaron directamente a pCRbluntTOPO (Invitrogen). La mezcla de ligación fue transfectada a células TOP 10 (Invitrogen) y se

20 recogieron varios clones. La secuencia de nucleótido de la parte variable de la cadena pesada del mAb de 3A6 (V-H, SEC ID NO:43) y de la cadena ligera del mAb de 3A6 (V-L, SEC ID NO:44, se determinaron los ADNcs en un secuenciador ABI. Los

25 10 clones de los ADNcs de cadena ligera de mAb3A6 de dos experimentos independientes (ARN → ADNc → RT-PCR) fueron

7/21

secuenciados y se alinearon. La secuencia de aminoácido subsecuente de V-H y V-L se muestra en SEC ID NO 2 (V-H) y SEC ID NO 3 (V-L). Los cebadores utilizados para la amplificación de PCR de los ADNcs de V_H y V_L, se sintetizaron a través de MWG Biotech, Alemania

Tabla 2:

	Cebador	Secuencia	SEC ID NO:
10	5'-V _L líder	gctatggccATCGAAGCCCCAGCTCAG	39
	3'-Ck	ttaggaattcCTAACACTCTCCCCTGTTGAAG	40
	5'-V _H líder	aatgtcgaccATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGG	41
	3'-CH _H gozne	ttagTTATGGGCACGGTGGGCATGTGTGAG	42

Clonación de los vectores de expresión de IgG4

15 Clonación molecular de la región V_H

El ADNc de V_H se amplificó a través de PCR a partir del plásmido pCRII recombinante utilizando los cebadores #1 y #2. El fragmento de PCR resultante se cortó con BstEII y se subclonó en el sitio HincII/BstEII de HCcassAAL, generando el plásmido intermedio nogohccass. Al utilizar el cebador IgG4HC5', se logró un intercambio de aminoácido (glutamina en lugar de ácido aspártico) en el líder de cadena pesada en la posición-2. La correcta secuencia se verificó a través de secuenciación automática y el fragmento de ADNc de V_H se liberó a través de la digestión con XbaI/BamHI. La ligación a

73
72

BamHI/XbaI fue digerida en hcMCPfin, y dio como resultado la construcción final de la expresión AnogoHC3A6.

Clonación molecular de la región VL

5 El ADNc de VL se amplificó a través de PCR a partir del plásmido pCRII recombinante utilizando los cebadores #3 y #4, introduciendo de esta manera MluI y un sitio HindIII. Al introducir el sitio de restricción HindIII se presentó un intercambio de aminoácido (R → K) en la región de unión. Esto
10 da como resultado el cambio de la región de unión de tipo J5 a un tipo J2. El fragmento de PCR resultante se subclonó en pCRII-rasurado y la secuencia se verificó. El fragmento correcto se liberó a través de la digestión de MluI/HindIII y se ligó en el vector de expresión. LCvec-AAL 160 de esta manera creando el
15 plásmido final AnogoLC3A6

20

Cebador #	Descrip.	Secuencia	SEC ID NO:
1	IgG4HC5'	CAGGCAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG	
2	IgG4HC3'	aaaTTGGTGGAGGCTGAGGAGACG	
3	IgG4LC5'	aaaaacgcgttgtGAAATTGTGTTGACACAGTCT	
4	IgG4LC3'	AaaaaagcttTGTCCTTGGCCGAAGGTGATC	

Caracterización de mAb de 3A6 humano

25

24
23

Ejemplo 6: Unión de 3A6 y Fab a Nogo-A humano utilizando ELISA

Se cubrieron placas de PS de 96 cavidades de Greiner (#655161) con 0.4-2 µg/ml de fragmentos de proteína Nogo en PBS (100 µl/cavidad) se cubrieron y se incubaron 4 horas a temperatura ambiente. Las placas se salpicaron y se volvieron a llenar con 200 µl/cavidad de regulador de pH de bloqueo (PBS+2% BSA), se cubrieron y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C, después se lavaron 3 veces con agua y una vez con PBS. Se diluyeron diferentes concentraciones de IgG1 de 3A6 humano, mAb de IgG4 o Fab de 3A6 en PBS + BSA al 2% (100 µl/cavidad), y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. El paso de lavado se repitió y se agregó IgG antihumano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) a una dilución de 1:5000 (Jackson Immuno Research #109-036-098) o HRP anti-humano de burro a una dilución de 1:5000 Jackson Immuno Research 709-035-149) para 3A6Fab en PBS/BSA al 0.1%/Nonidet 40 al 0.1% (100 µl/cavidad) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C y el paso de lavado se repitió. La reacción de HRP se inició agregando 100 µl/cavidad de POD de azul BM (Roche #148281) y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se agregaron 50 µl/cavidad de H₂SO₄ 1 M para detener la reacción del sustrato HRP y la densidad óptica se

determinó utilizando un lector de microplaca (Packard Spectra Count) fijado a 450 nm

Resultados:

- 5 Los 3A6 IgG1, IgG4 mAbs y 3A6 Fab humanos se unen a NiG humano a concentraciones muy bajas sobre la escala de 0.01-10 nM

Ejemplo 7: Mediciones de afinidad de biosensor para 10 **3A6-IgG1, 3A6-IgG4 y 3A6 Fab de ratón para dominios Novo-A**

- La afinidad de 3A6-IgG1 mAb, 3A6-IgG4 mAb de ratón, y de 3A6 Fab se midió a través de resonancia de plasmón de superficie (SPR) utilizando un biosensor óptico BIAcore 2000 (Biacore, Uppsala, Suiza) de acuerdo con las instrucciones del
- 15 fabricante El NiG humano recombinante se inmovilizó covalentemente en una célula de flujo de un circuito integrado de sensor CM5 utilizando química de acoplamiento de amina. En resumen, la matriz de dextrana carboximetilada se activo inyectando 35 µl de una solución conteniendo 0.025 M de NHS y
- 20 0.1 M de EDC. Para la inmovilización en el circuito integrado del sensor, el NiG humano recombinante se diluyó en 0.01 M de regulador de pH de citrato a un pH de 4 y se inyectó a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para lograr niveles de acoplamiento permitiendo las mediciones de afinidad. La
- 25 desactivación del grupo de NHS-éster restante se realizó a

26
95

través de la inyección de 35 μ l de 1 M de clorhidrato de etanolamina (pH 8.5). La superficie de circuito integrado de sensor se regeneró inyectando 5 μ l de 0.1 M de HCL. Para la medición de la afinidad, los anticuerpos se inyectaron a 5 diferentes concentraciones, variando de 0.50 nM a 100 nM, a una velocidad de flujo de 200 μ l/minuto. Después de cada inyección, la superficie del circuito integrado de sensor se regeneró con la inyección de 10 μ l de 0.1 M de HCl sin la pérdida de la actividad de unión sobre la superficie. Las 10 restricciones cinéticas, k_a y k_d y las constantes de afinidad K_D y K_i se evaluaron utilizando el software BIAevaluations 3.0 suministrado por el fabricante.

Medición de afinidad en BIAcore Las constantes cinéticas y de unión de afinidad de 3A6-IgG1 mAb, 3A6-IgG4 15 mAb de ratón, y del fragmento de Fab monovalente derivado de 3A6 al Nogo A recombinante, se midieron en tiempo real utilizando resonancia de plasmón de superficie (SPR) (Biacore). Para este análisis, se acopló el NiG humano recombinante en una superficie de circuito integrado de sensor y se inyectaron 20 diferentes concentraciones de los anticuerpos. Se derivaron los parámetros cinéticos de las interacciones de unión de los sensogramas a través de ajuste de curva no lineal. Las constantes de afinidad a equilibrio para NiG humano para los anticuerpos estuvieron en la escala de K_D s 0.14 nM a 2.7 nM 25 para 3A6-IgG4, 3A6-IgG1, 3A6 Fab

27
36

Ejemplo 8: Identificación del epítopo mAb de 3A6 con el análisis Pepspot

La membrana de Pepspot se compró en Jerini Peptide Technologies, Berlin, Alemania. Antes de la primera incubación, la membrana se enjuagó con etanol durante 1 minuto y 3 veces con TBS durante 10 minutos. Antes de cada incubación con el primer anticuerpo, la membrana se incubó en regulador de pH de bloqueo durante la noche a 4°C. Después de lavar durante 10 minutos con PBS-T, la membrana se incubó con el primer anticuerpo en el regulador de pH de bloqueo durante 3 horas a temperatura ambiente. Las concentraciones de anticuerpo son $c(3A6) = 0.6 \text{ nM}$. Después de tres lavados con TBS-T durante 10 minutos, la membrana se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo marcado con HRP secundario correspondiente (Fab2 de IgG humano de anti-cabra de Jackson Immuno Research) a una dilución de 1:500,000 en regulador de pH de bloqueo. Después de tres lavados con TBS-3T, la membrana se incubó con el reactivo de detección de quimioluminiscencia (ELC Advance, Amersham Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se expusieron a la película.

Análisis de Western Blot con proteínas Nogo-A humano y de mono:

78
77

El análisis de Western Blot se realizó de acuerdo con métodos estándares. Se aplicaron a cada carril 10 ng de NiG humano purificado a partir de E. Coli, se realizó la SDS-PAGE y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. El bloqueo es 4°C en regulador de pH de bloqueo durante la noche. Después de la incubación del anticuerpo (1 nM en regulador de pH de bloque al 0.5%) con el péptido (10-, 100- y 1000 veces un exceso molar de péptido, epítipo del péptido NiG humano, HNQQELPTALTKLVKED, péptido mezclado H-ETQLAKLPVDKTQE, Jerini Péptide Technologies, Berlín, Alemania) durante 1 hora a temperatura ambiente, la membrana se agregó a esta solución y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador. Después de 3 lavados con PBS-T durante 10 minutos, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo marcado con HRP secundario correspondiente (Fab2 de IgG humano de anti-cabra de Jackson Immuno Research) a una dilución de 1:100 000 en regulador de pH de bloqueo. Después de 3 lavados con PBS-T, la membrana se incubó con el reactivo de detección de quimioluminiscencia (ECL Advance, Amersham Biosciences), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se expuso a película durante 15 minutos.

El análisis de Western Blot para el NiG de cinomologus se realizó de acuerdo con métodos estándares. Se aplicaron a cada carril alícuotas de lisatos de célula NiG de

mono pET28 de E. Coli expresando NiG de mono después de la inducción con IPTG. Como un control negativo, se cargaron lisatos de célula de las mismas células sin inducción de expresión. Se realizó SDS-PAGE y se transfirieron a una
5 membrana de nitrocelulosa. El bloqueo fue a 4°C en regulador de pH de bloqueo durante la noche. Después de la incubación del anticuerpo (1 nM en regulador de pH de bloque al 0.5%, Roche Applied Science) con el péptido (10-, 100- y 1000-veces el exceso molar del péptido, secuencia: NQQELPIALTKLVKEED,
10 Jerini Peptide Technologies) durante 1 hora a temperatura ambiente, la membrana se agregó a esta solución y se incubó 1 hora más a temperatura ambiente en un agitador. Después de 3 lavados con TBS-T durante 10 minutos, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo
15 secundario marcado con HRP anti-humano a dilución de 1:100,000 en regulador de pH de bloqueo. Después de 3 lavados con TBS-T la membrana se incubó con el reactivo de detección de quimioluminiscencia (ECL Advance, Amersham Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y
20 expuso a película durante 15 segundos.

Unión de mAb de 3A6 a epítopes de péptido humano y de mono en ELISA

Se cubrieron placas PS de 96 cavidades de Greiner
25 con 8 µ/ml del péptido mezclado H-ETQLAKLPVDLKTQE, epítipo



de péptido NiG humano 3A6IgG4 H-NQQELPTALTKLVKED y epítoto de péptido de NiG de mono de IgG5 de 3A6, H-NQQELPIALTKLVKEED en PBS (100 µl/cavidad) se cubrió y se incubó 4 horas a temperatura ambiente. Las placas se salpizaron y se volvieron a llenar con 200 µl/cavidad de regulador de pH de bloqueo (PBS + BSA al 5%) se cubrieron y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C, después se lavaron 4 veces con agua corriente, se volvieron a llenar con PBS y se salpizaron Se diluyó mAb 3A6IgG4 en PBS + BASA al 2% (100 µl/cavidad) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4 grados. Diluciones de mAb. 10 nM a 0 001 mM...el paso de lavado se repitió. Se diluyó un segundo Ab en PBS/BSA al 0.1%/Nonidet 40 (100 µl/cavidad), y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4 grados El paso de lavado se repitió. Se agregaron 100 µl/cavidad del sustrato POD de azul BM y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos, y se agregaron 50 µl/cavidad de 1 M de H2SO4 para detener la reacción del sustrato HRP El OD se determinó utilizando un vector de microplaca fijado a 450 nm

Resultados

Mapeo de epítoto del mAb de 3A6 humano: El mapeo de epítoto da como resultado una secuencia ELPTALTKLV en la proteína de NiG humana

Competencia de la unión de mAb de 3A6 a NiG humano en Western Blot con péptido sintético:

Para confirmar el resultado obtenido a través de la
5 técnica Pepsiphot, se realizó el experimento de competencia de Western Blot. Se utilizó un 16-mer sintético conteniendo la secuencia de epítipo putativa (NQQELPTALTKLVKED) para competir con NiG humano de longitud completa para unirse al anticuerpo 3A6. Antes de la incubación con la membrana unida
10 a NiG humano, el anticuerpo 3A6 (1 nM) se incubó durante 1 hora con el péptido sintético utilizando diferentes relaciones molares de péptido a anticuerpo. Un exceso de 10 veces molar del péptido mostró una reducción importante en la señal detectada para NiG humano (producido en E. Coli). Un exceso
15 de 100 veces da como resultado una reducción adicional de la señal, y un exceso molar de 1000 veces del péptido casi completamente inhibe la unión de 3A6 a NiG humano. En contraste, un exceso de 1000 veces de un péptido con el mismo contenido de aminoácido, pero con una secuencia diferente
20 (mezclada), no tuvo ningún efecto en la unión del anticuerpo al NiG humano.

Unión de mAb de 3A6 a NiG humano: competencia con el epítipo de péptido sintético

25 Un 17-mer sintético comprendiendo la secuencia de

82
91

epítoto (NQQELPIALTKLVKEED) se utilizó para completar el NiG de mono cinomolgus de longitud completa expresada en E Coli para unirse al anticuerpo 3A6. Antes de la incubación con NiG de mono unido a membrana, el anticuerpo 3A6 (1 nM) se incubó durante 1 hora con el péptido sintético utilizando diferentes relaciones molares de péptido a anticuerpo. Un exceso de 100 veces da como resultado una reducción de la señal, y un exceso molar de 1000 veces del péptido sustancialmente inhibe la unión de 3A6 al NiG de mono. En contraste, un exceso de 1000 veces de un péptido con el mismo contenido de aminoácido, pero con diferente secuencia (mezclada), no tiene ningún efecto sobre la unión del anticuerpo a NiG humano.

