

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogada **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

ASUNTO Radicación 07-137554
 Trámite 011
 Evento 378
 Actuación 519
 Oficio **11162**
 Folios 016

Patente de Invención ☒ Patente de Modelo de Utilidad ☐
Vía Nacional ☐
Vía PCT (Fase Nacional) ☐ Cap. I ☐ Cap. II ☐

No. Solicitud Internacional PCT/EP2006/006535
Fecha de Presentación Internacional 03 Junio 2006

Como resultado del Examen de Fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Folios 42 a 124	28 de Diciembre 2007
Reivindicaciones:	Folios 125 a 133	28 de Diciembre 2007
Dibujos:	Folios 134 a 150	28 de Diciembre 2007
Secuencias	Folios 151 a 180	28 de Diciembre 2007
Prioridad:	GB 0513766.6	05 de Julio 2005
	GB 0525448.7	14 de Diciembre 2005

2. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Anticuerpos humanizados específicos para NOGO-A y sus usos farmacéuticos"

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de obtener inhibidores de NOGO-A útiles para el tratamiento para neurodegeneración.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona anticuerpos monoclonales humanizados que se unen e inhiben la actividad de NOGO-A humana, y composiciones que los contienen.

El objeto de la presente Solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): C07K 16/18

3. Excepción a la Patentabilidad (Art 20 D 486 literal (d))

El objeto de las reivindicaciones 19, 21, 23 a 26 que hacen referencia a un método de tratamiento no es patentable de acuerdo con el Art citado.

4. Reivindicaciones relativas a un uso o a un segundo uso (Art 14 y 21 D 486)

El uso de las reivindicaciones 20 y 22 no es patentable, de acuerdo con el Art 14.

5. De la Solicitud de Patente

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

- Las reivindicaciones 1 a 8 hacen referencia a la región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-NOGO; asimismo, las reivindicaciones 9 a 15 que hacen referencia a la región variable de cadena ligera de manera independiente y sin alguna correlación. Se recuerda al solicitante que un anticuerpo de debe caracterizarse a partir de su estructura completa, mencionando las secuencias que lo conforman en la cadena ligera y cadena pesada, o las secuencias variables de las cadenas ligera y pesada y que la referencia a estructuras parciales o fragmentos del anticuerpo no es válida puesto que no corresponde a una estructura activa, probada ni definida.
- Teniendo en cuenta lo divulgado en la memoria descriptiva la estructura completa del anticuerpo esta dada por las secuencias SEQ ID NO 77 para la cadena pesada y la SEQ ID NO 20 para la cadena ligera con sus correspondientes sustituciones, por tal razón se sugiere que se establezca en la reivindicación principal dichas secuencias y limitar la invención a las sustituciones o modificaciones que se encuentran de manera específica indicando las posiciones y el tipo de aminoácido modificado, sin hacer referencia a otras secuencias.
- Las reivindicaciones 1 y 9 no tiene soporte en la descripción debido a las múltiples posibilidades de sustitución (n= 0 a 13) para los aminoácidos de la secuencia SEQ ID NO 77 y SEQ NO. 20 que se reclaman puesto que n corresponde específicamente a 1. Asimismo, no es claro a que secuencia ni que posiciones reales son las que se sustituyen, por lo cual no se define de manera inequívoca el anticuerpo, puesto que cualquier secuencia puede presentar sustituciones en diferentes posiciones.
- Las reivindicaciones 28 y 29 que hacen referencia al procedimiento para producir un anticuerpo reclaman la misma materia puesto que presentan los mismos pasos. Se sugiere eliminar una de las dos.

6. Determinación del Estado de la Técnica

El Estado de la Técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad (05 de julio de 2005) y la fecha de presentación de la solicitud de patente nacional (28 de diciembre de 2007) y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	CO 06-63412	NOGO-A inmunoglobulinas neutralizantes para el tratamiento de enfermedades neurológicas.	Fecha presentación: 29 de junio de 2006 Fecha prioridad: 22 de octubre de 2003
D2	WO2005028508	NOGO A binding molecules and pharmaceutical use thereof	31 de marzo de 2005
D3	Protein Engineering Vol 15. No 11. Pag. 931-941	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.	2002

D1 (folios 195 a 200) divulga inmunoglobulinas neutralizantes de NOGO-A útiles para el tratamiento de enfermedades neurológicas, procedimientos para su producción y métodos de uso de las mismas.

D2 divulga anticuerpos monoclonales que se unen a NOGO-A con una constante de disociación <1000 nM, un polinucleótido que codifica dicha molécula de unión; polinucleótido un vector de expresión que comprende dicho anticuerpo, el uso de dichos anticuerpos y polinucleótidos para el tratamiento de enfermedades asociadas con la reparación del sistema nervioso.

URL:http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&II=0&ND=3&adjacent=true&locale=en_EP&FT=D&date=20050331&CC=WO&NR=2005028508A2&KC=A2

D3 (folios 201 a 203) divulga anticuerpos y fragmentos FAb anti-NOGO-A diseñados para mejorar la afinidad por medio de modificaciones en las regiones variables.

URL: <http://peds.oxfordjournals.org/content/15/11/931.short>

7. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Novedad (Art 16 D486)

La **reivindicación 1** consiste en un anticuerpo monoclonal que se una a NOGO humana, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO 77 que comprende adicionalmente un número n de sustituciones en una o mas de las posiciones 12, 20, 38, 40, 48, 67, 68, 70, 72, 74, 76, 79 y 91; en donde cada residuo de aminoácido sustituido se reemplaza con el residuo de aminoácido en la posición equivalente en la SEC ID NO. 7 y n es un número entre 1 y 13.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1
Anticuerpo monoclonal que se una a NOGO humana	Anticuerpo monoclonal humanizado que se una a NOGO humana
Región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO 77 QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFTSYWMHWVR QAPGQGLEWMGNINPSNGG TNYNEKFKSRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDVAVYYCELG QGYWGQGTLVTVSS	Región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO 84 QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFTSYWMHWVR QAPGQGLEWMGNINPSNGG TNYNEKFKSRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDVAVYYCELG QGYWGQGTLVTVSS
n sustituciones en una o mas de las posiciones 12, 20, 38, 40, 48, 67, 68, 70, 72, 74, 76, 79 y 91	
n= 0 a 13	n= 0 a 13

Las características **esenciales** del anticuerpo de la reivindicación 1 habían sido divulgadas previamente en D1, el cual enseña un anticuerpo monoclonal humanizado que se una a NOGO humana (folio pagina) el cual comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO 84 (folio . pagina ,línea) la cual es igual a la reclamada en la presente solicitud (ver tabla comparativa).

En consecuencia, la reivindicación 1 no es nueva, según lo divulgado en el documento D1.