Unión de IgG4 de 3A6 al epítoto de péptido de NiG humano y de mono en ELISA

Se realizaron análisis de unión detallados del mAb para el epítoto y secuencia mezclada, utilizando ELISA. Los resultados muestran claramente que mAb se une en una concentración dependiente a concentraciones muy bajas (0.001 a 1.0 nM) a epítotos de péptido de mono y humano que se compara con su KD en BIAcore para NiG humano de 0.14 nM. Además, la unión es específica sin ninguna unión al péptido de control mezclado.

83/2

REIVINDICACIONES

1 Una molécula de unión que es capaz de unirse
al polipéptido NogoA humano (SEC ID NO:5) o NIG humano (SEC
ID NO:7) o NIG-D20 humano (SEC ID NO 24) o NogoA_342-357
5 humano (SEC ID NO 6) con una constante de disociación <1000
nM.

2 Una molécula de unión que es capaz de unirse
al polipéptido NogoA humano (SEC ID NO:5) o NIG humano (SEC
ID NO:7) o NIG-D20 humano (SEC ID NO 24) o NogoA_342-357
10 humano (SEC ID NO 6) con una constante de disociación de
<1000 nM, y comprende por lo menos un sitio de unión de
antígeno, dicho sitio de unión de antígeno comprendiendo ya
sea

- en secuencia, las regiones hipervariables CDR-H1, CDR-
15 H2 y CDR-H3, de las cuales cada una de las regiones
hipervariables son por lo menos 50% homologas a sus
regiones hipervariables equivalentes CDR-H1-3A6 (SEC ID
NO 8), CDR-H2-3A6 (SEC ID NO.9), y dicha CDR-H3-3A6
(SEC ID NO 10); o
- 20 • en secuencia, las regiones hipervariables CDR-L1, CDR-L2
y CDR-L3, de las cuales cada una de las regiones
hipervariables son por lo menos 50% homólogas a sus
regiones hipervariables equivalentes CDR-L1-3A6 (SEC ID
NO 11), CDR-L2-3A6 (SEC ID NO:12), y CDR-L3-3A6 (SEC
25 ID NO:13)

48
23

3. Una molécula de unión que es capaz de unirse al polipéptido NogoA humano (SEC ID NO 5) o NiG humano (SEC ID NO 7) o NiG-D20 humano (SEC ID NO 24) o NogoA_342-357 humano (SEC ID NO:6) con una constante de disociación de 5 <1000 nM, y comprende

- un primer sitio de unión de antígeno comprendiendo en secuencia las regiones hipervariables CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, de las cuales cada una de las regiones hipervariables son por lo menos 50% homologas a sus regiones hipervariables equivalentes CDR-H1-3A6 (SEC ID NO.8), CDR-H2-3A6 (SEC ID NO.9), y dicha CDR-H3-3A6 (SEC ID NO.10); y
- un segundo sitio de unión de antígeno comprendiendo en secuencia, las regiones hipervariables CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, de las cuales cada una de las regiones hipervariables son por lo menos 50% homólogas a sus regiones hipervariables equivalentes CDR-L1-3A6 (SEC ID NO.11), CDR-L2-3A6 (SEC ID NO.12), y CDR-L3-3A6 (SEC ID NO.13).

4. Una molécula de unión que comprende por lo menos un sitio de unión de antígeno, dicho sitio de unión de antígeno comprendiendo ya sea:

- en secuencia, las regiones hipervariables CDR-H1-3A6 (SEC ID NO 8), CDR-H2-3A6 (SEC ID NO 9), y dicha CDR-H3-3A6 (SEC ID NO.10), o

45
26

- en secuencia, las regiones hipervariables CDR-L1-3A6 (SEC ID NO:11), CDR-L2-3A6 (SEC ID NO.12), y CDR-L3-3A6 (SEC ID NO:13), o
- sus equivalentes directos

5 5. Una molécula de unión que comprende:

- un primer sitio de unión de antígeno que comprende en secuencia, las regiones hipervariables CDR-H1-3A6 (SEC ID NO:8), CDR-H2-3A6 (SEC ID NO:9), y dicha CDR-H3-3A6 (SEC ID NO:10); y
- 10 • un segundo sitio de unión de antígeno que comprende en secuencia, las regiones hipervariables CDR-L1-3A6 (SEC ID NO:11), CDR-L2-3A6 (SEC ID NO.12), y CDR-L3-3A6 (SEC ID NO:13), o
- sus equivalentes directos.

15 6 La molécula de unión de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, la cual comprende por lo menos

- una cadena pesada de inmunoglobulina o un fragmento de la misma que comprende (i) un dominio variable que comprende en secuencia, las regiones hipervariables
20 CDR-H1-3A6 (SEC ID NO:8), CDR-H2-3A6 (SEC ID NO.9), y dicha CDR-H3-3A6 (SEC ID NO:10), y (ii) la parte constante o su fragmento de una cadena pesada humana, y
- una cadena ligera de inmunoglobulina o un fragmento de la misma, que comprende (i) un dominio variable
25 comprendiendo en secuencia, las regiones hipervariables

CDR-L1-3A6 (SEC ID NO.11), CDR-L2-3A6 (SEC ID NO:12), y CDR-L3-3A6 (SEC ID NO:13), y (ii) la parte constante o su fragmento de una cadena ligera humana; o

- sus equivalentes directos.

5 7 La molécula de unión de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la parte constante o su fragmento de la cadena pesada humana es del tipo $\gamma 4$ y la parte constante o su fragmento de la cadena ligera humana es del tipo κ .

10 8. La molécula de unión de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, la cual es un anticuerpo monoclonal humano o quimérico o humanizado

9 Una molécula de unión que comprende secuencias de polipéptido como se muestra en SEC ID NO.2 y SEC ID NO.3.

15 10. Un polipéptido que comprende polinucleótidos que codifican una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Un polinucleótido que comprende ya sea:

- secuencias de polinucleótido como se muestran en SEC ID NO.14, SEC ID NO.15 y SEC ID NO.16, o
- secuencias de polinucleótido como se muestra en SEC ID NO:17, SEC ID NO 18 y SEC ID NO.19

20 12. Un vector de expresión que comprende polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las
25 reivindicaciones 10 u 11

84
26

13. Un sistema de expresión que comprende un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en donde el sistema de expresión o una parte del mismo es capaz de producir un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, cuando el sistema de expresión o una parte del mismo está presente en una célula huésped compatible

14 Una célula huésped aislada que comprende un sistema de expresión de acuerdo con la reivindicación 13

15 15. El uso de una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 como un fármaco.

16 16. El uso de una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el tratamiento de reparación de nervios.

17 Una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en asociación con por lo menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20 18 Un método de tratamiento de enfermedades asociadas con la reparación de nervios comprendiendo administrar a un sujeto con la necesidad de dicho tratamiento, una cantidad efectiva de una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9

25 19. Un método para el tratamiento de enfermedades

86
83

- 78 -

asociadas con la reparación de nervios comprendiendo administrar a un sujeto con la necesidad de dicho tratamiento, una cantidad efectiva de una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

49
88

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG

5

<120> Compuesto Orgánico

<130> 4-32761P1/UNZ

10

<160> 44

15 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 18

20

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

25 <220>

<223> Parte Variable de Cadena Pesada de 3A6 con secuencia líder

91
20

3/76

<400> 2

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Gly Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

5 Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Asp Phe Arg
35 40 45

10 Arg Asn Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

15 Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Lys Ile Asn Tyr Thr Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
85 90 95

20 Leu Tyr Leu Gln Val Ser Thr Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
100 105 110

Tyr Cys Val Arg Pro Val Trp Met Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

25 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val

140

5

10

4

15

<210> 3

<211> 238

<212> PRT

20

<213> Mus musculus

<220>

25

<221> CADENA

9/3
22

<222> (1)..(238)

<223> Cadena Ligera de 3A6 con secuencia lider

5 <400> 3

Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Glu
1 5 10 15

10 Thr Ser Gly Asp Val Leu Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Ile
20 25 30

Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

15 Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
65 70 75 80

20 Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr Cys
100 105 110

25 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

9/4/03

	115		120		125
	Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro				
	130		135		140
5	Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu				
	145		150		155 160
	Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly				
		165		170	175
10	Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser				
		180		185	190
	Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp				
15		195		200	205
	Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr				
	210		215		220
	Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys				
20	225		230		235
	<210>	4			
	<211>	3919			
25	<212>	ADN			

9/5
OK

<213> Homo sapiens

<220>

5 <221> CDS

<222> (1) .. (3579)

<223> NogoA Humano

10	<400> 4	
	atg gaa gac ctg gac cag tct cct ctg gtc tcg tcc tcg gac agc cca	48
	Met Glu Asp Leu Asp Gln Ser Pro Leu Val Ser Ser Ser Asp Ser Pro	
	1 5 10 15	
	ccc cgg ccg cag ccc gcg ttc aag tac cag ttc gtg agg gag ccc gag	96
	Pro Arg Pro Gln Pro Ala Phe Lys Tyr Gln Phe Val Arg Glu Pro Glu	
15	20 25 30	
	gac gag gag gaa gaa gag gag gag gaa gag gag gac gag gac gaa gac	144
	Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Asp	
	35 40 45	
	ctg gag gag ctg gag gtg ctg gag agg aag ccc gcc gcc ggg ctg tcc	192
20	Leu Glu Glu Leu Glu Val Leu Glu Arg Lys Pro Ala Ala Gly Leu Ser	
	50 55 60	
	gcg gcc cca gtg ccc acc gcc cct gcc gcc ggc gcg ccc ctg atg gac	240
	Ala Ala Pro Val Pro Thr Ala Pro Ala Ala Gly Ala Pro Leu Met Asp	
	65 70 75 80	
	ttc gga aat gac ttc gtg ccg ccg gcg ccc cgg gga ccc ctg ccg gcc	288
25	Phe Gly Asn Asp Phe Val Pro Pro Ala Pro Arg Gly Pro Leu Pro Ala	

96/25

	85	90	95	
	gct ccc ccc gtc gcc ccg gag cgg cag ccg tct tgg gac ccg agc ccg			336
	Ala Pro Pro Val Ala Pro Glu Arg Gln Pro Ser Trp Asp Pro Ser Pro			
	100	105	110	
5	gtg tcg tcg acc gtg ccc gcg cca tcc ccg ctg tct gct gcc gca gtc			384
	Val Ser Ser Thr Val Pro Ala Pro Ser Pro Leu Ser Ala Ala Ala Val			
	115	120	125	
	tcg ccc tcc aag ctc cct gag gac gac gag cct ccg gcc cgg cct ccc			432
	Ser Pro Ser Lys Leu Pro Glu Asp Asp Glu Pro Pro Ala Arg Pro Pro			
	130	135	140	
10	cct cct ccc ccg gcc agc gtg agc ccc cag gca gag ccc gtg tgg acc			480
	Pro Pro Pro Pro Ala Ser Val Ser Pro Gln Ala Glu Pro Val Trp Thr			
	145	150	155	160
	ccg cca gcc ccg gct ccc gcc gcg ccc ccc tcc acc ccg gcc gcg ccc			528
	Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Pro Ser Thr Pro Ala Ala Pro			
	165	170	175	
15	aag cgc agg ggc tcc tcg ggc tca gtg gat gag acc ctt ttt gct ctt			576
	Lys Arg Arg Gly Ser Ser Gly Ser Val Asp Glu Thr Leu Phe Ala Leu			
	180	185	190	
	cct gct gca tct gag cct gtg ata cgc tcc tct gca gaa aat atg gac			624
	Pro Ala Ala Ser Glu Pro Val Ile Arg Ser Ser Ala Glu Asn Met Asp			
	195	200	205	
20	ttg aag gag cag cca ggt aac act att tcg gct ggt caa gag gat ttc			672
	Leu Lys Glu Gln Pro Gly Asn Thr Ile Ser Ala Gly Gln Glu Asp Phe			
	210	215	220	
	cca tct gtc ctg ctt gaa act gct gct tct ctt cct tct ctg tct cct			720
	Pro Ser Val Leu Leu Glu Thr Ala Ala Ser Leu Pro Ser Leu Ser Pro			
25	225	230	235	240

97
ab

9/76

	ctc tca gcc gct tct ttc aaa gaa cat gaa tac ctt ggt aat ttg tca	768
	Leu Ser Ala Ala Ser Phe Lys Glu His Glu Tyr Leu Gly Asn Leu Ser	
	245 250 255	
5	aca gta tta ccc act gaa gga aca ctt caa gaa aat gtc agt gaa gct	816
	Thr Val Leu Pro Thr Glu Gly Thr Leu Gln Glu Asn Val Ser Glu Ala	
	260 265 270	
	tct aaa gag gtc tca gag aag gca aaa act cta ctc ata gat aga gat	864
	Ser Lys Glu Val Ser Glu Lys Ala Lys Thr Leu Leu Ile Asp Arg Asp	
	275 280 285	
10	tta aca gag ttt tca gaa tta gaa tac tca gaa atg gga tca tcg ttc	912
	Leu Thr Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr Ser Glu Met Gly Ser Ser Phe	
	290 295 300	
	agt gtc tct cca aaa gca gaa tct gcc gta ata gta gca aat cct agg	960
	Ser Val Ser Pro Lys Ala Glu Ser Ala Val Ile Val Ala Asn Pro Arg	
	305 310 315 320	
15	gaa gaa ata atc gtg aaa aat aaa gat gaa gaa gag aag tta gtt agt	1008
	Glu Glu Ile Ile Val Lys Asn Lys Asp Glu Glu Glu Lys Leu Val Ser	
	325 330 335	
	aat aac atc ctt cat aat caa caa gag tta cct aca gct ctt act aaa	1056
	Asn Asn Ile Leu His Asn Gln Gln Glu Leu Pro Thr Ala Leu Thr Lys	
	340 345 350	
20	ttg gtt aaa gag gat gaa gtt gtg tct tca gaa aaa gca aaa gac agt	1104
	Leu Val Lys Glu Asp Glu Val Val Ser Ser Glu Lys Ala Lys Asp Ser	
	355 360 365	
	ttt aat gaa aag aga gtt gca gtg gaa gct cct atg agg gag gaa tat	1152
	Phe Asn Glu Lys Arg Val Ala Val Glu Ala Pro Met Arg Glu Glu Tyr	
25	370 375 380	

25

25

100
09

12/76

	675	680	685										
	gaa aca gaa gct cct tat ata tct att gca tgt gat tta att aaa gaa												2112
	Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile Ser Ile Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu												
	690				695				700				
5	aca aag ctt tct gct gaa cca gct ccg gat ttc tct gat tat tca gaa												2160
	Thr Lys Leu Ser Ala Glu Pro Ala Pro Asp Phe Ser Asp Tyr Ser Glu												
	705				710				715				720
	atg gca aaa gtt gaa cag cca gtg cct gat cat tct gag cta gtt gaa												2208
	Met Ala Lys Val Glu Gln Pro Val Pro Asp His Ser Glu Leu Val Glu												
	725				730				735				
10	gat tcc tca cct gat tct gaa cca gtt gac tta ttt agt gat gat tca												2256
	Asp Ser Ser Pro Asp Ser Glu Pro Val Asp Leu Phe Ser Asp Asp Ser												
	740				745				750				
	ata cct gac gtt cca caa aaa caa gat gaa act gtg atg ctt gtg aaa												2304
	Ile Pro Asp Val Pro Gln Lys Gln Asp Glu Thr Val Met Leu Val Lys												
	755				760				765				
15	gaa agt ctc act gag act tca ttt gag tca atg ata gaa tat gaa aat												2352
	Glu Ser Leu Thr Glu Thr Ser Phe Glu Ser Met Ile Glu Tyr Glu Asn												
	770				775				780				
	aag gaa aaa ctc agt gct ttg cca cct gag gga gga aag cca tat ttg												2400
	Lys Glu Lys Leu Ser Ala Leu Pro Pro Glu Gly Gly Lys Pro Tyr Leu												
20	785				790				795				800
	gaa tct ttt aag ctc agt tta gat aac aca aaa gat acc ctg tta cct												2448
	Glu Ser Phe Lys Leu Ser Leu Asp Asn Thr Lys Asp Thr Leu Leu Pro												
	805				810				815				
	gat gaa gtt tca aca ttg agc aaa aag gag aaa att cct ttg cag atg												2496
	Asp Glu Val Ser Thr Leu Ser Lys Lys Glu Lys Ile Pro Leu Gln Met												
25	820				825				830				

19/10

		gag gag ctc agt act gca gtt tat tca aat gat gac tta ttt att tct	2544
		Glu Glu Leu Ser Thr Ala Val Tyr Ser Asn Asp Asp Leu Phe Ile Ser	
		835 840 845	
5		aag gaa gca cag ata aga gaa act gaa acg ttt tca gat tca tct cca	2592
		Lys Glu Ala Gln Ile Arg Glu Thr Glu Thr Phe Ser Asp Ser Ser Pro	
		850 855 860	
		att gaa att ata gat gag ttc cct aca ttg atc agt tct aaa act gat	2640
		Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr Leu Ile Ser Ser Lys Thr Asp	
		865 870 875 880	
10		tca ttt tct aaa tta gcc agg gaa tat act gac cta gaa gta tcc cac	2688
		Ser Phe Ser Lys Leu Ala Arg Glu Tyr Thr Asp Leu Glu Val Ser His	
		885 890 895	
		aaa agt gaa att gct aat gcc ccg gat gga gct ggg tca ttg cct tgc	2736
		Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ala Pro Asp Gly Ala Gly Ser Leu Pro Cys	
		900 905 910	
15		aca gaa ttg ccc cat gac ctt tct ttg aag aac ata caa ccc aaa gtt	2784
		Thr Glu Leu Pro His Asp Leu Ser Leu Lys Asn Ile Gln Pro Lys Val	
		915 920 925	
		gaa gag aaa atc agt ttc tca gat gac ttt tct aaa aat ggg tct gct	2832
		Glu Glu Lys Ile Ser Phe Ser Asp Asp Phe Ser Lys Asn Gly Ser Ala	
		930 935 940	
20		aca tca aag gtg ctc tta ttg cct cca gat gtt tct gct ttg gcc act	2880
		Thr Ser Lys Val Leu Leu Leu Pro Pro Asp Val Ser Ala Leu Ala Thr	
		945 950 955 960	
		caa gca gag ata gag agc ata gtt aaa ccc aaa gtt ctt gtg aaa gaa	2928
		Gln Ala Glu Ile Glu Ser Ile Val Lys Pro Lys Val Leu Val Lys Glu	
25		965 970 975	

192
101

14/76

	gct gag aaa aaa ctt cct tcc gat aca gaa aaa gag gac aga tca cca	2976
	Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr Glu Lys Glu Asp Arg Ser Pro	
	980 985 990	
5	tct gct ata ttt tca gca gag ctg agt aaa act tca gtt gtt gac ctc	3024
	Ser Ala Ile Phe Ser Ala Glu Leu Ser Lys Thr Ser Val Val Asp Leu	
	995 1000 1005	
	ctg tac tgg aga gac att aag aag act gga gtg gtg ttt ggt gcc	3069
	Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val Phe Gly Ala	
	1010 1015 1020	
10	agc cta ttc ctg ctg ctt tca ttg aca gta ttc agc att gtg agc	3114
	Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val Ser	
	1025 1030 1035	
	gta aca gcc tac att gcc ttg gcc ctg ctc tct gtg acc atc agc	3159
	Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile Ser	
	1040 1045 1050	
15	ttt agg ata tac aag ggt gtg atc caa gct atc cag aaa tca gat	3204
	Phe Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp	
	1055 1060 1065	
	gaa ggc cac cca ttc agg gca tat ctg gaa tct gaa gtt gct ata	3249
	Glu Gly His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile	
	1070 1075 1080	
20	tct gag gag ttg gtt cag aag tac agt aat tct gct ctt ggt cat	3294
	Ser Glu Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His	
	1085 1090 1095	
	gtg aac tgc acg ata aag gaa ctc agg cgc ctc ttc tta gtt gat	3339
	Val Asn Cys Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp	
	1100 1105 1110	
25	gat tta gtt gat tct ctg aag ttt gca gtg ttg atg tgg gta ttt	3384

194
10

	Asp Leu Val Asp Ser Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Val Phe	
	1115 1120 1125	
	acc tat gtt ggt gcc ttg ttt aat ggt ctg aca cta ctg att ttg	3429
	Thr Tyr Val Gly Ala Leu Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile Leu	
5	1130 1135 1140	
	gct ctc att tca ctc ttc agt gtt cct gtt att tat gaa cgg cat	3474
	Ala Leu Ile Ser Leu Phe Ser Val Pro Val Ile Tyr Glu Arg His	
	1145 1150 1155	
	cag gca cag ata gat cat tat cta gga ctt gca aat aag aat gtt	3519
	Gln Ala Gln Ile Asp His Tyr Leu Gly Leu Ala Asn Lys Asn Val	
10	1160 1165 1170	
	aaa gat gct atg gct aaa atc caa gca aaa atc cct gga ttg aag	3564
	Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln Ala Lys Ile Pro Gly Leu Lys	
	1175 1180 1185	
	cgc aaa gct gaa tga aaacgcccaa aataattagt aggagttcat ctttaaaggg	3619
15	Arg Lys Ala Glu	
	1190	
	gatattcatt tgattatacg ggggaggggc aggaagaac gaaccttgac gttgcagtgc	3679
	agtttcacag atcgttggtta gatctttatt tttagccatg cactgttgtg aggaaaaatt	3739
20	acctgtcttg actgccatgt gttcatcatc ttaagtattg taagctgcta tgtatggatt	3799
	taaacogtaa tcatatcttt ttccatatctg aggcactggt ggaataaaaa acctgtatat	3859
	tttactttgt tgcagatagt cttgccgcat cttggcaagt tgcagagatg gtggagctag	3919
25	<210> 5	

184m
LO7

<211> 1192

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 5

Met Glu Asp Leu Asp Gln Ser Pro Leu Val Ser Ser Ser Asp Ser Pro
1 5 10 15

10

Pro Arg Pro Gln Pro Ala Phe Lys Tyr Gln Phe Val Arg Glu Pro Glu
20 25 30

Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Asp
35 40 45

15

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

Ala Ala Pro Val Pro Thr Ala Pro Ala Ala Gly Ala Pro Leu Met Asp
65 70 75 80

20

Phe Gly Asn Asp Phe Val Pro Pro Ala Pro Arg Gly Pro Leu Pro Ala
85 90 95

Ala Pro Pro Val Ala Pro Glu Arg Gln Pro Ser Trp Asp Pro Ser Pro
100 105 110

25

	Ser	Pro	Ser	Lys	Leu	Pro	Glu	Asp	Asp	Glu	Pro	Pro	Ala	Arg	Pro	Pro	
5		130					135						140				
	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Pro	Gln	Ala	Glu	Pro	Val	Trp	Thr	
	145					150					155					160	
10	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	
				165						170					175		
	Lys	Arg	Arg	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Val	Asp	Glu	Thr	Leu	Phe	Ala	Leu	
				180					185					190			
15	Pro	Ala	Ala	Ser	Glu	Pro	Val	Ile	Arg	Ser	Ser	Ala	Glu	Asn	Met	Asp	
		195						200					205				
	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Gly	Asn	Thr	Ile	Ser	Ala	Gly	Gln	Glu	Asp	Phe	
	210					215						220					
20	Pro	Ser	Val	Leu	Leu	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Pro	Ser	Leu	Ser	Pro	
	225				230						235					240	
	Leu	Ser	Ala	Ala	Ser	Phe	Lys	Glu	His	Glu	Tyr	Leu	Gly	Asn	Leu	Ser	
25				245						250					255		

18/76
105

	Thr	Val	Leu	Pro	Thr	Glu	Gly	Thr	Leu	Gln	Glu	Asn	Val	Ser	Glu	Ala	
				260					265						270		
	Ser	Lys	Glu	Val	Ser	Glu	Lys	Ala	Lys	Thr	Leu	Leu	Ile	Asp	Arg	Asp	
			275					280					285				
5																	
	Leu	Thr	Glu	Phe	Ser	Glu	Leu	Glu	Tyr	Ser	Glu	Met	Gly	Ser	Ser	Phe	
		290					295					300					
	Ser	Val	Ser	Pro	Lys	Ala	Glu	Ser	Ala	Val	Ile	Val	Ala	Asn	Pro	Arg	
10	305				310					315					320		
	Glu	Glu	Ile	Ile	Val	Lys	Asn	Lys	Asp	Glu	Glu	Glu	Lys	Leu	Val	Ser	
					325					330					335		
	Asn	Asn	Ile	Leu	His	Asn	Gln	Gln	Glu	Leu	Pro	Thr	Ala	Leu	Thr	Lys	
15				340					345					350			
	Leu	Val	Lys	Glu	Asp	Glu	Val	Val	Ser	Ser	Glu	Lys	Ala	Lys	Asp	Ser	
			355					360					365				
	Phe	Asn	Glu	Lys	Arg	Val	Ala	Val	Glu	Ala	Pro	Met	Arg	Glu	Glu	Tyr	
20		370				375					380						
	Ala	Asp	Phe	Lys	Pro	Phe	Glu	Arg	Val	Trp	Glu	Val	Lys	Asp	Ser	Lys	
	385					390				395					400		
25																	
	Glu	Asp	Ser	Asp	Met	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Lys	Ile	Glu	Ser	Asn	Leu	

107
108

19/76

405

410

415

Glu Ser Lys Val Asp Lys Lys Cys Phe Ala Asp Ser Leu Glu Gln Thr
420 425 430

5

Asn His Glu Lys Asp Ser Glu Ser Ser Asn Asp Asp Thr Ser Phe Pro
435 440 445

Ser Thr Pro Glu Gly Ile Lys Asp Arg Ser Gly Ala Tyr Ile Thr Cys
450 455 460

10

Ala Pro Phe Asn Pro Ala Ala Thr Glu Ser Ile Ala Thr Asn Ile Phe
465 470 475 480

Pro Leu Leu Gly Asp Pro Thr Ser Glu Asn Lys Thr Asp Glu Lys Lys
485 490 495

15

Ile Glu Glu Lys Lys Ala Gln Ile Val Thr Glu Lys Asn Thr Ser Thr
500 505 510

Lys Thr Ser Asn Pro Phe Leu Val Ala Ala Gln Asp Ser Glu Thr Asp
515 520 525

20

Tyr Val Thr Thr Asp Asn Leu Thr Lys Val Thr Glu Glu Val Val Ala
530 535 540

Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr Pro Asp Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu
545 550 555 560

25

198
107

20/76

	Ser	Glu	Leu	Asn	Glu	Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Ile	Ala	Tyr	Glu	Thr	Lys	
					565					570						575	
5	Met	Asp	Leu	Val	Gln	Thr	Ser	Glu	Val	Met	Gln	Glu	Ser	Leu	Tyr	Pro	
					580					585						590	
	Ala	Ala	Gln	Leu	Cys	Pro	Ser	Phe	Glu	Glu	Ser	Glu	Ala	Thr	Pro	Ser	
					595					600						605	
10	Pro	Val	Leu	Pro	Asp	Ile	Val	Met	Glu	Ala	Pro	Leu	Asn	Ser	Ala	Val	
					610					615						620	
	Pro	Ser	Ala	Gly	Ala	Ser	Val	Ile	Gln	Pro	Ser	Ser	Ser	Pro	Leu	Glu	
					625					630				635		640	
15	Ala	Ser	Ser	Val	Asn	Tyr	Glu	Ser	Ile	Lys	His	Glu	Pro	Glu	Asn	Pro	
					645					650						655	
	Pro	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	Met	Ser	Val	Ser	Leu	Lys	Lys	Val	Ser	Gly	
					660					665						670	
20	Ile	Lys	Glu	Glu	Ile	Lys	Glu	Pro	Glu	Asn	Ile	Asn	Ala	Ala	Leu	Gln	
					675					680						685	
	Glu	Thr	Glu	Ala	Pro	Tyr	Ile	Ser	Ile	Ala	Cys	Asp	Leu	Ile	Lys	Glu	
25					690					695						700	

107
108

	Thr	Lys	Leu	Ser	Ala	Glu	Pro	Ala	Pro	Asp	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ser	Glu
	705					710					715					720
	Met	Ala	Lys	Val	Glu	Gln	Pro	Val	Pro	Asp	His	Ser	Glu	Leu	Val	Glu
5					725					730					735	
	Asp	Ser	Ser	Pro	Asp	Ser	Glu	Pro	Val	Asp	Leu	Phe	Ser	Asp	Asp	Ser
				740						745					750	
10	Ile	Pro	Asp	Val	Pro	Gln	Lys	Gln	Asp	Glu	Thr	Val	Met	Leu	Val	Lys
		755						760						765		
	Glu	Ser	Leu	Thr	Glu	Thr	Ser	Phe	Glu	Ser	Met	Ile	Glu	Tyr	Glu	Asn
		770					775					780				
15	Lys	Glu	Lys	Leu	Ser	Ala	Leu	Pro	Pro	Glu	Gly	Gly	Lys	Pro	Tyr	Leu
	785					790					795					800
	Glu	Ser	Phe	Lys	Leu	Ser	Leu	Asp	Asn	Thr	Lys	Asp	Thr	Leu	Leu	Pro
				805						810					815	
20	Asp	Glu	Val	Ser	Thr	Leu	Ser	Lys	Lys	Glu	Lys	Ile	Pro	Leu	Gln	Met
			820						825					830		
	Glu	Glu	Leu	Ser	Thr	Ala	Val	Tyr	Ser	Asn	Asp	Asp	Leu	Phe	Ile	Ser
25			835					840					845			