La **reivindicación 28** consiste en un método para producir un anticuerpo anti-NOGO de cualquiera de las reivindicación 1 a 17 que se une específicamente a y neutraliza

- la actividad de NOGO-A humana cuyo método comprende las etapas de:
- a) Proporcionar un primer vector que codifica una cadena pesada del anticuerpo;
 - b) Proporcionar un segundo vector que codifica una cadena ligera del anticuerpo;
 - c) Co-transfectar una célula hospedera mamífera con el primer y segundo vectores;
 - d) Cultivar la célula hospedera de la etapa (c) en medios de cultivo (preferiblemente libre de suero) bajo condiciones que conduzcan a la secreción del anticuerpo de la célula hospedera en los medios de cultivo.
 - e) Recuperación del anticuerpo secretado de la etapa (d)

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1
Método para producir un anticuerpo anti-NOGO	Método para producir un anticuerpo anti-NOGO
Proporcionar un primer vector que codifica una cadena pesada del anticuerpo;	Proporcionar un primer vector que codifica una cadena pesada del anticuerpo;
Proporcionar un segundo vector que codifica una cadena ligera del anticuerpo;	Proporcionar un segundo vector que codifica una cadena ligera del anticuerpo;
Co-transfectar una célula hospedera mamífera con el primer y segundo vectores;	Co-transfectar una célula hospedera mamífera con el primer y segundo vectores;
Cultivar la célula hospedera de la etapa (c) en medios de cultivo (preferiblemente libre de suero) bajo condiciones que conduzcan a la secreción del anticuerpo de la célula hospedera en los medios de cultivo.	Cultivar la célula hospedera de la etapa (c) en medios de cultivo (preferiblemente libre de suero) bajo condiciones que conduzcan a la secreción del anticuerpo de la célula hospedera en los medios de cultivo.
Recuperación del anticuerpo secretado de la etapa (d)	Recuperación del anticuerpo secretado de la etapa (d)

Las características **esenciales** del método de la reivindicación 28 habían sido divulgadas previamente en D1, el cual enseña un método para producir un anticuerpo anti-NOGO que se une específicamente a y neutraliza la actividad de NOGO-A humana (reivindicaciones 20 y 21), dicho método comprende las mismas etapas que las divulgadas en la presente solicitud tal como se muestra en la tabla anterior

En consecuencia, la reivindicación 28 no es nueva, según lo divulgado en el documento D1.

Las reivindicaciones 29 y 30 no mencionan alguna característica que haga nuevo al método de la reivindicación 28, por lo cual se considera que no nuevas.

Nivel Inventivo (Art18 D486)

La **reivindicación 16** un anticuerpo monoclonal que comprende las regiones de VH y VL seleccionadas de la siguiente lista H1 L13 (SEQ ID NO. 77 + SEQ ID NO. 20) (ver folios 127 y 128).

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D3
Anticuerpo monoclonal que se una a NOGO humana	Anticuerpo monoclonal que se una a NOGO humana	Anticuerpo monoclonal anti-NOGO
Región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO 77	Región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de	Modificaciones simples de aminoácidos en

	aminoácido de la SEC ID NO 2	regiones del anticuerpo o fragmento FAb
Región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO 20	Región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO 3	

Los documentos D2 y D3 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque:

El documento D2 enseña anticuerpos monoclonales anti-NOGO A y polinucleótidos que los codifican, dichos anticuerpos poseen la característica de unirse específicamente a polipéptidos de NOGO A, NiG-D20, con una constante de disociación menor a 1000nM (reivindicación 1). Dichos anticuerpos son de características murinas y están compuestos por una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera correspondiente a las secuencias 2 y 3 (Pág. 48 a 50) que se relaciona directamente con las secuencia 7 y 8 de la presente solicitud que corresponden a las cadenas pesada y ligera murinas.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el anticuerpo divulgado en el documento D2 corresponde a las modificaciones específicas de aminoácidos en las posiciones 12, 20, 38, 40, 48, 67, 68, 70, 72, 74, 76, 79 y/o 91 de la cadena pesada y modificaciones específicas de aminoácidos 4, 7, 11, 19, 42, 64 y/o 70 de la cadena ligera.

Asimismo, D2 divulga que un anticuerpo humanizado puede retener unos pocos aminoácidos de la secuencia murina en las partes de las regiones de marco adyacentes a las regiones hipervariables tales como los CDRs (pag. 5, línea 8 a 10) y se enseña que los cambios menores en una secuencia de aminoácidos, tales como supresión, adición o sustitución de uno o varios aminoácidos pueden dar lugar a una forma alélica de la proteína original, que tiene propiedades sustancialmente idénticas (pag. 7, línea 24 a 27).

El hecho de realizar modificaciones arbitrarias dentro de las cadena pesada y liviana del anticuerpo, en las posiciones 12, 20, 38, 40, 48, 67, 68, 70, 72, 74, 76, 79 y/o 91 no evidencia un efecto técnico sorprendente, ya que no se evidencian cuales son las modificaciones realizadas y si estas modificaciones comparadas con el estado de la técnica proveen una mayor actividad de unión de dichos anticuerpos en comparación con anticuerpos ya divulgados, es así que los anticuerpos de la presente solicitud mantienen una constante de disociación menor o igual a 1000nM (ver folio 106)

Por lo tanto, el Problema Técnico Objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: "cómo obtener anticuerpos monoclonales que se unan a NOGO-a humana alternativos a los ya conocidos?

Por su lado el documento D3 hace referencia a diferentes modificaciones en posiciones estratégicas de las cadenas variables de anticuerpos anti-NOGO que logran una mejora en la afinidad /unión de los anticuerpos con el respectivo receptor (folio 201, pág. 932, columna 1). Dentro de las modificaciones se encuentran las posiciones 91, 93, 94 y 96 tanto en la cadena pesada como ligera (folio 201a, pág. 933, columna 1). De igual manera establece que la el análisis de diferentes anticuerpos revela que la modificación de los dominios variables de cadena pesada pueden modificarse de diferentes maneras lográndose una "hipermutación" que puede llevar a la mejora en la afinidad (folio 202, pág. 936, columna 1 parte final).

De acuerdo a lo anterior la persona del oficio normalmente versada en la materia estaría motivada con las secuencias de anticuerpos anti-NOGO ya divulgadas en el estado de la técnica especialmente en D2, a realizar modificaciones tales como supresión, adición o sustitución de uno o varios aminoácidos sin modificar de manera drástica la estructura del anticuerpo. Asimismo, esta persona sabiendo que modificaciones en la cadena pesada y ligera para este tipo de anticuerpos anti-NOGO llevan a una mejora en la afinidad tal como se demuestra en D2 diseñaría dentro de su rutina diaria una serie de ensayos estableciendo que modificaciones logran una mejor actividad y de esta manera llegaría así al objeto de la reivindicación 16 de la solicitud. Por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.

8. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente Solicitud están afectados así:

Ítem	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	CO 06-63412	1, 28 a 30	Novedad
D2	WO2005028508	16 a 18	Nivel Inventivo
D3	Protein Engineering Vol 15. No 11. Pag. 931-941	16 a 18	Nivel Inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante y presentarla por escrito

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.



JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 27 Jun. 2012

Elaborado por: Ana Delia Pinzón García
Revisado por: Consuelo Leguizamón Leguizamón 



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

06-63412

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO "NOGO-A INMUNOGLOBULINAS NEUTRALIZANTES PARA EL TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 16/22

A 61 k 39/395

71. SOLICITANTE GLAXO GROUP LIMITED

DOMICILIO MIDDLESEX, INGLATERRA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. 23 de Mayo 2006

Cra 14
En 22-07-2006

(FORMAP 10)

5 7



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-063412- -00000-0000
-cc: 2006-06-28 7:46:03 Dep. 2020 NULC REACCIONES
Tit. PATENTE (N)
Lvs: 378 FASE NACIONAL

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: GLAXO GROUP LIMITED

Dirección: Glaxo Wellcome House,
Berkeley Avenue, Greenford, Middlessex
UB8 0NN Inglaterra.

Nacionalidad o Domicilio: Middlessex,
Inglaterra.

Lugar de Constitución: Inglaterra y Gales.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlloco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlloco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

4

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: ELLIS, Jonathan, Henry; EON-DUVAL, Alexandre; GRUNDY, Robert, Ian;
HUSSAIN, Fariha; MCADAM, Ruth; PLUMPTON, Christopher; PRINJHA, Rabinder,
Kumar y WILSON, Paul, Alexander

Dirección: GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY y
GlaxoSmithKline, New Frontiers Science Park South, Third Avenue, Harlow, Essex CM19
5AW

Nacionalidad o Domicilio: Inglaterra.