110
109

22/76

Lys Glu Ala Gln Ile Arg Glu Thr Glu Thr Phe Ser Asp Ser Ser Pro
850 855 860

Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr Leu Ile Ser Ser Lys Thr Asp
865 870 875 880

5

Ser Phe Ser Lys Leu Ala Arg Glu Tyr Thr Asp Leu Glu Val Ser His
885 890 895

Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ala Pro Asp Gly Ala Gly Ser Leu Pro Cys
900 905 910

10

Thr Glu Leu Pro His Asp Leu Ser Leu Lys Asn Ile Gln Pro Lys Val
915 920 925

Glu Glu Lys Ile Ser Phe Ser Asp Asp Phe Ser Lys Asn Gly Ser Ala
930 935 940

15

Thr Ser Lys Val Leu Leu Leu Pro Pro Asp Val Ser Ala Leu Ala Thr
945 950 955 960

Gln Ala Glu Ile Glu Ser Ile Val Lys Pro Lys Val Leu Val Lys Glu
965 970 975

20

Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr Glu Lys Glu Asp Arg Ser Pro
980 985 990

Ser Ala Ile Phe Ser Ala Glu Leu Ser Lys Thr Ser Val Val Asp Leu

25

110

	995	1000	1005
	Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys	Lys Thr Gly Val Val	Phe Gly Ala
	1010	1015	1020
5	Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ser	Leu Thr Val Phe Ser	Ile Val Ser
	1025	1030	1035
	Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu	Ala Leu Leu Ser Val	Thr Ile Ser
	1040	1045	1050
10	Phe Arg Ile Tyr Lys Gly Val	Ile Gln Ala Ile Gln	Lys Ser Asp
	1055	1060	1065
	Glu Gly His Pro Phe Arg Ala	Tyr Leu Glu Ser Glu	Val Ala Ile
	1070	1075	1080
15	Ser Glu Glu Leu Val Gln Lys	Tyr Ser Asn Ser Ala	Leu Gly His
	1085	1090	1095
	Val Asn Cys Thr Ile Lys Glu	Leu Arg Arg Leu Phe	Leu Val Asp
	1100	1105	1110
20	Asp Leu Val Asp Ser Leu Lys	Phe Ala Val Leu Met	Trp Val Phe
	1115	1120	1125
	Thr Tyr Val Gly Ala Leu Phe	Asn Gly Leu Thr Leu	Leu Ile Leu
	1130	1135	1140
25			

5

10

15

20

<211> 18

<213> Homo sapiens

<221> PEPTIDO

<223> NogoA_342-357 Humano

25

1/3
1/2

<400> 6

Asn Tyr Glu Ser Ile Lys His Glu Pro Glu Asn Pro Pro Pro Tyr Glu
1 5 10 15

5 Glu Ala

<210> 7

10 <211> 819

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <220>

<221> PEPTIDO

<222> (1) .. (819)

20 <223> Nig Humano

<400> 7

Asp Glu Thr Leu Phe Ala Leu Pro Ala Ala Ser Glu Pro Val Ile Arg
1 5 10 15

25

25

5

10

15

20

25

Asn Lys Thr Asp Glu Lys Lys Ile Glu Glu Lys Lys Ala Gln Ile Val

116
115

28/76

305		310		315		320
Thr Glu Lys Asn Thr Ser Thr Lys Thr Ser Asn Pro Phe Leu Val Ala						
		325		330		335
5						
Ala Gln Asp Ser Glu Thr Asp Tyr Val Thr Thr Asp Asn Leu Thr Lys						
		340		345		350
Val Thr Glu Glu Val Val Ala Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr Pro Asp						
		355		360		365
10						
Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu Ser Glu Leu Asn Glu Val Thr Gly Thr						
		370		375		380
Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys Met Asp Leu Val Gln Thr Ser Glu Val						
		385		390		395
15						
Met Gln Glu Ser Leu Tyr Pro Ala Ala Gln Leu Cys Pro Ser Phe Glu						
		405		410		415
Glu Ser Glu Ala Thr Pro Ser Pro Val Leu Pro Asp Ile Val Met Glu						
		420		425		430
20						
Ala Pro Leu Asn Ser Ala Val Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val Ile Gln						
		435		440		445
Pro Ser Ser Ser Pro Leu Glu Ala Ser Ser Val Asn Tyr Glu Ser Ile						
		450		455		460
25						

117
116

29/76

	Lys	His	Glu	Pro	Glu	Asn	Pro	Pro	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	Met	Ser	Val	
	465					470					475					480	
	Ser	Leu	Lys	Lys	Val	Ser	Gly	Ile	Lys	Glu	Glu	Ile	Lys	Glu	Pro	Glu	
5					485					490					495		
	Asn	Ile	Asn	Ala	Ala	Leu	Gln	Glu	Thr	Glu	Ala	Pro	Tyr	Ile	Ser	Ile	
				500					505					510			
10	Ala	Cys	Asp	Leu	Ile	Lys	Glu	Thr	Lys	Leu	Ser	Ala	Glu	Pro	Ala	Pro	
		515						520					525				
	Asp	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ser	Glu	Met	Ala	Lys	Val	Glu	Gln	Pro	Val	Pro	
	530						535					540					
15																	
	Asp	His	Ser	Glu	Leu	Val	Glu	Asp	Ser	Ser	Pro	Asp	Ser	Glu	Pro	Val	
	545					550					555					560	
	Asp	Leu	Phe	Ser	Asp	Asp	Ser	Ile	Pro	Asp	Val	Pro	Gln	Lys	Gln	Asp	
					565					570					575		
20																	
	Glu	Thr	Val	Met	Leu	Val	Lys	Glu	Ser	Leu	Thr	Glu	Thr	Ser	Phe	Glu	
				580					585					590			
	Ser	Met	Ile	Glu	Tyr	Glu	Asn	Lys	Glu	Lys	Leu	Ser	Ala	Leu	Pro	Pro	
25			595					600					605				

118
117

30/76

	Glu Gly Gly Lys Pro Tyr Leu Glu Ser Phe Lys Leu Ser Leu Asp Asn	
	610	615 620
5	Thr Lys Asp Thr Leu Leu Pro Asp Glu Val Ser Thr Leu Ser Lys Lys	
	625	630 635 640
	Glu Lys Ile Pro Leu Gln Met Glu Glu Leu Ser Thr Ala Val Tyr Ser	
	645	650 655
10	Asn Asp Asp Leu Phe Ile Ser Lys Glu Ala Gln Ile Arg Glu Thr Glu	
	660	665 670
	Thr Phe Ser Asp Ser Ser Pro Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr	
	675	680 685
15	Leu Ile Ser Ser Lys Thr Asp Ser Phe Ser Lys Leu Ala Arg Glu Tyr	
	690	695 700
	Thr Asp Leu Glu Val Ser His Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ala Pro Asp	
	705	710 715 720
20	Gly Ala Gly Ser Leu Pro Cys Thr Glu Leu Pro His Asp Leu Ser Leu	
	725	730 735
	Lys Asn Ile Gln Pro Lys Val Glu Glu Lys Ile Ser Phe Ser Asp Asp	
25	740	745 750

118

Phe Ser Lys Asn Gly Ser Ala Thr Ser Lys Val Leu Leu Leu Pro Pro
755 760 765

Asp Val Ser Ala Leu Ala Thr Gln Ala Glu Ile Glu Ser Ile Val Lys
770 775 780

5

Pro Lys Val Leu Val Lys Glu Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr
785 790 795 800

Glu Lys Glu Asp Arg Ser Pro Ser Ala Ile Phe Ser Ala Glu Leu Ser
805 810 815

10

Lys Thr Ser

<210> 8

15

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

20

<220>

<221> UNION

<222> (1)..(10)

25

<223> parte hipervariable de cadena pesada de 3A6

170
119

<400> 8

Gly Phe Asp Phe Arg Arg Asn Trp Met Ser
1 5 10

5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

10

<213> Mus musculus

<220>

<221> UNION

15

<222> (1)..(17)

<223> parte hipervariable de cadena pesada de 3A6

<400> 9

20

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

Asp

25

121
120

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

10 <221> UNION

<222> (1) .. (9)

<223> parte hipervariable de cadena pesada de 3A6

15 <400> 10

Pro Val Trp Met Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

20 <210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

25

122
121

<220>

<221> UNION

<222> (1)..(16)

5 <223> parte hipervariable de cadena ligera de 3A6

<400> 11

10 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 12

<211> 7

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

20 <221> UNION

<222> (1)..(7)

<223> parte hipervariable de cadena pesada de 3A6

25

122

<400> 12

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

5 .
<210> 13

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<220>

<221>

15 <222> (1)..(9)

<223> parte hipervariable de cadena ligera de 3A6

<400> 13

20 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gln Thr
1 5

<210> 14

25

174
123

<211> 30

<212> ADN

<213> Mus musculus

5

<220>

<221> varios_unión

<222> (1)..(30)

10

<223> ADN-CDR-H1-3A6

<400> 14

ggattcgatt ttagaagaaa ttggatgagt

30

15

<210> 15

<211> 51

<212> ADN

20

<213> Mus musculus

<220>

25 <221> varios_unión

125
12A

<222> (1) .. (51)

<223> ADN-CDR-H2-3A6

5 <400> 15
gaaattaatc cagatagcag taagataaac tatacgccat ctctaaagga t 51

<210> 16

10 <211> 27
<212> ADN
<213> Mus musculus

15 <220>
<221> varios_unión
<222> (1) .. (27)
<223> ADN-CDR-H3-3A6

20 <400> 16
ccggtctgga tgtatgctat ggactac 27

25 <210> 17

17/6
12/5

38/76

<211> 48

<212> ADN

<213> Mus musculus

5

<220>

<221> varios_unión

<222> (1)..(48)

10

<223> ADN-CDR'1-3A6

<400> 17

aagtcaagtc agagcctctt gcatagtgat ggaaagacat atttgaat

48

15

<210> 18

<211> 21

<212> ADN

20

<213> Mus musculus

<220>

25

<221> varios_unión

127
126

<222> (1) .. (21)

<223> ADN-CDR'2-3A6

5 <400> 18
ctggtgtcta aactggactc t 21

<210> 19

<211> 27

10

<212> ADN

<213> Mus musculus

15 <220>

<221> varios_unión

<222> (1) .. (27)

<223> ADN-CDR'3-3A6

20

<400> 19
tggcaaggta cacattttcc tcagacg 27

25 <210> 20

126
127

<211> 54

<212> ADN

<213> Mus musculus

5

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (54)

10

<223> secuencia lider para cadena pesada de 3A6

<400> 20

atg gat ttt ggg ctg att ttt ttt att gtt ggt ctt tta aaa ggg gtc 48

15 Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Gly Leu Leu Lys Gly Val

1 5 10 15

cag tgt 54

Gln Cys

20

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

25 <213> Mus musculus

124
128

<400> 21

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Gly Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

5 Gln Cys

<210> 22

10 <211> 57

<212> ADN

<213> Mus musculus

15 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(57)

20 <223> secuencia líder para cadena ligera de 3A6

<400> 22

atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg gaa 48
Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Glu
1 5 10 15

25

121
130

<221> PEPTIDO

<222> (1) .. (181)

<223> Nig-20 humano

5

<400> 24

Gly Thr Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys Met Asp Leu Val Gln Thr Ser
1 5 10 15

10

Glu Val Met Gln Glu Ser Leu Tyr Pro Ala Ala Gln Leu Cys Pro Ser
20 25 30

Phe Glu Glu Ser Glu Ala Thr Pro Ser Pro Val Leu Pro Asp Ile Val
35 40 45

15

Met Glu Ala Pro Leu Asn Ser Ala Val Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val
50 55 60

Ile Gln Pro Ser Ser Ser Pro Leu Glu Ala Ser Ser Val Asn Tyr Glu
65 70 75 80

20

Ser Ile Lys His Glu Pro Glu Asn Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Ala Met
85 90 95

Ser Val Ser Leu Lys Lys Val Ser Gly Ile Lys Glu Glu Ile Lys Glu
100 105 110

25

5

10

15

20

<210> 25

<212> DNA

<220>

<221> CDS

25 <222> (1) .. (3492)

133
132

<223> NogoA de rata

<400> 25		
5	atg gaa gac ata gac cag tcg tcg ctg gtc tcc tcg tcc acg gac agc	48
	Met Glu Asp Ile Asp Gln Ser Ser Leu Val Ser Ser Ser Thr Asp Ser	
	1 5 10 15	
ccg ccc cgg cct ccg ccc gcc ttc aag tac cag ttc gtg acg gag ccc		96
Pro Pro Arg Pro Pro Pro Ala Phe Lys Tyr Gln Phe Val Thr Glu Pro		
20 25 30		
10	gag gac gag gag gac gag gag gag gag gag gac gag gag gag gac gac	144
	Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Asp Asp	
	35 40 45	
gag gac cta gag gaa ctg gag gtg ctg gag agg aag ccc gca gcc ggg		192
Glu Asp Leu Glu Glu Leu Glu Val Leu Glu Arg Lys Pro Ala Ala Gly		
50 55 60		
15	ctg tcc gca gct gcg gtg ccg ccc gcc gcc gcc gcg ccg ctg ctg gac	240
	Leu Ser Ala Ala Ala Val Pro Pro Ala Ala Ala Ala Pro Leu Leu Asp	
	65 70 75 80	
ttc agc agc gac tcg gtg ccc ccc gcg ccc cgc ggg ccg ctg ccg gcc		288
Phe Ser Ser Asp Ser Val Pro Pro Ala Pro Arg Gly Pro Leu Pro Ala		
85 90 95		
20	gcg ccc cct gcc gct cct gag agg cag cca tcc tgg gaa cgc agc ccc	336
	Ala Pro Pro Ala Ala Pro Glu Arg Gln Pro Ser Trp Glu Arg Ser Pro	
	100 105 110	
gcg gcg ccc gcg cca tcc ctg ccg ccc gct gcc gca gtc ctg ccc tcc		384
Ala Ala Pro Ala Pro Ser Leu Pro Pro Ala Ala Ala Val Leu Pro Ser		
115 120 125		
25		

134
133

46/76

	aag ctc cca gag gac gac gag cct ccg gcg agg ccc ccg cct ccg ccg	432
	Lys Leu Pro Glu Asp Asp Glu Pro Pro Ala Arg Pro Pro Pro Pro Pro	
	130 135 140	
	cca gcc ggc gcg agc ccc ctg gcg gag ccc gcc gcg ccc cct tcc acg	480
	Pro Ala Gly Ala Ser Pro Leu Ala Glu Pro Ala Ala Pro Pro Ser Thr	
5	145 150 155 160	
	ccg gcc gcg ccc aag cgc agg ggc tcc ggc tca gtg gat gag acc ctt	528
	Pro Ala Ala Pro Lys Arg Arg Gly Ser Gly Ser Val Asp Glu Thr Leu	
	165 170 175	
	ttt gct ctt cct gct gca tct gag cct gtg ata ccc tcc tct gca gaa	576
10	Phe Ala Leu Pro Ala Ala Ser Glu Pro Val Ile Pro Ser Ser Ala Glu	
	180 185 190	
	aaa att atg gat ttg atg gag cag cca ggt aac act gtt tcg tct ggt	624
	Lys Ile Met Asp Leu Met Glu Gln Pro Gly Asn Thr Val Ser Ser Gly	
	195 200 205	
	caa gag gat ttc cca tct gtc ctg ctt gaa act gct gcc tct ctt cct	672
15	Gln Glu Asp Phe Pro Ser Val Leu Leu Glu Thr Ala Ala Ser Leu Pro	
	210 215 220	
	tct cta tct cct ctc tca act gtt tct ttt aaa gaa cat gga tac ctt	720
	Ser Leu Ser Pro Leu Ser Thr Val Ser Phe Lys Glu His Gly Tyr Leu	
	225 230 235 240	
	ggt aac tta tca gca gtg tca tcc tca gaa gga aca att gaa gaa act	768
20	Gly Asn Leu Ser Ala Val Ser Ser Ser Glu Gly Thr Ile Glu Glu Thr	
	245 250 255	
	tta aat gaa gct tct aaa gag ttg cca gag agg gca aca aat cca ttt	816
	Leu Asn Glu Ala Ser Lys Glu Leu Pro Glu Arg Ala Thr Asn Pro Phe	
	260 265 270	
25	gta aat aga gat tta gca gaa ttt tca gaa tta gaa tat tca gaa atg	864

125
131

	Val	Asn	Arg	Asp	Leu	Ala	Glu	Phe	Ser	Glu	Leu	Glu	Tyr	Ser	Glu	Met	
		275						280					285				
	gga	tca	tct	ttt	aaa	ggc	tcc	cca	aaa	gga	gag	tca	gcc	ata	tta	gta	912
	Gly	Ser	Ser	Phe	Lys	Gly	Ser	Pro	Lys	Gly	Glu	Ser	Ala	Ile	Leu	Val	
		290					295					300					
5																	
	gaa	aac	act	aag	gaa	gaa	gta	att	gtg	agg	agt	aaa	gac	aaa	gag	gat	960
	Glu	Asn	Thr	Lys	Glu	Glu	Val	Ile	Val	Arg	Ser	Lys	Asp	Lys	Glu	Asp	
	305					310				315					320		
	tta	gtt	tgt	agt	gca	gcc	ctt	cac	agt	cca	caa	gaa	tca	cct	gtg	ggc	1008
	Leu	Val	Cys	Ser	Ala	Ala	Leu	His	Ser	Pro	Gln	Glu	Ser	Pro	Val	Gly	
10						325				330					335		
	aaa	gaa	gac	aga	gtt	gtg	tct	cca	gaa	aag	aca	atg	gac	att	ttt	aat	1056
	Lys	Glu	Asp	Arg	Val	Val	Ser	Pro	Glu	Lys	Thr	Met	Asp	Ile	Phe	Asn	
				340					345					350			
	gaa	atg	cag	atg	tca	gta	gta	gca	cct	gtg	agg	gaa	gag	tat	gca	gac	1104
	Glu	Met	Gln	Met	Ser	Val	Val	Ala	Pro	Val	Arg	Glu	Glu	Tyr	Ala	Asp	
15				355				360					365				
	ttt	aag	cca	ttt	gaa	caa	gca	tg	gaa	gtg	aaa	gat	act	tat	gag	gga	1152
	Phe	Lys	Pro	Phe	Glu	Gln	Ala	Trp	Glu	Val	Lys	Asp	Thr	Tyr	Glu	Gly	
		370					375					380					
	agt	agg	gat	gtg	ctg	gct	gct	aga	gct	aat	gtg	gaa	agt	aaa	gtg	gac	1200
20	Ser	Arg	Asp	Val	Leu	Ala	Ala	Arg	Ala	Asn	Val	Glu	Ser	Lys	Val	Asp	
	385					390					395				400		
	aga	aaa	tgc	ttg	gaa	gat	agc	ctg	gag	caa	aaa	agt	ctt	ggg	aag	gat	1248
	Arg	Lys	Cys	Leu	Glu	Asp	Ser	Leu	Glu	Gln	Lys	Ser	Leu	Gly	Lys	Asp	
						405				410				415			
	agt	gaa	ggc	aga	aat	gag	gat	gct	tct	ttc	ccc	agt	acc	cca	gaa	cct	1296
25	Ser	Glu	Gly	Arg	Asn	Glu	Asp	Ala	Ser	Phe	Pro	Ser	Thr	Pro	Glu	Pro	

126
125

48/76

	420	425	430	
	gtg aag gac agc tcc aga gca tat att acc tgt gct tcc ttt acc tca			1344
	Val Lys Asp Ser Ser Arg Ala Tyr Ile Thr Cys Ala Ser Phe Thr Ser			
	435	440	445	
5	gca acc gaa agc acc aca gca aac act ttc cct ttg tta gaa gat cat			1392
	Ala Thr Glu Ser Thr Thr Ala Asn Thr Phe Pro Leu Leu Glu Asp His			
	450	455	460	
	act tca gaa aat aaa aca gat gaa aaa aaa ata gaa gaa agg aag gcc			1440
	Thr Ser Glu Asn Lys Thr Asp Glu Lys Lys Ile Glu Glu Arg Lys Ala			
	465	470	475	480
10	caa att ata aca gag aag act agc ccc aaa acg tca aat cct ttc ctt			1488
	Gln Ile Ile Thr Glu Lys Thr Ser Pro Lys Thr Ser Asn Pro Phe Leu			
	485	490	495	
	gta gca gta cag gat tct gag gca gat tat gtt aca aca gat acc tta			1536
	Val Ala Val Gln Asp Ser Glu Ala Asp Tyr Val Thr Thr Asp Thr Leu			
	500	505	510	
15	tca aag gtg act gag gca gca gtg tca aac atg cct gaa ggt ctg acg			1584
	Ser Lys Val Thr Glu Ala Ala Val Ser Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr			
	515	520	525	
	cca gat tta gtt cag gaa gca tgt gaa agt gaa ctg aat gaa gcc aca			1632
	Pro Asp Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu Ser Glu Leu Asn Glu Ala Thr			
20	530	535	540	
	ggg aca aag att gct tat gaa aca aaa gtg gac ttg gtc caa aca tca			1680
	Gly Thr Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys Val Asp Leu Val Gln Thr Ser			
	545	550	555	560
	gaa gct ata caa gaa tca ctt tac ccc aca gca cag ctt tgc cca tca			1728
25	Glu Ala Ile Gln Glu Ser Leu Tyr Pro Thr Ala Gln Leu Cys Pro Ser			
	565	570	575	

137
136

49/76

	ttt gag gaa gct gaa gca act ccg tca cca gtt ttg cct gat att gtt	1776
	Phe Glu Glu Ala Glu Ala Thr Pro Ser Pro Val Leu Pro Asp Ile Val	
	580 585 590	
5	atg gaa gca cca tta aat tct ctc ctt cca agc gct ggt gct tct gta	1824
	Met Glu Ala Pro Leu Asn Ser Leu Leu Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val	
	595 600 605	
	gtg cag ccc agt gta tcc cca ctg gaa gca cct cct cca gtt agt tat	1872
	Val Gln Pro Ser Val Ser Pro Leu Glu Ala Pro Pro Pro Val Ser Tyr	
	610 615 620	
10	gac agt ata aag ctt gag cct gaa aac ccc cca cca tat gaa gaa gcc	1920
	Asp Ser Ile Lys Leu Glu Pro Glu Asn Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Ala	
	625 630 635 640	
	atg aat gta gca cta aaa gct ttg gga aca aag gaa gga ata aaa gag	1968
	Met Asn Val Ala Leu Lys Ala Leu Gly Thr Lys Glu Gly Ile Lys Glu	
	645 650 655	
15	cct gaa agt ttt aat gca gct gtt cag gaa aca gaa gct cct tat ata	2016
	Pro Glu Ser Phe Asn Ala Ala Val Gln Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile	
	660 665 670	
	tcc att gcg tgt gat tta att aaa gaa aca aag ctc tcc act gag cca	2064
	Ser Ile Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu Thr Lys Leu Ser Thr Glu Pro	
20	675 680 685	
	agt cca gat ttc tct aat tat tca gaa ata gca aaa ttc gag aag tcg	2112
	Ser Pro Asp Phe Ser Asn Tyr Ser Glu Ile Ala Lys Phe Glu Lys Ser	
	690 695 700	
25	gtg ccc gaa cac gct gag cta gtg gag gat tcc tca cct gaa tct gaa	2160
	Val Pro Glu His Ala Glu Leu Val Glu Asp Ser Ser Pro Glu Ser Glu	
	705 710 715 720	

178
133

	cca gtt gac tta ttt agt gat gat tcg att cct gaa gtc cca caa aca	2208
	Pro Val Asp Leu Phe Ser Asp Asp Ser Ile Pro Glu Val Pro Gln Thr	
	725 730 - 735	
	caa gag gag gct gtg atg ctc atg aag gag agt ctc act gaa gtg tct	2256
	Gln Glu Glu Ala Val Met Leu Met Lys Glu Ser Leu Thr Glu Val Ser	
5	740 745 750	
	gag aca gta gcc cag cac aaa gag gag aga ctt agt gcc tca cct cag	2304
	Glu Thr Val Ala Gln His Lys Glu Glu Arg Leu Ser Ala Ser Pro Gln	
	755 760 765	
	gag cta gga aag cca tat tta gag tct ttt cag ccc aat tta cat agt	2352
10	Glu Leu Gly Lys Pro Tyr Leu Glu Ser Phe Gln Pro Asn Leu His Ser	
	770 775 780	
	aca aaa gat gct gca tct aat gac att cca aca ttg acc aaa aag gag	2400
	Thr Lys Asp Ala Ala Ser Asn Asp Ile Pro Thr Leu Thr Lys Lys Glu	
	785 790 795 800	
	aaa att tct ttg caa atg gaa gag ttt aat act gca att tat tca aat	2448
15	Lys Ile Ser Leu Gln Met Glu Glu Phe Asn Thr Ala Ile Tyr Ser Asn	
	805 810 815	
	gat gac tta ctt tct tct aag gaa gac aaa ata aaa gaa agt gaa aca	2496
	Asp Asp Leu Leu Ser Ser Lys Glu Asp Lys Ile Lys Glu Ser Glu Thr	
	820 825 830	
	ttt tca gat tca tct cag att gag ata ata gat gaa ttt ccc acg ttt	2544
20	Phe Ser Asp Ser Ser Pro Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr Phe	
	835 840 845	
	gtc agt gct aaa gat gat tct cct aaa tta gcc aag gag tac act gat	2592
	Val Ser Ala Lys Asp Asp Ser Pro Lys Leu Ala Lys Glu Tyr Thr Asp	
	850 855 860	
25	cta gaa gta tcc gac aaa agt gaa att gct aat atc caa agc ggg gca	2640

137
138

	Leu	Glu	Val	Ser	Asp	Lys	Ser	Glu	Ile	Ala	Asn	Ile	Gln	Ser	Gly	Ala	
	865					870					875					880	
	gat	tca	ttg	cct	tgc	tta	gaa	ttg	ccc	tgt	gac	ctt	tct	ttc	aag	aat	2688
	Asp	Ser	Leu	Pro	Cys	Leu	Glu	Leu	Pro	Cys	Asp	Leu	Ser	Phe	Lys	Asn	
					885					890					895		
5	ata	tat	cct	aaa	gat	gaa	gta	cat	gtt	tca	gat	gaa	ttc	tcc	gaa	aat	2736
	Ile	Tyr	Pro	Lys	Asp	Glu	Val	His	Val	Ser	Asp	Glu	Phe	Ser	Glu	Asn	
				900					905					910			
	agg	tcc	agt	gta	tct	aag	gca	tcc	ata	tog	cct	tca	aat	gtc	tct	gct	2784
	Arg	Ser	Ser	Val	Ser	Lys	Ala	Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asn	Val	Ser	Ala	
10			915					920					925				
	ttg	gaa	cct	cag	aca	gaa	atg	ggc	agc	ata	gtt	aaa	tcc	aaa	tca	ctt	2832
	Leu	Glu	Pro	Gln	Thr	Glu	Met	Gly	Ser	Ile	Val	Lys	Ser	Lys	Ser	Leu	
		930					935				940						
	acg	aaa	gaa	gca	gag	aaa	aaa	ctt	cct	tct	gac	aca	gag	aaa	gag	gac	2880
	Thr	Lys	Glu	Ala	Glu	Lys	Lys	Leu	Pro	Ser	Asp	Thr	Glu	Lys	Glu	Asp	
15	945				950					955					960		
	aga	tcc	ctg	tca	gct	gta	ttg	tca	gca	gag	ctg	agt	aaa	act	tca	gtt	2928
	Arg	Ser	Leu	Ser	Ala	Val	Leu	Ser	Ala	Glu	Leu	Ser	Lys	Thr	Ser	Val	
				965					970					975			
	gtt	gac	ctc	ctc	tac	tgg	aga	gac	att	aag	aag	act	gga	gtg	gtg	ttt	2976
20	Val	Asp	Leu	Leu	Tyr	Trp	Arg	Asp	Ile	Lys	Lys	Thr	Gly	Val	Val	Phe	
			980					985					990				
	ggg	gcc	agc	tta	ttc	ctg	ctg	ctg	tct	ctg	aca	gtg	ttc	agc	att	gtc	3024
	Gly	Ala	Ser	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Val	Phe	Ser	Ile	Val	
		995					1000					1005					
	agt	gta	acg	gcc	tac	att	gcc	ttg	gcc	ctg	ctc	tog	gtg	act	atc		3069
25	Ser	Val	Thr	Ala	Tyr	Ile	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	Ile		

	1010	1015	1020	
	agc ttt agg ata tat aag ggc	gtg atc cag gct atc	cag aaa tca	3114
	Ser Phe Arg Ile Tyr Lys Gly	Val Ile Gln Ala Ile	Gln Lys Ser	
	1025	1030	1035	
5	gat gaa ggc cac cca ttc agg	gca tat tta gaa tct	gaa gtt gct	3159
	Asp Glu Gly His Pro Phe Arg	Ala Tyr Leu Glu Ser	Glu Val Ala	
	1040	1045	1050	
	ata tca gag gaa ttg gtt cag	aaa tac agt aat tct	gct ctt ggt	3204
	Ile Ser Glu Glu Leu Val Gln	Lys Tyr Ser Asn Ser	Ala Leu Gly	
	1055	1060	1065	
10	cat gtg aac agc aca ata aaa	gaa ctg agg cgg ctt	ttc tta gtt	3249
	His Val Asn Ser Thr Ile Lys	Glu Leu Arg Arg Leu	Phe Leu Val	
	1070	1075	1080	
	gat gat tta gtt gat tcc ctg	aag ttt gca gtg ttg	atg tgg gtg	3294
	Asp Asp Leu Val Asp Ser Leu	Lys Phe Ala Val Leu	Met Trp Val	
	1085	1090	1095	
15	ttt act tat gtt ggt gcc ttg	ttc aat ggt ctg aca	cta ctg att	3339
	Phe Thr Tyr Val Gly Ala Leu	Phe Asn Gly Leu Thr	Leu Leu Ile	
	1100	1105	1110	
	tta gct ctg atc tca ctc ttc	agt att cct gtt att	tat gaa cgg	3384
	Leu Ala Leu Ile Ser Leu Phe	Ser Ile Pro Val Ile	Tyr Glu Arg	
20	1115	1120	1125	
	cat cag gtg cag ata gat cat	tat cta gga ctt gca	aac aag agt	3429
	His Gln Val Gln Ile Asp His	Tyr Leu Gly Leu Ala	Asn Lys Ser	
	1130	1135	1140	
	gtt aag gat gcc atg gcc aaa	atc caa gca aaa atc	cct gga ttg	3474
	Val Lys Asp Ala Met Ala Lys	Ile Gln Ala Lys Ile	Pro Gly Leu	
25	1145	1150	1155	