5

PCT (66)

Solicitud Internacional No. PCT/GB2004/006325

Fecha: 20/12/04

Publicación Internacional No. WO 2005/061544 A3

Fecha: 07/07/05

6

Título (54) "NOGO-A INMUNOGLOBULINAS NEUTRALIZANTES PARA EL TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS"

7

Clasificación Internacional (51) C07K 16/22

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

GB

GB

(32) Fecha

22-10-03

22-10-03

(31) Número de Solicitud

0329884.6

0329711.6

9

Comprobante de Pago No. 06 - 44.745

Fecha: 13-05-06

7

196
~~152~~

mutada y1. Los sitios de restricción Hind III y BstW I se introdujeron para componer el dominio VL conteniendo la secuencia señal CAMPATH - 1H para la donación en Rln conteniendo la región constante kappa humana.

Secuencia señal CAMPATH - 1H: MGWSCILFLVATATGVHS (SEC ID N°: 82)

5

Cadena pesada

Se identificó una secuencia de línea germinal humana con 66% de identidad con la secuencia de aminoácidos 2A10 de VH. Se seleccionó para humanización la secuencia marco conservado de U84162:

10 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSY~~Y~~MHVWRQAPGQGLEWMGII
NPSGGSTSYAQKFQGGRVTMTRDTSTSTVYME~~L~~SSLRSEDTAVYYCARGQWL
VILNFDYWGGGTLVTVSS (SEC ID N°: 83).

La presente invención por lo tanto proporciona el uso de la SEC ID N°: 83 (o un marco conservado con menos de 10 diferencias de aminoácidos con
15 la SEC ID N°: 83 por ejemplo, menos de 8 diferencias de aminoácidos, preferiblemente menos de 6 diferencias de aminoácidos, más preferiblemente menos de 4 diferencias de aminoácidos por ejemplo, 1 ó 2 diferencia (s) de aminoácidos) en la producción de un anticuerpo anti - NOGO humanizado
(particularmente un anticuerpo anti - NOGO que se une a NOGO - A humano y
20 comprende las CDRs expuestas en la tabla 2 y/o se une al epítope expuesto anteriormente)

Las posiciones 93 y 94 se identificaron como residuos potencialmente importantes en el mantenimiento de conformación de las CDRs.

Posición (N° Kabat)	2A10 VH	U84162
25 93 - 94	EL	AR

197
153

Se indicó que el motivo EL en estas posiciones son inusuales.

Se diseñó la siguiente construcción humanizada:

Construcción H1 de V_H humanizada:

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFP ^{CDR1}SYWMIWVRQAPGQGLEWMG ^{CDR2}ININPSNGGTN
 YNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCELGQGYW ^{CDR3}GGTITVTVSS (SEC
 ID N°: 84).

10

Cadena ligera

Se identificaron unas secuencias de línea germinal humana con 66% de identidad con la secuencia de aminoácidos de 2A10 de V_L. Se seleccionó para humanización la secuencia marco conservada de CAA85593:

15 Marco conservado: CAA85593

DIVMTQSPFLSLPVTLGQPASISCRSSQGLVYSDDGTLYLNWFQORPGQSPRRLIY
 KVSNRDSGVFDRFSGGGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPYTFGGGTKLEIK
 (SEC ID N°: 85). Así pues, la presente invención proporciona el uso de la SEC
 ID N°: 85 (o un marco conservado con menos de 8 diferencias de aminoácidos

20 por ejemplo, 6 diferencias de aminoácidos, preferiblemente menos de 4
 diferencias de aminoácidos, por ejemplo, 1 ó 2 diferencia (s) de aminoácidos)
 en la producción de un anticuerpo anti - NOGO humanizado dicho anticuerpo
 humanizado se une a NOGO - A (particularmente un anticuerpo que
 comprende la cadena ligera de una o más (por ejemplo todas) las CDRs
 25 expuestas en la tabla 1 anterior y/o se une al epítipo de NOGO - A expuesto

188

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo o fragmento funcional del mismo que se une con (por ejemplo a) y neutraliza NOGO humano.
2. Un anticuerpo según la reivindicación 1 que se une a una región de la proteína NOGO - A humana entre los aminoácidos 586 a 785.
- 10 3. Un anticuerpo según la reivindicación 2 que se une a una región de NOGO - A humano entre los aminoácidos 586 y 685.
4. Un anticuerpo según la reivindicación 2 que se une a una región de NOGO - A humano entre los aminoácidos 686 y 785.
- 15 5. Un anticuerpo según la reivindicación 1 que comprende cada una de las siguientes CDRs:
las CDRs de la cadena ligera: SEC ID números: 1, 2 y 3
las CDR de la cadena pesada: SEC ID números: 4, 5 y 6.
- 20 6. Un anticuerpo según la reivindicación 1 que comprende cada una de las siguientes CDRs:

~~199~~

199

16. Un anticuerpo según la reivindicación 8 ó 13 en el que la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 40.
- 5 17. Un anticuerpo según la reivindicación 9 ó 14 en el que la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 41.
- 10 18. Un anticuerpo según la reivindicación 10 ó 15 en el que la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 42.
- 15 19. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento funcional del mismo anti - NOGO según cualquier reivindicación precedente junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 20. Un procedimiento de producción de un anticuerpo anti - NOGO de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 que específicamente se une a y neutraliza la actividad de NOGO - A humano dicho procedimiento comprende las etapas de:
- (a) proporcionar un primer vector que codifica una cadena pesada del anticuerpo;

199

~~198~~

200

- (b) proporcionar un segundo vector que codifica la cadena ligera del anticuerpo;
- (c) co - transfectar una célula huésped de mamífero con dichos primer y segundo vector;
- 5 (d) cultivar la célula huésped de la etapa (c) en medios de cultivo (preferiblemente exentos de suero) en condiciones que permiten la secreción del anticuerpo por dicha célula huésped en dichos medios de cultivos;
- (e) recuperar el anticuerpo secretado de la etapa (d).

10

21. Un procedimiento de producción de un anticuerpo anti - NOGO que inhibe competitivamente la unión del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 dicho procedimiento comprende las etapas de:

- 15 (a) proporcionar un primer vector que codifica una cadena pesada del anticuerpo;
- (b) proporcionar un segundo vector que codifica la cadena ligera del anticuerpo;
- (c) co - transfectar una célula huésped de mamífero con dichos primer y segundo vector;
- 20 (d) cultivar la célula huésped de la etapa (c) en medios de cultivo (preferiblemente exentos de suero) en condiciones que permiten la secreción del anticuerpo por dicha célula huésped en dichos medios de cultivos;
- (e) recuperar el anticuerpo secretado de la etapa (d).

25

200

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

M.Fiedler¹, C.Horn^{1,2}, C.Bandtlow³, M.F.Schwab⁴ and A.Skerra^{1,5}

¹Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan, Germany; ²Institut für medizinische Chemie und Biochemie, Universität Innsbruck, Austria and ³Institut für Hirnforschung, Universität und Dept. Biologie, ETH, Zürich, Switzerland

⁴Present address: Biozentrum, Universität Frankfurt am Main, Germany

⁵To whom correspondence should be addressed

E-mail: skerra@wzw.tu.mun.de

The myelin axonal growth inhibitor NI-220/250 (Nogo-A) has attracted considerable attention in elucidating the mechanisms that account for the lack of plasticity in the adult central nervous system. The cognate monoclonal antibody IN-1, which was obtained prior to the molecular characterization of its Nogo-A antigen, has played a crucial role in this respect. However, this murine IgM/K antibody does not only provide an inappropriate format for *in vivo* studies, its low antigen affinity has also hampered the thorough structure-function analysis of its neutralizing effect toward the Nogo-A inhibitor on a molecular basis. We describe here the affinity maturation of a bacterially produced functional IN-1 F_{ab} fragment via protein engineering. A soluble fragment of Nogo-A derived from the central exon 3 of its gene, which was prepared by secretion into the periplasm of *Escherichia coli*, served as a target in these experiments. After repeated cycles of site-directed random mutagenesis and screening, the mutant IL1.8 of the IN-1 F_{ab} fragment was obtained, carrying five side chain substitutions within CDR-L3. Its dissociation constant for the complex with the recombinant Nogo-A fragment was determined in surface plasmon resonance measurements as approximately 1 µM. The affinity of the unmutated IN-1 F_{ab} fragment was 8-fold lower. The engineered F_{ab} fragment appeared to be well suited for the specific detection of Nogo-A in immunochemical assays and for the histochemical staining of myelin-rich tissue sections. Most importantly, its concentration-dependent neutralizing effect on the Nogo-A inhibitory activity was significantly enhanced in cell culture. This study confirms Nogo-A to be the antigen of the IN-1 antibody and it demonstrates increased potential of the engineered F_{ab} fragment as a reagent for promoting axonal regeneration *in vivo*.

Keywords: affinity maturation/axonal regeneration/bacterial expression/neuronal inhibitor/random mutagenesis

Introduction

The very limited capacity of the adult central nervous system (CNS) for axonal regeneration is a phenomenon of broad and ongoing scientific as well as medical interest (Ramon y Cajal, 1928; Hoffer and Gage, 2000). In contrast, sprouting and elongation of lesioned axons readily occurs in the peripheral nervous system (PNS). Inhibitory effects and non-permissible

properties of CNS tissue, in particular of CNS myelin and oligodendrocytes, probably contribute considerably to the restriction of neuronal regeneration and plasticity. *In vitro*, CNS myelin and oligodendrocyte membranes induce growth cone collapse (Bandtlow *et al.*, 1996).

Based on earlier observations of the inhibitory effect of CNS myelin on neurite outgrowth (Caroni and Schwab, 1988a; Spillmann *et al.*, 1997, 1998) the myelin-associated neurite growth inhibitor NI-220 (Spillmann *et al.*, 1998), later called Nogo-A (Huber and Schwab, 2000), was identified in bovine spinal cord tissue as a predominant protein of oligodendrocytes that prevents axonal growth. The corresponding cDNAs from rat and man were recently described (Chen *et al.*, 2000; GrandPré *et al.*, 2000; Prinjha *et al.*, 2000). The *nogo* gene encodes three distinct proteins, Nogo-A, Nogo-B and Nogo-C, which apparently arise by alternative splicing and/or promoter usage. Of those, just the full-length Nogo-A transcript is specifically expressed in oligodendrocytes and hence is mainly responsible for their neuronal growth inhibitory activity (Spillmann *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000).

The murine monoclonal IgM/K antibody IN-1 was originally raised against the homologous protein NI-250 from rat CNS myelin (Caroni and Schwab, 1988b) and cross-reacts both with the bovine and human protein (Spillmann *et al.*, 1997, 1998). IN-1 was shown to effectively neutralize the inhibitory activity *in vitro* (Bandtlow *et al.*, 1990; Spillmann *et al.*, 1998) and *in vivo*, giving rise to long-distance regeneration and improved plastic changes of injured CNS fibre tracts (Schmidt and Schwab, 1990; Z'Graggen *et al.*, 1998). The variable domain cDNAs of this antibody were cloned from the hybridoma cell line, followed by the bacterial production of the corresponding recombinant murine F_{ab} fragment, whose functionality was demonstrated *in vitro* (Bandtlow *et al.*, 1996). A partially humanized IN-1 F_{ab} fragment was produced by *Escherichia coli* fermentation and shown to successfully promote regeneration of corticospinal axons in adult rats after spinal cord lesion *in vivo* (Bresnahan *et al.*, 2000). The recombinant IN-1 F_{ab} fragment also induced significant elongation of injured cochlear fibres upon intrathecal treatment (Tatagiba *et al.*, 2002) and a pronounced sprouting response of Purkinje cells after infection into the intact adult cerebellum (Buffo *et al.*, 2000).

Unfortunately, the IN-1 antibody as well as its recombinant F_{ab} fragment exhibit rather low antigen affinity, suggesting that the IgM antibody was a product of the early immune response (Bandtlow *et al.*, 1996). Its light chain was found to be encoded by a V_κ germline gene devoid of somatic mutations. In the case of the IgM, the poor affinity is partially compensated by an avidity effect due to its decavalent nature, which is attributable to a more general mechanism in immunology, even though at the expense of relaxed specificity in the early humoral response. Consequently, the apparently weaker binding activity of the monovalent F_{ab} fragment necessitates higher concentrations in order to provoke comparable *in vitro* activity (Bandtlow *et al.*, 1996).

Nevertheless, in comparison with the intact IgM the use of the recombinant F_{ab} fragment is attractive for several reasons. First, the much smaller F_{ab} fragment was shown to possess high stability in buffer solution and to exert efficient tissue penetration (Bandtlow *et al.*, 1996; Bresnahan *et al.*, 2000). Secondly, the F_{ab} fragment can be produced at high yields and quickly purified to homogeneity using a well optimized bacterial expression system (Fiedler and Skerra, 1999, 2001a,b). Finally, its recombinant format permits the application of protein engineering techniques not only to improve its antigen-binding activity but also to humanize the mouse-specific immunoglobulin sequences for medical use.

Here we report the improvement of the functional affinity of the recombinant IN-1 F_{ab} fragment by virtue of introducing a small set of amino acid substitutions into its antigen-binding site. In order to perform cycles of random mutagenesis and selection for enhanced binding activity the presumed extracellular domain of the Nogo-A antigen (Chen *et al.*, 2000; Huber and Schwab, 2000) was produced in a bacterial expression system, thus also permitting molecular characterization of the cognate antigen-antibody interaction for the first time.

Materials and methods

General DNA methodology

DNA manipulations were performed according to standard techniques (Sambrook *et al.*, 1989). Vectors, genes and bacterial strains were from the authors' collection. DNA polymerases, modifying and restriction enzymes were from generic vendors (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Germany; Promega, Mannheim, Germany; Stratagene, Amsterdam, Netherlands). Oligodeoxynucleotides for PCR and DNA sequencing were purchased from Macerata (Ulm, Germany). PCR reactions were performed using a standard protocol, employing phosphorothioate primers in conjunction with *Pfu* DNA polymerase (Skerra, 1992). Site-directed mutagenesis was carried out with single-stranded plasmid DNA following the method of Kunkel *et al.* (Kunkel *et al.*, 1987) according to a standardized procedure (Geisselsdorfer *et al.*, 1987). All plasmid constructions and mutagenesis experiments were confirmed by restriction analysis, followed by DNA sequencing of relevant regions on an ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer/Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) using the BigDye™ terminator kit.

Vector construction for Nogo fragments

A 2.3 kb Nogo-A gene fragment was amplified from the cloned cDNA (Chen *et al.*, 2000) via PCR with the primers 5'-GCT CAG CCG CCG AGA CCC TTT TTG CTC TTC TTT CTT AAG TAT GGT GCC CAT TTC TCGTCT-3'. The single PCR product was digested with *EagI*, purified from a 1% agarose gel, and inserted into the multiple cloning region of pASK111 (Vogl and Skerra, 2001), which had been cut with *BclI* (resulting in a sticky end compatible with *EagI*) as well as *EcoRV*, yielding pASK111-NIFr1. This vector leads to the production of a mature protein with a molecular mass of 85.0 kDa, including the *Strept-tag* (Skerra and Schmidt, 2000) at the C-terminus, after processing of the OmpA signal peptide fused in frame to the N-terminus. pASK111 NIFr2 was constructed from pASK111-NIFr1 by precisely deleting the N-terminal 59 codons from the cloned Nogo-A gene fragment via site-directed mutagenesis using the oligodeoxynucleotide 5'-GCT ATC CAT GTT CTT TAA AAG AGG

CCT CGC CTA CGG TAG C-3'. Furthermore, Cys residues were replaced by Ser via site-directed mutagenesis with single-stranded DNA prepared from pASK111-NIFr2 using appropriate oligodeoxynucleotide primers.