14/10

aag cgc aaa gca gat tga
Lys Arg Lys Ala Asp
1160

3492

5

<210> 26

<211> 1163

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

10

<400> 26

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

15

Pro Pro Arg Pro Pro Pro Ala Phe Lys Tyr Gln Phe Val Thr Glu Pro
20 25 30

Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Asp Asp
35 40 45

20

Glu Asp Leu Glu Glu Leu Glu Val Leu Glu Arg Lys Pro Ala Ala Gly
50 55 60

25

Leu Ser Ala Ala Ala Val Pro Pro Ala Ala Ala Ala Pro Leu Leu Asp
65 70 75 80

142
141

54/76

	Phe	Ser	Ser	Asp	Ser	Val	Pro	Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	Pro	Leu	Pro	Ala	
					85					90					95		
	Ala	Pro	Pro	Ala	Ala	Pro	Glu	Arg	Gln	Pro	Ser	Trp	Glu	Arg	Ser	Pro	
5				100					105					110			
	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	Leu	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Val	Leu	Pro	Ser	
			115					120					125				
10	Lys	Leu	Pro	Glu	Asp	Asp	Glu	Pro	Pro	Ala	Arg	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	
		130					135					140					
	Pro	Ala	Gly	Ala	Ser	Pro	Leu	Ala	Glu	Pro	Ala	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr	
	145					150				155						160	
15	Pro	Ala	Ala	Pro	Lys	Arg	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Val	Asp	Glu	Thr	Leu	
					165				170						175		
	Phe	Ala	Leu	Pro	Ala	Ala	Ser	Glu	Pro	Val	Ile	Pro	Ser	Ser	Ala	Glu	
				180					185					190			
20	Lys	Ile	Met	Asp	Leu	Met	Glu	Gln	Pro	Gly	Asn	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	
			195					200					205				
	Gln	Glu	Asp	Phe	Pro	Ser	Val	Leu	Leu	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Pro	
25			210				215					220					

143
H2

55/76

Ser Leu Ser Pro Leu Ser Thr Val Ser Phe Lys Glu His Gly Tyr Leu
225 230 235 240

Gly Asn Leu Ser Ala Val Ser Ser Ser Glu Gly Thr Ile Glu Glu Thr
245 250 255

5

Leu Asn Glu Ala Ser Lys Glu Leu Pro Glu Arg Ala Thr Asn Pro Phe
260 265 270

Val Asn Arg Asp Leu Ala Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr Ser Glu Met
275 280 285

10

Gly Ser Ser Phe Lys Gly Ser Pro Lys Gly Glu Ser Ala Ile Leu Val
290 295 300

Glu Asn Thr Lys Glu Glu Val Ile Val Arg Ser Lys Asp Lys Glu Asp
305 310 315 320

15

Leu Val Cys Ser Ala Ala Leu His Ser Pro Gln Glu Ser Pro Val Gly
325 330 335

Lys Glu Asp Arg Val Val Ser Pro Glu Lys Thr Met Asp Ile Phe Asn
340 345 350

20

Glu Met Gln Met Ser Val Val Ala Pro Val Arg Glu Glu Tyr Ala Asp
355 360 365

Phe Lys Pro Phe Glu Gln Ala Trp Glu Val Lys Asp Thr Tyr Glu Gly

25

144
143

56/76

	370		375			380										
	Ser	Arg	Asp	Val	Leu	Ala	Ala	Arg	Ala	Asn	Val	Glu	Ser	Lys	Val	Asp
	385					390					395					400
5																
	Arg	Lys	Cys	Leu	Glu	Asp	Ser	Leu	Glu	Gln	Lys	Ser	Leu	Gly	Lys	Asp
					405					410					415	
	Ser	Glu	Gly	Arg	Asn	Glu	Asp	Ala	Ser	Phe	Pro	Ser	Thr	Pro	Glu	Pro
					420					425					430	
10																
	Val	Lys	Asp	Ser	Ser	Arg	Ala	Tyr	Ile	Thr	Cys	Ala	Ser	Phe	Thr	Ser
			435					440						445		
	Ala	Thr	Glu	Ser	Thr	Thr	Ala	Asn	Thr	Phe	Pro	Leu	Leu	Glu	Asp	His
			450					455						460		
15																
	Thr	Ser	Glu	Asn	Lys	Thr	Asp	Glu	Lys	Lys	Ile	Glu	Glu	Arg	Lys	Ala
							470					475				480
	Gln	Ile	Ile	Thr	Glu	Lys	Thr	Ser	Pro	Lys	Thr	Ser	Asn	Pro	Phe	Leu
20						485					490					495
	Val	Ala	Val	Gln	Asp	Ser	Glu	Ala	Asp	Tyr	Val	Thr	Thr	Asp	Thr	Leu
						500					505				510	
	Ser	Lys	Val	Thr	Glu	Ala	Ala	Val	Ser	Asn	Met	Pro	Glu	Gly	Leu	Thr
25						515					520				525	

145
144

57/76

Pro Asp Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu Ser Glu Leu Asn Glu Ala Thr
530 535 540

5 Gly Thr Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys Val Asp Leu Val Gln Thr Ser
545 550 555 560

Glu Ala Ile Gln Glu Ser Leu Tyr Pro Thr Ala Gln Leu Cys Pro Ser
565 570 575

10 Phe Glu Glu Ala Glu Ala Thr Pro Ser Pro Val Leu Pro Asp Ile Val
580 585 590

Met Glu Ala Pro Leu Asn Ser Leu Leu Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val
595 600 605

15 Val Gln Pro Ser Val Ser Pro Leu Glu Ala Pro Pro Pro Val Ser Tyr
610 615 620

Asp Ser Ile Lys Leu Glu Pro Glu Asn Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Ala
625 630 635 640

20 Met Asn Val Ala Leu Lys Ala Leu Gly Thr Lys Glu Gly Ile Lys Glu
645 650 655

25 Pro Glu Ser Phe Asn Ala Ala Val Gln Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile
660 665 670

5

10

15

20

25

Lys Ile Ser Leu Gln Met Glu Glu Phe Asn Thr Ala Ile Tyr Ser Asn
805 810 815

147
A6

59/76

Asp Asp Leu Leu Ser Ser Lys Glu Asp Lys Ile Lys Glu Ser Glu Thr
820 825 830

Phe Ser Asp Ser Ser Pro Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr Phe
835 840 845

5

Val Ser Ala Lys Asp Asp Ser Pro Lys Leu Ala Lys Glu Tyr Thr Asp
850 855 860

10

Leu Glu Val Ser Asp Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ile Gln Ser Gly Ala
865 870 875 880

Asp Ser Leu Pro Cys Leu Glu Leu Pro Cys Asp Leu Ser Phe Lys Asn
885 890 895

15

Ile Tyr Pro Lys Asp Glu Val His Val Ser Asp Glu Phe Ser Glu Asn
900 905 910

Arg Ser Ser Val Ser Lys Ala Ser Ile Ser Pro Ser Asn Val Ser Ala
915 920 925

20

Leu Glu Pro Gln Thr Glu Met Gly Ser Ile Val Lys Ser Lys Ser Leu
930 935 940

Thr Lys Glu Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr Glu Lys Glu Asp
945 950 955 960

25

Arg Ser Leu Ser Ala Val Leu Ser Ala Glu Leu Ser Lys Thr Ser Val

148
147

60/76

965

970

975

Val Asp Leu Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val Phe
980 985 990

5

Gly Ala Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val
995 1000 1005

Ser Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile
1010 1015 1020

10

Ser Phe Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser
1025 1030 1035

Asp Glu Gly His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala
1040 1045 1050

15

Ile Ser Glu Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly
1055 1060 1065

His Val Asn Ser Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val
1070 1075 1080

20

Asp Asp Leu Val Asp Ser Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Val
1085 1090 1095

Phe Thr Tyr Val Gly Ala Leu Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile
1100 1105 1110

25

5

10

15

20

<211> 25

<213> Rattus norvegicus

<221> PEPTIDO

<223> PEP4 de rata

25

150
149

<400> 27

Glu Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His Val Asn
1 5 10 15

5 Ser Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu
20 25

<210> 28

10 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> péptido rico en PRO/SER

<220>

<221> PEPTIDO

20 <222> (1)..(17)

<223> Péptido sintético

25 <400> 28

181
180

Pro Ser Ser Pro Pro Pro Ser Ser Pro Pro Pro Ser Ser Pro Pro Pro
1 5 10 15

Ser

5

<210> 29

<211> 25

<212> ADN

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> CA-NA-2F

<220>

<221> iniciador_unión

<222> (1)..(25)

20

<223> iniciador CA-NA-2F

<400> 29

aagcaccatt gaattctgca gttcc

25

25

152
151

<210> 30

<211> 28

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> CA-NA-3R

<220>

<221> iniciador_unión

<222> (1)..(28)

15 <223>

<400> 30

aactgcagta ctgagctcct ccatctgc

20

<210> 31

<211> 33

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

153
152

<220>

<223> 5' anterior

<220>

5 <221> iniciador_unión

<222> (1)..(33)

<223> iniciador anterior

10

<400> 31
gtcgcgatc catggagacc ctttttgctc ttc 33

<210> 32

15 <211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> 5' inverso

<220>

25

1/34
153

<221> iniciador_unión

<222> (1) .. (27)

<223> iniciador inverso

5

<400> 32

gttctcgagt tatgaagttt tactcag

27

<210> 33

10

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> 5'-1 anterior

<220>

20

<221> iniciador_unión

<222> (1) .. (29)

<223> iniciador

25

<400> 33

185
151

	gtgcggatcc atggatttga aggagcagc	29
	<210> 34	
	<211> 28	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> 5'-1 inverso	
	<220>	
	<221> iniciador_unión	
15	<222> (1)..(28)	
	<223> iniciador	
20	<400> 34 gtttctcgag tgaagtttta ttcagctc	28
	<210> 35	
	<211> 20	
25	<212> ADN	

136
15

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> iniciador 5'	
	<220>	
	<221> iniciador_unión	
10	<222> (1)..(20)	
	<223> iniciador	
	<400> 35	
15	tccaccccg cgcgcgcca	20
	<210> 36	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> iniciador 2 5'	

137
156

<220>

<221> iniciador_unión

<222> (1) .. (22)

5 <223> iniciador

<400> 36
aatgatgggc aaagctgtgc tg 22

10

<210> 37

<211> 24

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> iniciador 3'

20 <220>

<221> iniciador_unión

<222> (1) .. (24)

25 <223> iniciador

158
153

	<400> 37	
	ggtacaaaga ttgcttatga aaca	24
		.
	<210> 38	
5	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10		
	<220>	
	<223> iniciador 2 3'	
	<220>	
15	<221> iniciador_unión	
	<222> (1)..(22)	
	<223> iniciador	
20		
	<400> 38	
	agcagggcca aggcaatgta gg	22
	<210> 39	

25

156
158

	<211>	28	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
5			
	<220>		
	<223>	líder 5'-VL	
10	<220>		
	<221>	iniciador_unión	
	<222>	(1) .. (28)	
	<223>	iniciador	
15			
	<400>	39	
		aatatgagtc ctgcccagtt cctgtttc	28
	<210>	40	
20	<211>	32	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
25			

160
159

<220>

<223> 3'-Ck

<220>

5 <221> iniciador_unión

<222> (1) .. (32)

<223> iniciador

10

<400> 40
ttaggaattc ctaacactct cccctgttga ag 32

<210> 41

15 <211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> líder 5'-VH

<220>

25 <221> iniciador_unión

141
160

<222> (1)..(31)

<223> iniciador

5 <400> 41
aatatggatt ttgggctgat tttttttatt g 31

<210> 42

<211> 24

10

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> gozne 3'-CH

<220>

<221> iniciador_unión

20

<222> (1)..(24)

<223> iniciador

<400> 42
25 aattgggcaa cgttgcaggt gacg 24

162
161

<210> 43

<211> 663

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> varios_unión

10 <222> (1)..(663)

<223> Parte variable de ADN de 3A6 de cadena pesada

15 <400> 43

atggattttg ggctgatttt ttttattggt ggtcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg 60

aagcttctcg agtctggagg tggcctggtg cagcctggag gatccctgaa actctcctgt 120

gtagtctcag gattcgattt tagaagaaat tggatgagtt gggtcctggca ggctcctggg 180

20 aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtaagataaa ctatacgcca 240

tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaatgcc aagaatacgt gtacctgcaa 300

gtgagcacag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgtgagacc ggtctggatg 360

tatgctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctcagc caaaacgaca 420

25 ccccatctg tctatccact ggcccctgga tctgctgccc aaactaactc catggtgacc 480

14/3
162

	ctgggatgcc tgggtcaaggg ctatttcctt gagccagtga cagtgcctg gaactctgga	540
	tccctgtcca gcggtgtgca caccttccca gctgtcctgc agtctgacct ctacactctg	600
	agcagctcag tgactgtccc ctccagcacc tggcccagcg agaccgtcac ctgcaacggt	660
5	gcc	663
	<210> 44	
	<211> 717	
10	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
	<220>	
15	<221> varios_unión	
	<222> (1) .. (717)	
	<223> Parte variable de 3A6 de cadena ligera	
20	<400> 44	
	atgagtcctg cccagttcct gtttctgtta gtgctctgga ttgggaaac cagcggtgat	60
	gttctgttga cccagactcc tctcactttg tcgataacca ttggacaacc agcctccatc	120
25	tcttgcaagt caagtcagag cctcttgcac agtgatggaa agacatattt gaattgggtg	180

164
163

	ttacagagggc cagggccagtc tccaaagcgc ctaatctatc tgggtgtctaa actggactct	240
	ggagtcacctg acagggttcac tggcagtgga tcagggacgg atttcacact gaaaatcagc	300
	agagtggagg ctgaggattt gggactttat tattgctggc aaggtacaca ttttcctcag	360
5	acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc	420
	atcttcccac catccagtga gcagttaaca tctggaggtg cctcagtcgt gtgcttcttg	480
	aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaaga ttgatggcag tgaacgacaa	540
	aatggogtcc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc	600
10	agcaccctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc	660
	actcacaaga catcaacttc acccatgttc aagagcttca acaggggaga gtgttag	717