The C-terminal *Strept-tag* encoded on pASK111-NIFr2 was exchanged for a His₆ affinity tag by site-directed mutagenesis with the oligodeoxynucleotide 5'-CAC TTC ACA GAT CAA GCT TAT TAA TCG TGA TGG TGA TGA GCG CTT TTA ACT ATG CTG CCC-3'. A *KpnI* restriction site was concomitantly introduced at the 5'-end of the cloned Nogo-A structural gene using the oligodeoxynucleotide 5'-GGT ATC CAT GGT CTT TAA AAG AGG CCG CCG CCG CTA CCG TAG C-3' (the *KpnI* recognition site is underlined), resulting in the vector pASK111-NIFr3. The region encoding the Nogo-A fragment together with the His₆ tag was finally subcloned via *KpnI* and *XbaI* (cutting within the vector, downstream of the 'Cam' gene) on pASK-IBA4 (Skerra and Schmidt, 2000), which provided the coding region for an N-terminal *Strept-tag* if directly downstream of the OmpA signal sequence. The resulting vector was dubbed pASK111-NIFr4.

Vector construction for F_{ab} fragments

The IN-1 F_{ab} fragment and its mutants were produced utilizing the vectors pASK88, pASK106 or pASK107. All of them encode a chimeric F_{ab} fragment with variable domains derived from the mouse monoclonal antibody IN-1 (Bandtlow *et al.*, 1996) and human constant domains belonging to the subclass IgG1/k (Schwieck and Skerra, 1995). Secretion into the extracellular milieu of the bacterial periplasm is ensured by the presence of signal peptides at the N-termini of both chains (Skerra, 1994b) and transcription of the artificial dicistronic operon is under tight control of the chemically inducible *lac*^{ph} (Skerra, 1994a). pASK88 (Schwieck and Skerra, 1995) was used for soluble expression and purification via the His₆-tag attached to the C-terminus of the heavy chain (Skerra, 1994b; Fiedler and Skerra, 2001a), whereas pASK107 (M.Fiedler and A.Skerra, unpublished results) provided the *Strept-tag* II for streptavidin affinity purification (Skerra and Schmidt, 2000) instead. pASK106 codes for a F_{ab} fragment similar to pASK88 but with an albumin-binding domain (ABD) appended to the C-terminus of the light chain (König and Skerra, 1998). The variable domain genes were exchanged between the differing vector formats using conserved restriction sites as described (Skerra, 1994b).

Single amino acid exchanges within the IN-1 F_{ab} fragment or its mutants were introduced by site-directed mutagenesis. For this purpose single-stranded DNA of the corresponding vectors pASK88-IN1 or pASK88-12.6 was used in conjunction with appropriate oligodeoxynucleotide primers. Random amino acid substitutions were introduced into the variable domain (V_L) gene of the IN-1 light chain at defined positions via PCR by means of degenerate oligodeoxynucleotide primers (without the phosphorothioate modification) in conjunction with *Taq* DNA polymerase. Amplification was performed on pASK85-IN1 with the originally cloned genes (Bandtlow *et al.*, 1996) as template. The forward primer 5'-GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG KCT GC-3' (59th restriction site underlined) was used in all experiments whereas the oligodeoxynucleotide 5'-GCG CTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC AGT TCC GAA CGT MNN AGG MNN MNN TAA CAC-ATT TTG ACA GTA-3' (39th restriction site underlined, arrow) as backward primer for randomizing the COR-L3 positions 193, 194 and 196 at the last stage of

prominent band just underneath that for the major recombinant protein. Both bands were subjected to N-terminal sequencing. The upper band yielded the sequence Glu-Thr-Lys-Phe-Ala, which resulted from the precise cleavage of the OmpA signal peptide. The lower band started with the amino acids Ser-Phe-Lys-Glu-His, i.e. at a position 59 codons downstream within the cloned sequence (beginning at residue 233 in the full-length primary structure). Its appearance was most likely due to the action of a bacterial protease and might indicate that the N-terminal part of the chosen Nogo-A fragment still belongs to a polypeptide segment devoid of well defined structure.

In order to achieve better homogeneity of the gene product, the first 59 residues of the mature polypeptide chain were deleted from the cloned coding region, leading to NI-Fr2 (Figure 1A). This protein was readily produced in the periplasm of *E. coli*, with similar yields as the former version but clearly a reduced degradation pattern. The possible presence of structural disulphide bonds in the recombinant protein was investigated by individually substituting all eight Cys residues (corresponding to positions 323, 403, 443, 536, 574, 676, 885 and 890 in the full-length Nogo-A sequence) with Ser via site-directed mutagenesis. The eight mutant Nogo-A fragments were produced in *E. coli* as before. However, it was not possible to recover the mutants Cys323-Ser and Cys885-Ser from the periplasmic protein fraction, while the mutants Cys443-Ser and Cys890-Ser gave rise to significantly diminished yields after *Strep*-tag purification when compared with the wild-type protein. In contrast, the other four mutants were produced at similar amounts as the original Nogo-A fragment. These observations indicate that at least some of the Cys residues are important for folding and may be involved in cystine crosslinks.

The wild-type NI-Fr2 protein still gave rise to certain truncated products, which was considered undesirable for precise binding measurements (see below). Notably, for the bovine hN1-220 susceptibility towards proteolysis had been observed before (Spillmann et al., 1998). Consequently, a doubly tagged version of the recombinant protein was prepared using an otherwise identical expression system. First, the *Strep*-tag at the C-terminus was exchanged for a His₆-tag (yielding NI-Fr3 as an intermediate construct; data not shown). And, secondly, the *Strep*-tag was inserted at the N-terminus again, downstream of the OmpA signal peptide. Interestingly, the yield of bacterially produced soluble protein, termed NI-Fr4 (Figure 1A), was found to be significantly higher (by a factor of 2.5, approaching 300 µg l⁻¹ OD₆₀₀) than NI-Fr2 was isolated from the periplasmic protein fraction in two steps by IMAC followed by streptavidin affinity chromatography. This protein was essentially pure, just a minor fraction of truncated polypeptide chains was still detectable (Figure 1B).

In vitro affinity maturation of the NI-1 F_{ab} fragment

Initial experiments on the detection of natural Nogo-A as well as recombinant Nogo-A fragments on western blots or on tissue sections by means of the bacterially produced NI-1 F_{ab} fragment revealed relatively weak signals (Bandtlow et al., 1996), indicating that the antigen affinity was poor. From the cloning of the variable domain genes of the NI-1 monoclonal antibody and analysis of their sequences it was evident that the V_H domain had undergone somatic hypermutation while the V_L domain appeared to be a germline-encoded sequence gene (Bandtlow et al., 1996). A computer modelling study

936

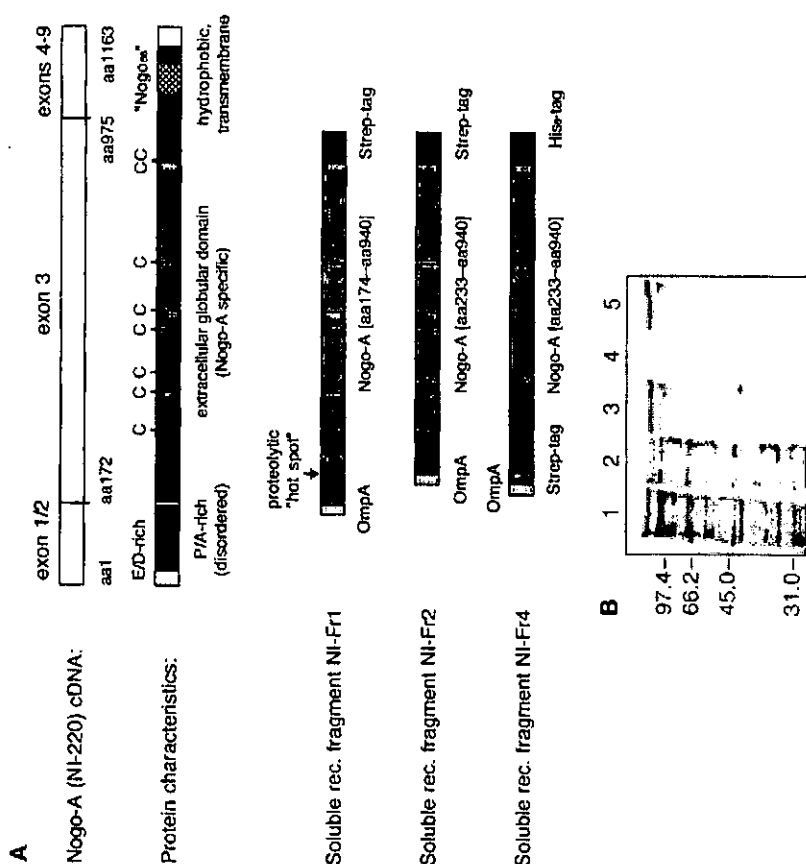


Fig. 1. Recombinant Nogo-A fragments prepared in this study. (A) Schematic characteristics of the mature recombinant Nogo-A and of the recombinant fragments derived from it. (B) SDS-PAGE analysis of bacterially produced NI-Fr1. Periplasmic protein fraction from *E. coli* JM83 harbouring pASK11-NFr1 (lane 1), flow-through of IMAC column as applied to the streptavidin column (lane 2), flow-through of streptavidin column (lane 3), purified protein after streptavidin affinity chromatography (lane 4). Molecular sizes are indicated at the left.

from the cDNA and subcloned on a standard vector for protein production in *E. coli*. Using appropriate PCR primers, the Nogo-A fragment was precisely fused at its N-terminus (i.e. in front of residue 174) to the OmpA signal peptide, thus effecting secretion into the bacterial periplasm, where efficient disulphide bond formation is favoured by an oxidizing redox environment. At the C-terminus (i.e. following residue 940) the fragment was fused with the *Strep*-tag affinity peptide, conferring binding activity towards streptavidin for simplified purification (Skerra and Schmidt, 2000). Transcription of the resulting hybrid gene was under tight control of the tetracycline promoter/operator (Skerra, 1994a). The resulting protein was denominated NI-Fr1 (Figure 1A).

Upon induction of gene expression NI-Fr1 was readily liberated from the periplasmic protein fraction of *E. coli* and purified by streptavidin affinity chromatography in one step. SDS-PAGE analysis revealed that approximately 50% of the recombinant protein comprised a product with the proper length whereas 50% corresponded to a series of smaller polypeptides, probably representing proteolytic degradation products (data not shown). In particular, there appeared one

935

P.211.7

	191	192																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
--	-----	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

modulation or internal amber termination codons were abundant. This finding suggests a competition between antigen-complexing signals of higher affinity mutants and non-specific binding by conformationally defective or weak nucleic acid products during the colony-screening assay.

For soluble production of the recombinant F₁ fragment, in a standard format (i.e. without the ABL1 domain) but still

having a His₆ tag fused to the C-terminus of the heavy chain of the mutagenized V_H gene cassettes from seven selected clones (Table I) were subcloned on pASK88-4N1 (Fagler and Stetler, 1999). The mutants were produced in shake flask cultures and isolated from the periplasmic cell fraction in one step using Ni-NTA. All F_{ab} fragments contained the light and heavy chains stoichiometric composition and quantitatively linked via a disulphide bond. Antigen-binding activity of the mutant F_{ab} fragments was subsequently tested by ELISA using the recombinant Ni-NTA for coating of the microtiter plate wells (Figure 2). Almost no binding signal above background was obtained with the recombinant wild-type FN 1-6 fragment illustrating very low antigen affinity. In contrast, the mutant 1-6 fragment gave rise to a clearly detectable and concentration-dependent binding signal. No significant signal was obtained in a control experiment with BSA serving as antigen. Hence, the mutant 1-6 was the protein of choice for further affinity maturation experiments.

was produced as a soluble protein in *E. coli* at a much lower level, with a relative yield of 5% after purification (0.1 mg/ml) compared to 1.0 mg/ml for the wild type. IN 1.2.6 mutant Cys residue that is directed at the folding efficiency of the Ig H-chain and a deleterious influence on the binding of the Cys residue to the CDR3 has a deleterious influence on the folding efficiency of the Ig H-chain and a deleterious influence on the binding of the Cys residue to the CDR3 has a deleterious influence on the binding of the Cys residue to the CDR3.

C13K12 forms a connecting loop between two neighbouring β strands such that the positions 1.91 and 1.92 are in close contact proximal with 1.96. Hence, in order to structurally

compensate a possible shift at position 156 due to the exchange of Cys-64 by Val¹⁵⁶ at the positions L91 and L92 within CDR L3 of the L2.6b⁺ Fab fragment were subjected to targeted random mutagenesis and the filter-sandwich colony-screening assay was performed again. This time the stringency of selection was raised by lowering the concentration of the recombinant antigen (a mutant of NF-E2 devoid of Cys-574 and Cys-576) from 50 to 30 µg/ml (from screening approach 1 to approach 2). The results of the second round of screening are summarized in Table 1. The V_H gene cassette of the four clones (Table 1, F₁a-f) was identical according to their pronounced output signals. In contrast with the previous experiment, all of them encoded plasmids encoding functional mutants of the L2.6b⁺ V_H fragment. The V_L gene cassettes of the four clones (Table 1, F₁a-f) were subcloned on pDASH88-IN1 and the corresponding F₁a-f fragments were produced and purified as before. One of them, the H1.18 F₁a fragment (Figure 2A), exhibited clearly improved binding activity over the L2.6b⁺ mutant in an ELISA (Figure 2B), even though its affinity was still lower than that of the original L2.6 mutant carrying the two Cys residue. Nevertheless, the yield of the H1.18 mutant was 12-fold higher upon expression in *E. coli* and thus close to that of the recombinant wild-type DN-1 F₁a fragment (15 versus 0.8 mg/l of 1.0b⁺ F₁a, respectively).

For about analysis of engineered T_H programs

For a detailed analysis of the antigen-binding activity and application in immunohistochemistry as well as cell culture

	CMR-12	80
41	50 56	
	GKSPOLITVATRIADGSSRFYGGSGROYSIKISIAH	
61	ag	
	CMR-13	107
	97	
	DIVATVYCKMSTISITICAGTMEIK	
12.6	RV C	
12.6 (usev)	RV V	
12.1.8	INV V	