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
31 March 2005 (31.03.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/028508 A2

(51) International Patent Classification⁷: C07K 16/00

Martin, E. [CH/CH], Berninastrasse 96, CH-8057 Zurich
(CH) VITALITI, Alessandra [CH/CH], CH-6981 Bedigliora (CH)

(21) International Application Number:
PCT/EP2004/010489

(74) Agent: GRUBB, Philip, Novartis AG, Corporate Intellectual Property, CH-4002 Basel (CH)

(22) International Filing Date:
17 September 2004 (17 09 2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Date:
0321997 9 19 September 2003 (19 09 2003) GB

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

(71) Applicant (for all designated States except AT, US): NOVARTIS AG [CH/CH], Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel (CH)

(71) Applicant (for AT only): NOVARTIS PHARMA GMBH [AT/AT], Brunner Strasse 59, A-1230 Vienna (AT)

(71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITY OF ZURICH [CH/CH], Ramistrasse 71, CH-8006 Zurich (CH)

(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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

(72) Inventors; and/

(75) Inventors/Applicants (for US only): BARSKE, Carmen [DE/DE], Birkenweg 10, 79540 Lorrach (DE) FRENTZEL, Stefan [DE/DE], Theodor-Heuss-Strasse 46, 79539 Lorrach (DE) MIR, Anis, Khuro [GB/FR], 6, rue des Vosges, F-68870 Bartenheim (FR) SCHWAR,

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette

(54) Title: NOGO-A BINDING MOLECULES AND PHARMACEUTICAL USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention provides a binding molecule which is capable of binding to the human NogoA polypeptide or human NtG or human NtG-D20 or human NogoA₃₄₂₋₃₅₇ with a dissociation constant < 1000nM, a polynucleotide encoding such binding molecule, an expression vector comprising said polynucleotide, an expression system comprising a polynucleotide capable of producing a binding molecule, an isolated host cell which comprises an expression system as defined above, the use of such binding molecule as a pharmaceutical, especially in the treatment of nerve repair a pharmaceutical composition comprising said binding molecule, and a method of treatment of diseases associated with nerve repair



WO 2005/028508 A2

PATENT COOPERATION TREATY

LAU
166
103

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

Corporate Intellectual Property	
- 5. Sep. 2005	
 PCT	PS Copy

To:

LEON, Susanna
NOVARTIS AG
Corporate Intellectual Property
CH-4002 Basel
SUISSE

Corporate Intellectual Property
- 5. Sep. 2005

F/F M/D F/L PS Copy

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year) 02.09.2005

Applicant's or agent's file reference
PN/4-33349A/UNZ

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No
PCT/EP2004/010489

International filing date (day/month/year)
17.09.2004

Priority date (day/month/year)
19.09.2003

Applicant
NOVARTIS AG et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel +49 89 2399 - 0 Tx 523656 apmu d
Fax +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Cleere, C
Tel +49 89 2399-7713



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PN4-33349A/JNZ	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA/416																								
International application No PCT/EP2004/010489	International filing date (day/month/year) 17.09.2004	Priority date (day/month/year) 19.09.2003																									
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K16/18, C07K16/08																											
Applicant NOVARTIS AG et al.																											
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 9 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions) ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).																											
4. This report contains indications relating to the following items: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 10%;">☒</td> <td style="width: 10%;">Box No. I</td> <td>Basis of the opinion</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Box No. II</td> <td>Priority</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Box No. III</td> <td>Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Box No. IV</td> <td>Lack of unity of invention</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Box No. V</td> <td>Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Box No. VI</td> <td>Certain documents cited</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Box No. VII</td> <td>Certain defects in the international application</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Box No. VIII</td> <td>Certain observations on the international application</td> </tr> </table>				☒	Box No. I	Basis of the opinion	☐	Box No. II	Priority	☒	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	☐	Box No. IV	Lack of unity of invention	☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement	☒	Box No. VI	Certain documents cited	☐	Box No. VII	Certain defects in the international application	☐	Box No. VIII	Certain observations on the international application
☒	Box No. I	Basis of the opinion																									
☐	Box No. II	Priority																									
☒	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability																									
☐	Box No. IV	Lack of unity of invention																									
☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement																									
☒	Box No. VI	Certain documents cited																									
☐	Box No. VII	Certain defects in the international application																									
☐	Box No. VIII	Certain observations on the international application																									
Date of submission of the demand 05.07.2005		Date of completion of this report 02.09.2005																									
Name and mailing address of the international preliminary examining authority European Patent Office D-80298 Munich Tel +49 89 2399 - 0 Tx 523656 apmu d Fax +49 89 2399 - 4465		Authorized Officer Lechner, O Telephone No +49 89 2399- 8687																									



**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2004/010489

168
167

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item
- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements of the international application, this report is based on: (replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):

Description, Pages

1-36 as originally filed

Claims, Numbers

1-19 as originally filed

☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (specify):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (specify):

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (specify):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (specify):

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2004/010489

169
68

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
☒ claims Nos. 1-8, 10, 12-19 (all in part)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 18, 19 (in part) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☒ no international search report has been established for the said claims Nos. 1-8, 10, 12-19 (all in part)
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
- the written form ☐ has not been furnished
☐ does not comply with the standard
- the computer readable form ☐ has not been furnished
☐ does not comply with the standard
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2004/010489

170
109

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	2-9, 11
	No: Claims	1, 10, 12-19
Inventive step (IS)	Yes: Claims	3, 5, 6, 7, 8, 9, 11
	No: Claims	1, 2, 4, 10, 12-19
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-17 (c.f. sep sheet)
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No
PCT/EP2004/010489

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☐ filed together with the international application in computer readable form
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
 - ☒ received by this Authority as an amendment on
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional observations, if necessary:

Item III

1. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability (Rule 67.1, PCT)

Claims 18, 19 relate to subject matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv), PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject matter of these claims (Article 34(4)(a)(I), PCT).

2. Clarity (Article 6, PCT)

1. Claims 1, 10, 12-19 are unclear in the sense of Article 6, PCT. The claims attempt to define the subject-matter in terms of the result to be achieved, i.e. binding molecules which is capable of binding to the human NogoA polypeptide...with a $K_d < 1$ microM, i.e. in terms of functional features. Although these functional features can be tested with the methods disclosed in the present application, the skilled person cannot understand the definition of the claimed subject-matter, because the claimed compounds are not limited by any structural definition and therefore no limits to the number of compounds to be tested for the modulating activity exist. The claim does not provide any criterion to discriminate between known and novel compounds. Thus, the lack of clarity is to such an extent that a meaningful search over the entire scope of said claims cannot be carried out.

Consequently, the search and examination has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear in view of the description, namely those parts relating to anti-NogoA/Nig/Nig-D20 mAb.

2. Claims 4-8, 10, 12-19 are unclear in the sense of Article 6, PCT as far as relating to "direct equivalents". No definition for said expression is to be found either in the claims nor the description. A meaningful search over the entire scope of said claims cannot be carried out.

Consequently, the search and examination has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear in view of the description, namely mAb 3A6 as defined by the specific CDR sequences of the VL AND VH chains (SeqID 8-13).

Item V

1 Reference is made to the following documents:

D1 FIEDLER M ET AL: "An engineered IN-1 F(ab) fragment with improved affinity for the NogoA axonal growth inhibitor permits immunochemical detection and shows enhanced neutralizing activity." PROTEIN ENGINEERING. NOV 2002, vol. 15, no. 11, November 2002 (2002-11), pages 931-941, XP002321233 ISSN: 0269-2139

2 Novelty (Article 33(2), PCT)

2.1 **D1** describes the affinity maturation of a IN-1 F(ab) fragment via protein engineering. Its Kd for the complex with the recombinant NogoA fragment is ~ 1 microM, 8-times higher than that of the unmutated IN-1 F(ab) fragment. The engineered F(ab) fragment appears to be well suited for the specific detection of NogoA and, most importantly, its concentration-dependent neutralizing effect on the NogoA inhibitory activity is significantly enhanced in cell culture.

Thus, in view of the teachings of **D1**, the subject matter of **claims 1, 10, 12-19**, as far as examined (c.f. item III above), would not appear to be novel in the sense of **Article 33(2), PCT**.

2.2 It would appear that no documents are comprised in the available prior art disclosing the anti-NogoA mAb 3A6 as defined by SeqIDs 2, 3, 8-13, 14-19. Therefore, the subject matter of **claims 2-9, 11** would appear to be novel in the sense of **Article 33(2), EPC**.

3 Inventive step (Article 33(3), PCT)

The subject matter of **claims 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11** would appear to involve an inventive step in the sense of **Art. 33(3), PCT** for the following reasons:

D1 is considered to be the closest prior art and describes the affinity maturation of a IN-1 F(ab) fragment via protein engineering. Its Kd for the complex with the recombinant NogoA fragment is ~ 1 microM, 8-times higher than that of the unmutated IN-1 F(ab) fragment. The engineered F(ab) fragment appears to be well suited for the specific detection of NogoA and, most importantly, its concentration-dependent neutralizing effect on the NogoA inhibitory activity is significantly enhanced in cell culture.

The subject matter of **claims 3, 5, 9, 11**, as far as examined (c.f. item III above), differs from **D1** in that it discloses the anti-NogoA mAb 3A6 having an affinity of 0.14 - 2.7 nM. Therefore, the technical problem is to provide an anti-NogoA Ab with enhanced affinity. The claimed solution is the anti-NogoA mAb 3A6 as defined by SeqID 2, 3, 9-13, 14-19.

Although the experiments do not directly compare mAb 3A6 with the Ab of the closest prior art, it is reasonable to expect that a mAb with 500-1000-fold enhanced affinity would also show a higher specific biological activity.

Thus, the subject matter of **claims 3, 5, 9, 11** and their dependent **claims 6-8** (all as far as examined, c.f. item III above) would appear to involve an inventive step in the sense of **Article 33(3), PCT**.

Concerning the subject matter of **claims 2, 4** the application does not provide any data showing that an Ab consisting of only the CDR-H1-3 OR CDR-L1-3 OR the hypervariable regions CDR-H1, -H2 and -H3, of which each of the hypervariable regions are at least 50% homologous to their equivalent etc. would have the desired technical effect. Thus, no inventive step in the sense of **Art. 33(3), PCT** can be acknowledged for the subject matter of **claims 2, 4**.

4 further important remarks

- 4.1 Claim 3, 8, 10, 12-19:** The application provides support for an anti-NogoA/Nig/Nig-D20 Ab with a $K_d < 1000$ nM characterized by the CDR-H1-3 and CDR-L1-3 (SeqID 8-13). However, no support for an Ab comprising antigen binding sites of which each of the hypervariable regions are at least 50% homologous to their equivalent hypervariable regions the CDR-H1-3 and CDR-L1-3 binding to NogoA, NIG and Nig-D20 with a dissociation constant < 1000 nM is provided in the application (**Art. 6, PCT**).
- 4.2** The vague statements in the description on p 23, §2 imply that the subject-matter for which protection is sought may be different to that defined by the claims, thereby resulting in lack of clarity (**Article 6, PCT**) when used to interpret them.
- 4.3** Abbreviations used within the claims, e.g. NIG, NIG-20D should be spelled out at first occurrence, and then introduced by placing the abbreviation in parentheses after the term being abbreviated (**Art. 6, PCT, Guidelines 5.31**).

item VI

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2004/010489

1 Certain documents cited

The applicants attention is drawn to WO2004/052932 apparently disclosing Ab with the same aa sequences as mAb 3A6. WO2004/052932 has a valid priority of 02.12.2002 and was published on 24.06.2004.

13.07.2006 Compactus
PN/4 -33349A/UNZ
Adrian Spillmann

OFFACT
PCT
EP2004/010489

Corporate Intellectual Property

13. Mai 2005

F/F M/D F/L PS Copy

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To.

NOVARTIS AG
Corporate Intellectual Property
Attn. Grubb, Philip
CH-4002 Basel
SWITZERLAND

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year)

13/05/2005

Applicant's or agent's file reference

PN/4 -33349A/UNZ

FOR FURTHER ACTION

See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/EP2004/010489

International filing date
(day/month/year)

17/09/2004

Applicant

NOVARTIS AG

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith

Filing of amendments and statement under Article 18:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No. (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site

Name and mailing address of the International Searching Authority



European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Catriona Cleere

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g., the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

178
177

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged,
- (ii) the claim is cancelled,
- (iii) the claim is new,
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed,
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51].
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged, new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added" or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14, claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)".