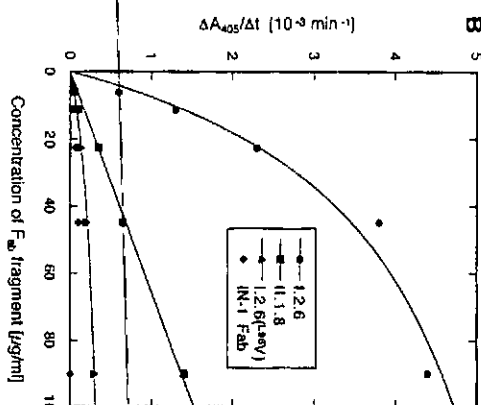
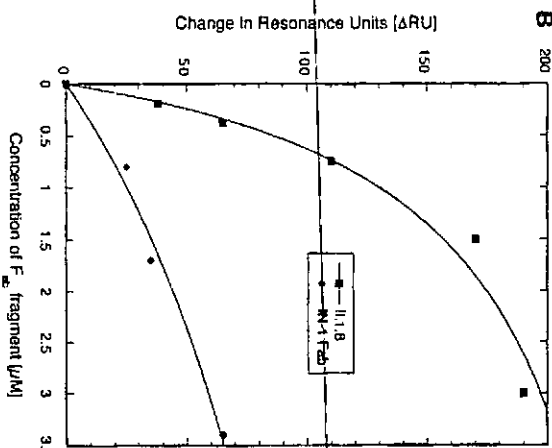
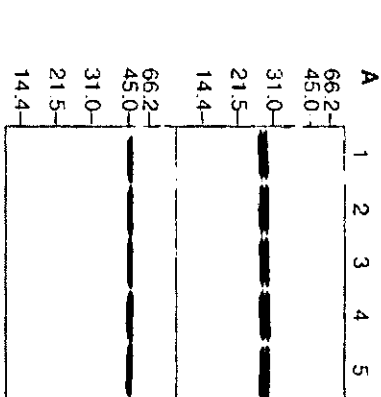
[illegible]

Fig. 3. Indirect indirect electrophoresis for the wild-type (N1) *Ad* P₂ fragment and for *Ad* P₂ mutants. (A) SDS-PAGE analysis of purified recombinant P₂ fragments prepared in this study. P₂ fragments were produced in *P. fortis* (JAL5) harboring the corresponding derivative of the vector pSVS35 and purified by IMAC. As shown in the upper panel, lanes marked with 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h, 1i, 1j, 1k, 1l, 1m, 1n, 1o, 1p, 1q, 1r, 1s, 1t, 1u, 1v, 1w, 1x, 1y, 1z, 1aa, 1ab, 1ac, 1ad, 1ae, 1af, 1ag, 1ah, 1ai, 1aj, 1ak, 1al, 1am, 1an, 1ao, 1ap, 1aq, 1ar, 1as, 1at, 1au, 1av, 1aw, 1ax, 1ay, 1az, 1ba, 1bb, 1bc, 1bd, 1be, 1bf, 1bg, 1bh, 1bi, 1bj, 1bk, 1bl, 1bm, 1bn, 1bo, 1bp, 1bq, 1br, 1bs, 1bt, 1bu, 1bv, 1bw, 1bx, 1by, 1bz, 1ca, 1cb, 1cc, 1cd, 1ce, 1cf, 1cg, 1ch, 1ci, 1cj, 1ck, 1cl, 1cm, 1cn, 1co, 1cp, 1cq, 1cr, 1cs, 1ct, 1cu, 1cv, 1cw, 1cx, 1cy, 1cz, 1da, 1db, 1dc, 1dd, 1de, 1df, 1dg, 1dh, 1di, 1dj, 1dk, 1dl, 1dm, 1dn, 1do, 1dp, 1dq, 1dr, 1ds, 1dt, 1du, 1dv, 1dw, 1dx, 1dy, 1dz, 1ea, 1eb, 1ec, 1ed, 1ee, 1ef, 1eg, 1eh, 1ei, 1ej, 1ek, 1el, 1em, 1en, 1eo, 1ep, 1eq, 1er, 1es, 1et, 1eu, 1ev, 1ew, 1ex, 1ey, 1ez, 1fa, 1fb, 1fc, 1fd, 1fe, 1ff, 1fg, 1fh, 1fi, 1fj, 1fk, 1fl, 1fm, 1fn, 1fo, 1fp, 1fq, 1fr, 1fs, 1ft, 1fu, 1fv, 1fw, 1fx, 1fy, 1fz, 1ga, 1gb, 1gc, 1gd, 1ge, 1gf, 1gg, 1gh, 1gi, 1gj, 1gk, 1gl, 1gm, 1gn, 1go, 1gp, 1gq, 1gr, 1gs, 1gt, 1gu, 1gv, 1gw, 1gx, 1gy, 1gz, 1ha, 1hb, 1hc, 1hd, 1he, 1hf, 1hg, 1hi, 1hj, 1hk, 1hl, 1hm, 1hn, 1ho, 1hp, 1hq, 1hr, 1hs, 1ht, 1hu, 1hv, 1hw, 1hx, 1hy, 1hz, 1ia, 1ib, 1ic, 1id, 1ie, 1if, 1ig, 1ih, 1ii, 1ij, 1ik, 1il, 1im, 1in, 1io, 1ip, 1iq, 1ir, 1is, 1it, 1iu, 1iv, 1iw, 1ix, 1iy, 1iz, 1ja, 1jb, 1jc, 1jd, 1je, 1jf, 1jg, 1jh, 1ji, 1jj, 1jk, 1jl, 1jm, 1jn, 1jo, 1jp, 1jq, 1jr, 1js, 1jt, 1ju, 1jv, 1jw, 1jx, 1jy, 1jz, 1ka, 1kb, 1kc, 1kd, 1ke, 1kf, 1kg, 1kh, 1ki, 1kj, 1kk, 1kl, 1km, 1kn, 1ko, 1kp, 1kq, 1kr, 1ks, 1kt, 1ku, 1kv, 1kw, 1kx, 1ky, 1kz, 1la, 1lb, 1lc, 1ld, 1le, 1lf, 1lg, 1lh, 1li, 1lj, 1lk, 1ll, 1lm, 1ln, 1lo, 1lp, 1lq, 1lr, 1ls, 1lt, 1lu, 1lv, 1lw, 1lx, 1ly, 1lz, 1ma, 1mb, 1mc, 1md, 1me, 1mf, 1mg, 1mh, 1mi, 1mj, 1mk, 1ml, 1mm, 1mn, 1mo, 1mp, 1mq, 1mr, 1ms, 1mt, 1mu, 1mv, 1mw, 1mx, 1my, 1mz, 1na, 1nb, 1nc, 1nd, 1ne, 1nf, 1ng, 1nh, 1ni, 1nj, 1nk, 1nl, 1nm, 1nn, 1no, 1np, 1nq, 1nr, 1ns, 1nt, 1nu, 1nv, 1nw, 1nx, 1ny, 1nz, 1oa, 1ob, 1oc, 1od, 1oe, 1of, 1og, 1oh, 1oi, 1oj, 1ok, 1ol, 1om, 1on, 1oo, 1op, 1oq, 1or, 1os, 1ot, 1ou, 1ov, 1ow, 1ox, 1oy, 1oz, 1pa, 1pb, 1pc, 1pd, 1pe, 1pf, 1pg, 1ph, 1pi, 1pj, 1pk, 1pl, 1pm, 1pn, 1po, 1pp, 1pq, 1pr, 1ps, 1pt, 1pu, 1pv, 1pw, 1px, 1py, 1pz, 1qa, 1qb, 1qc, 1qd, 1qe, 1qf, 1qg, 1qh, 1qi, 1qj, 1qk, 1ql, 1qm, 1qn, 1qo, 1qp, 1qq, 1qr, 1qs, 1qt, 1qu, 1qv, 1qw, 1qx, 1qy, 1qz, 1ra, 1rb, 1rc, 1rd, 1re, 1rf, 1rg, 1rh, 1ri, 1rj, 1rk, 1rl, 1rm, 1rn, 1ro, 1rp, 1rq, 1rr, 1rs, 1rt, 1ru, 1rv, 1rw, 1rx, 1ry, 1rz, 1sa, 1sb, 1sc, 1sd, 1se, 1sf, 1sg, 1sh, 1si, 1sj, 1sk, 1sl, 1sm, 1sn, 1so, 1sp, 1sq, 1sr, 1ss, 1st, 1su, 1sv, 1sw, 1sx, 1sy, 1sz, 1ta, 1tb, 1tc, 1td, 1te, 1tf, 1tg, 1th, 1ti, 1tj, 1tk, 1tl, 1tm, 1tn, 1to, 1tp, 1tq, 1tr, 1ts, 1tt, 1tu, 1tv, 1tw, 1tx, 1ty, 1tz, 1ua, 1ub, 1uc, 1ud, 1ue, 1uf, 1ug, 1uh, 1ui, 1uj, 1uk, 1ul, 1um, 1un, 1uo, 1up, 1uq, 1ur, 1us, 1ut, 1uu, 1uv, 1uw, 1ux, 1uy, 1uz, 1va, 1vb, 1vc, 1vd, 1ve, 1vf, 1vg, 1vh, 1vi, 1vj, 1vk, 1vl, 1vm, 1vn, 1vo, 1vp, 1vq, 1vr, 1vs, 1vt, 1vu, 1vv, 1vw, 1vx, 1vy, 1vz, 1wa, 1wb, 1wc, 1wd, 1we, 1wf, 1wg, 1wh, 1wi, 1wj, 1wk, 1wl, 1wm, 1wn, 1wo, 1wp, 1wq, 1wr, 1ws, 1wt, 1wu, 1wv, 1ww, 1wx, 1wy, 1wz, 1xa, 1xb, 1xc, 1xd, 1xe, 1xf, 1xg, 1xh, 1xi, 1xj, 1xk, 1xl, 1xm, 1xn, 1xo, 1xp, 1xq, 1xr, 1xs, 1xt, 1xu, 1xv, 1xw, 1xx, 1xy, 1xz, 1ya, 1yb, 1yc, 1yd, 1ye, 1yf, 1yg, 1yh, 1yi, 1yj, 1yk, 1yl, 1ym, 1yn, 1yo, 1yp, 1yq, 1yr, 1ys, 1yt, 1yu, 1yv, 1yw, 1yx, 1yy, 1yz, 1za, 1zb, 1zc, 1zd, 1ze, 1zf, 1zg, 1zh, 1zi, 1zj, 1zk, 1zl, 1zm, 1zn, 1zo, 1zp, 1zq, 1zr, 1zs, 1zt, 1zu, 1zv, 1zw, 1zx, 1zy, 1zz, 1aa, 1ab, 1ac, 1ad, 1ae, 1af, 1ag, 1ah, 1ai, 1aj, 1ak, 1al, 1am, 1an, 1ao, 1ap, 1aq, 1ar, 1as, 1at, 1au, 1av, 1aw, 1ax, 1ay, 1az, 1ba, 1bb, 1bc, 1bd, 1be, 1bf, 1bg, 1bh, 1bi, 1bj, 1bk, 1bl, 1bm, 1bn, 1bo, 1bp, 1bq, 1br, 1bs, 1bt, 1bu, 1bv, 1bw, 1bx, 1by, 1bz, 1ca, 1cb, 1cc, 1cd, 1ce, 1cf, 1cg, 1ch, 1ci, 1cj, 1ck, 1cl, 1cm, 1cn, 1co, 1cp, 1cq, 1cr, 1cs, 1ct, 1cu, 1cv, 1cw, 1cx, 1cy, 1cz, 1da, 1db, 1dc, 1dd, 1de, 1df, 1dg, 1dh, 1di, 1dj, 1dk, 1dl, 1dm, 1dn, 1do, 1dp, 1dq, 1dr, 1ds, 1dt, 1du, 1dv, 1dw, 1dx, 1dy, 1dz, 1ea, 1eb, 1ec, 1ed, 1ee, 1ef, 1eg, 1eh, 1ei, 1ej, 1ek, 1el, 1em, 1en, 1eo, 1ep, 1eq, 1er, 1es, 1et, 1eu, 1ev, 1ew, 1ex, 1ey, 1ez, 1fa, 1fb, 1fc, 1fd, 1fe, 1ff, 1fg, 1fh, 1fi, 1fj, 1fk, 1fl, 1fm, 1fn, 1fo, 1fp, 1fq, 1fr, 1fs, 1ft, 1fu, 1fv, 1fw, 1fx, 1fy, 1fz, 1ga, 1gb, 1gc, 1gd, 1ge, 1gf, 1gg, 1gh, 1gi, 1gj, 1gk, 1gl, 1gm, 1gn, 1go, 1gp, 1gq, 1gr, 1gs, 1gt, 1gu, 1gv, 1gw, 1gx, 1gy, 1gz, 1ha, 1hb, 1hc, 1hd, 1he, 1hf, 1hg, 1hi, 1hj, 1hk, 1hl, 1hm, 1hn, 1ho, 1hp, 1hq, 1hr, 1hs, 1ht, 1hu, 1hv, 1hw, 1hx, 1hy, 1hz, 1ia, 1ib, 1ic, 1id, 1ie, 1if, 1ig, 1ih, 1ii, 1ij, 1ik, 1il, 1im, 1in, 1io, 1ip, 1iq, 1ir, 1is, 1it, 1iu, 1iv, 1iw, 1ix, 1iy, 1iz, 1ja, 1jb, 1jc, 1jd, 1je, 1jf, 1jg, 1jh, 1ji, 1jj, 1jk, 1jl, 1jm, 1jn, 1jo, 1jp, 1jq, 1jr, 1js, 1jt, 1ju, 1jv, 1jw, 1jx, 1jy, 1jz, 1ka, 1kb, 1kc, 1kd, 1ke, 1kf, 1kg, 1kh, 1ki, 1kj, 1kk, 1kl, 1km, 1kn, 1ko, 1kp, 1

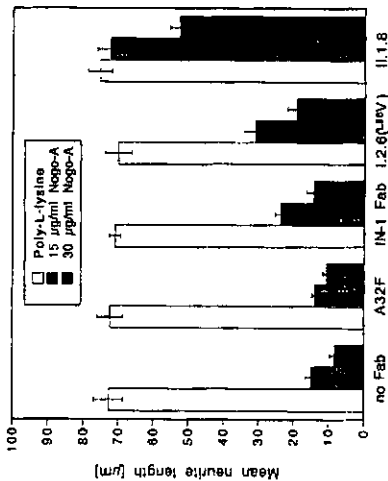


Fig. 5. Stepwise improvement of the biological activity of the IN-1 F_{ab} fragment during affinity maturation as determined in an *in vitro* neurite outgrowth assay. The columns show the mean neurite lengths of granule cells from the rat cerebellum cultured on a recombinant Nogo-A substrate or just on poly-L-lysine as a control—whose inhibitory properties were neutralized in the presence of the IN-1 F_{ab} fragment and its engineered mutants (applied at 100 μ g/ml). Error bars correspond to standard deviations from triplicate experiments.

I.1.8, exhibited significantly stronger neutralizing effects, as revealed by their better fibre growth-promoting activities, even when the concentration of the inhibitory material was raised. None of the applied F_{ab} fragments exerted an effect on neurite outgrowth of cerebellar granule cells under control conditions, i.e. in the absence of Nogo-A. Notably, the stepwise improvement of the biological activity of the mutants (I.2.6(100%) and I.1.8 in comparison with the wild-type IN-1 F_{ab} fragment) correlated nicely with their relative increase in antigen affinity observed in the ELISA experiment (Figure 2H).

Discussion

In spite of its considerable potential as a reagent for studying the biological role and distribution of the Nogo-A antigen and for neutralizing its inhibitory effect on axonal growth in tissue culture as well as animal experiments, the use of the monoclonal antibody IN-1 has so far been hampered by its apparently low antigen affinity. In the present study we were able to quantify the intrinsic affinity of its recombinant F_{ab} fragment to be in the 10^6 M $^{-1}$ range. The remarkably high dissociation constant that was measured between the IN-1 F_{ab} fragment and the bacterially produced Nogo-A domain explains several observations from previous studies.

First, the antibody fragment had to be applied at a relatively high concentration, typically 5 mg/ml (corresponding to approximately 