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PN/4 -33349A/UNZ	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No PCT/EP2004/010489	International filing date (day/month/year) 17/09/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 19/09/2003
Applicant NOVARTIS AG		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 7 sheets



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. 1.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant



the text has been established by this Authority to read as follows:

NOGO-A BINDING WITH ENHANCED AFFINITY AND PHARMACEUTICAL USE THEREOF

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant.



as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.



as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2004/010489

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1 With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☒

In written format

☒

in computer readable form

c time of filing/furnishing

☒

contained in the international application as filed

☐

filed together with the international application in computer readable form

☒

furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/010489A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K16/18

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)
IPC 7 C07K

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, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	FIEDLER M ET AL: "An engineered IN-1 F(ab) fragment with improved affinity for the Nogo-A axonal growth inhibitor permits immunochemical detection and shows enhanced neutralizing activity." PROTEIN ENGINEERING. NOV 2002, vol. 15, no. 11, November 2002 (2002-11), pages 931-941, XP002321233 ISSN: 0269-2139 the whole document	1-19
P, X	WO 2004/052932 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS PHARMA GMBH; UNIVERSITAET ZUERICH; BARSKE, CARME) 24 June 2004 (2004-06-24) abstract	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C☒ Patent family members are listed in 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

26 April 2005

Date of mailing of the international search report

13/05/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lechner, O

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	HUNT D ET AL: "The Nogo receptor, its ligands and axonal regeneration in the spinal cord; a review." JOURNAL OF NEUROCYTOLOGY. FEB 2002, vol. 31, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 93-120, XP002321234 ISSN: 0300-4864 abstract page 110, right-hand column, paragraph 2 - page 113	1-19
A	MERKLER DORGE ET AL: "Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A" JOURNAL OF NEUROSCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 21, no. 10, 15 May 2001 (2001-05-15), pages 3665-3673, XP002293416 ISSN: 0270-6474 the whole document	1-19
A	RAINETEAU O ET AL: "IMPROVED LOCOMOTOR RECOVERY IN SPINAL CORD INJURED RATS TREATED WITH THE MONOCLONAL ANTIBODY IN-1" ABSTRACTS OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 27, no. 2, 2001, page 1833, XP001199820 ISSN: 0190-5295 abstract	1-19
A	LI W ET AL: "NEUTRALIZATION OF MYELIN - ASSOCIATED NOGO - A BY A NOGO RECEPTOR - Fc FUSION PROTEIN" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, US, 2002, page ABS3332, XP001199824 ISSN: 0190-5295 abstract	1-19
A	CHOI E D ET AL: "CHARACTERIZATION OF AN ANTI - NOGO RECEPTOR FAB THAT DISRUPTS NOGOA/NOGO RECEPTOR INTERACTION" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, US, 2002, page ABST3331, XP001199822 ISSN: 0190-5295 abstract -/--	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/010489183
182

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	POT CAROLINE ET AL: "Nogo-A expressed in Schwann cells impairs axonal regeneration after peripheral nerve injury" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 159, no. 1, 14 October 2002 (2002-10-14), pages 29-35, XP002293417 ISSN: 0021-9525 abstract -----	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2004/010489

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely

Although claims 18, 19 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

185
181

International Application No
PCT/EP2004/010489

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004052932 A	24-06-2004	AU 2003289998 A1	30-06-2004
		WO 2004052932 A2	24-06-2004

186
185

PCT

see form PCT/ISA/220

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**
(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No
PCT/EP2004/010489

International filing date (day/month/year)
17.09 2004

Priority date (day/month/year)
19 09 2003

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C07K16/18

Applicant
NOVARTIS AG

- 1. This opinion contains indications relating to the following items**

- | | |
|---|---|
| ☒ Box No. I | Basis of the opinion |
| ☒ Box No. II | Priority |
| ☒ Box No. III | Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability |
| ☐ Box No. IV | Lack of unity of invention |
| ☒ Box No. V | Reasoned statement under Rule 43bis 1 (a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement |
| ☒ Box No. VI | Certain documents cited |
| ☐ Box No. VII | Certain defects in the international application |
| ☐ Box No. VIII | Certain observations on the international application |

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 65.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220

- 3 For further details, see notes to Form PCT/ISA/220**

Name and mailing address of the ISA



Authorized Officer

Lechner, O

Telephone No +49 89 2399-8687



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2004/010489

187
106

Box No. 1 Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☒ in written format
☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☒ contained in the international application as filed.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2004/010489

1/38
183

Box No. II Priority

1. ☐ The following document has not been furnished:

☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66 7(a))

☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis 1 and 66 7(b))

Consequently it has not been possible to consider the validity of the priority claim. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.

2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. ☒ The International Searching Authority has not been able to consider the validity of the priority claim because a copy of the earlier application whose priority has been claimed was not available to the International Searching Authority at the time that the search was conducted (Rule 17.1). This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.

4. Additional observations, if necessary:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2004/010489

18A
18B

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application,
☒ claims Nos. 1-8, 10, 12-19 (all in part)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 18, 19 (in part) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 1-8, 10, 12-19 (all in part)
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
- | | |
|----------------------------|--|
| the written form | ☐ has not been furnished |
| | ☐ does not comply with the standard |
| the computer readable form | ☐ has not been furnished |
| | ☐ does not comply with the standard |
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2004/010489

1910
189

**Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or
Industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	2-9, 11
	No: Claims	1, 10, 12-19
Inventive step (IS)	Yes: Claims	3, 5, 6, 7, 8, 9, 11
	No: Claims	1, 2, 4, 10, 12-19
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-17 (c.f. sep sheet)
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

191
140

Item III

1 Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability (Rule 67.1, PCT)

Claims 18, 19 relate to subject matter considered by this Authority to be covered by the provisions of **Rule 67.1(iv), PCT**. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject matter of these claims (**Article 34(4)(a)(I), PCT**).

2 Clarity (Article 6, PCT)

2.1 Claims 1, 10, 12-19 are unclear in the sense of **Article 6, PCT**. The claims attempt to define the subject-matter in terms of the result to be achieved, i.e. binding molecules which is capable of binding to the human NogoA polypeptide...with a $K_d < 1$ microM, i.e. in terms of functional features. Although these functional features can be tested with the methods disclosed in the present application, the skilled person cannot understand the definition of the claimed subject-matter, because the claimed compounds are not limited by any structural definition and therefore no limits to the number of compounds to be tested for the modulating activity exist. The claim does not provide any criterion to discriminate between known and novel compounds. Thus, the lack of clarity is to such an extent that a meaningful search over the entire scope of said claims cannot be carried out.

Consequently, the search and examination has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear in view of the description, namely those parts relating to anti-NogoA/Nig/Nig-D20 mAb.

2.2 Claims 4-8, 10, 12-19 are unclear in the sense of **Article 6, PCT** as far as relating to "direct equivalents". No definition for said expression is to be found either in the claims nor the description. A meaningful search over the entire scope of said claims cannot be carried out.

Consequently, the search and examination has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear in view of the description, namely mAb 3A6 as defined by the specific CDR sequences of the VL AND VH chains (SeqID 8-13).

Item V

1 Reference is made to the following documents:

D1 FIEDLER M ET AL: "An engineered IN-1 F(ab) fragment with improved affinity for the NogoA axonal growth inhibitor permits immunochemical detection and shows enhanced

neutralizing activity." PROTEIN ENGINEERING. NOV 2002, vol. 15, no. 11, November 2002 (2002-11), pages 931-941, XP002321233 ISSN: 0269-2139

2 Novelty (Article 33(2), PCT)

2.1 D1 describes the affinity maturation of a IN-1 F(ab) fragment via protein engineering. Its Kd for the complex with the recombinant NogoA fragment is ~ 1 microM, 8-times higher than that of the unmutated IN-1 F(ab) fragment. The engineered F(ab) fragment appears to be well suited for the specific detection of NogoA and, most importantly, its concentration-dependent neutralizing effect on the NogoA inhibitory activity is significantly enhanced in cell culture.

Thus, in view of the teachings of D1, the subject matter of **claims 1, 10, 12-19**, as far as examined (c.f. item III above), would not appear to be novel in the sense of **Article 33(2), PCT**.

2.2 It would appear that no documents are comprised in the available prior art disclosing the anti-NogoA mAb 3A6 as defined by SeqIDs 2, 3, 8-13, 14-19. Therefore, the subject matter of **claims 2-9, 11** would appear to be novel in the sense of **Article 33(2), EPC**.

3 Inventive step (Article 33(3), PCT)

The subject matter of **claims 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11** would appear to involve an inventive step in the sense of **Art. 33(3), PCT** for the following reasons:

D1 is considered to be the closest prior art and describes the affinity maturation of a IN-1 F(ab) fragment via protein engineering. Its Kd for the complex with the recombinant NogoA fragment is ~ 1 microM, 8-times higher than that of the unmutated IN-1 F(ab) fragment. The engineered F(ab) fragment appears to be well suited for the specific detection of NogoA and, most importantly, its concentration-dependent neutralizing effect on the NogoA inhibitory activity is significantly enhanced in cell culture.

The subject matter of **claims 3, 5, 9, 11**, as far as examined (c.f. item III above), differs from D1 in that it discloses the anti-NogoA mAb 3A6 having an affinity of 0.14 - 2.7 nM. Therefore, the technical problem is to provide an anti-NogoA Ab with enhanced affinity. The claimed solution is the anti-NogoA mAb 3A6 as defined by SeqID 2, 3, 9-13, 14-19.

Although the experiments do not directly compare mAb 3A6 with the Ab of the closest prior art, it is reasonable to expect that a mAb with 500-1000-fold enhanced affinity would also show a higher specific biological activity.

Thus, the subject matter of **claims 3, 5, 9, 11** and their dependent **claims 6-8** (all as far as examined, c.f. item III above) would appear to involve an inventive step in the sense of **Article 33(3), PCT**.

Concerning the subject matter of **claims 2, 4** the application does not provide any data showing that an Ab consisting of only the CDR-H1-3 **OR** CDR-L1-3 **OR** the hypervariable regions CDR-H1, -H2 and -H3, of which each of the hypervariable regions are at least 50% homologous to their equivalent etc. would have the desired technical effect. Thus, no inventive step in the sense of **Art. 33(3), PCT** can be acknowledged for the subject matter of **claims 2, 4**.

4 further important remarks

- 4.1 Claim 3, 8, 10, 12-19:** The application provides support for an anti-NogoA/Nig/Nig-D20 Ab with a $K_d < 1000$ nM characterized by the CDR-H1-3 and CDR-L1-3 (SeqID 8-13). However, no support for an Ab comprising antigen binding sites of which each of the hypervariable regions are at least 50% homologous to their equivalent hypervariable regions the CDR-H1-3 and CDR-L1-3 binding to NogoA, NIG and Nig-D20 with a dissociation constant < 1000 nM is provided in the application (**Art. 6, PCT**).
- 4.2** The vague statements in the description on p 23, §2 imply that the subject-matter for which protection is sought may be different to that defined by the claims, thereby resulting in lack of clarity (**Article 6, PCT**) when used to interpret them.
- 4.3** Abbreviations used within the claims, e.g. NIG, NIG-20D should be spelled out at first occurrence, and then introduced by placing the abbreviation in parentheses after the term being abbreviated (**Art. 6, PCT, Guidelines 5.31**).

item VI

1 Certain documents cited

The applicants attention is drawn to WO2004/052932 apparently disclosing Ab with the same aa sequences as mAb 3A6. WO2004/052932 has a valid priority of 02.12.2002 and was published on 24.06.2004.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/13960

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	POT CAROLINE ET AL: "Nogo-A expressed in Schwann cells impairs axonal regeneration after peripheral nerve injury" JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 159, no. 1, 14 October 2002 (2002-10-14), pages 29-35, XP002293417 ISSN: 0021-9525 page 33, right-hand column, paragraph 3	1-18
X	RAINETEAU ET AL: "Improved locomotor recovery in spinal cord injured rats treated with the monoclonal antibody IN-1" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 27, no. 2, 2001, page 1833, XP001199820 & 31ST ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE; SAN DIEGO, CALIFORNIA, USA; NOVEMBER 10-15, 2001 ISSN: 0190-5295 abstract	1-18
X	LI W ET AL: "NEUTRALIZATION OF MYELIN - ASSOCIATED NOGO - A BY A NOGO RECEPTOR - Fc FUSION PROTEIN." SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACT VIEWER AND ITINERARY PLANNER, vol. 2002, 2002, pages Abstract No. 333.2 URL-http://sf, XP001199824 & 32ND ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE; ORLANDO, FLORIDA, USA; NOVEMBER 02-07, 2002 abstract	1-8
A	CHOI E D ET AL: "CHARACTERIZATION OF AN ANTI - NOGO RECEPTOR FAB THAT DISRUPTS NOGOA/NOGO RECEPTOR INTERACTION." SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACT VIEWER AND ITINERARY PLANNER, vol. 2002, 2002, pages Abstract No. 333.1 URL-http://sf, XP001199822 & 32ND ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE; ORLANDO, FLORIDA, USA; NOVEMBER 02-07, 2002 abstract	1-18
X	EP 1 174 441 A (CT DE IMMUNOLOGIA MOLECULAR) 23 January 2002 (2002-01-23) claim 2	2-8

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/13960

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	PAPADOPOULOS CATHERINE M ET AL: "Functional recovery and neuroanatomical plasticity following middle cerebral artery occlusion and IN-1 antibody treatment in the adult rat" ANNALS OF NEUROLOGY, vol. 51, no. 4, April 2002 (2002-04), pages 433-441, XP008034394 ISSN: 0364-5134 abstract	1-18
X	WO 01/51520 A (UNIV YALE ; STRITTMATTER STEPHEN M (US)) 19 July 2001 (2001-07-19) examples 2,6	1
A	PRINJHA R ET AL: "Characterisation and CNS localisation of Nogo and the Nogo-loop66 receptor" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 27, no. 1, 2001, page 670, XP001199821 & 31ST ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE; SAN DIEGO, CALIFORNIA, USA; NOVEMBER 10-15, 2001 ISSN: 0190-5295 abstract	1-18
A	WO 02/088306 A (LILLY CO ELI ; TSURUSHITA NAOYA (US); VASQUEZ MAXIMILANO (US)) 7 November 2002 (2002-11-07) sequences 2,3	2-8
P,X	WO 03/048083 A (REID CARL ; BIOGEN INC (US); GARBER ELLEN (US); DE FOUGEROLLES ANTONIN) 12 June 2003 (2003-06-12) figure 9	2-6

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 03/13960

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by the Authority, namely:
Although claim 18 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6 4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 03/13960

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1174441	A	23-01-2002	AU 1513001 A	30-05-2001
			BR 0007827 A	30-10-2001
			CA 2359577 A1	25-05-2001
			EP 1174441 A2	23-01-2002
			JP 2003514831 T	22-04-2003
			CN 1344276 T	10-04-2002
			WO 0136485 A2	25-05-2001
			ZA 200105803 A	06-01-2003
WO 0151520	A	19-07-2001	AU 2940101 A	24-07-2001
			BG 106907 A	30-05-2003
			BR 0107613 A	19-11-2002
			CA 2397199 A1	19-07-2001
			CN 1404488 T	19-03-2003
			CZ 20022438 A3	16-10-2002
			EE 200200386 A	15-12-2003
			EP 1248803 A2	16-10-2002
			HU 0203863 A2	28-03-2003
			JP 2003519481 T	24-06-2003
			NO 20023387 A	11-09-2002
			SK 9992002 A3	02-05-2003
			WO 0151520 A2	19-07-2001
			US 2002012965 A1	31-01-2002
			US 2002077295 A1	20-06-2002
			ZA 200205403 A	20-01-2004
WO 02088306	A	07-11-2002	EP 1385545 A2	04-02-2004
			WO 02088306 A2	07-11-2002
WO 03048083	A	12-06-2003	CA 2468733 A1	12-06-2003
			WO 03048083 A2	12-06-2003

FOLIOS 196 y 197 PARA TARJETERO.

2006.07.11



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

488 AS
SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 06031001 00000000 Folios: 197
Fecha (AMD): 2006-03-29 14:29:33
Trámite : 011 PCT-PATENT 378 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Delegatura de Propiedad Industrial División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

PCT

PATENTE DE INVENCION	MODELO DE UTILIDAD ()	USUARIO ()	RADICADOR ()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()	()
-Descripción de la invención.	()	()	()
-Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se 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 ()

-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Handwritten signature or mark.

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 06 – 031001

Fecha: 29 DE MARZO DE 2.006

Se certifica que:

Desde fecha 16 de abril de 1997,
del folio 90.643 al folio 90.650 del libro de
Protocolo N° 311 , obra el poder N° 17.398
conferido por NOVARTIS AG (NOVARTISSA)
(NOVARTIS INC.) domiciliado(a) en Basilea - Suiza al
doctor JIMENA ESCOBAR URIBE y/o IGNACIO
ESCOBAR URIBE.

Representante en Bogotá D.C. : Los mismos.

Facultad para desistir y sustituir: SI.

Revisado iramos.

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Commutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia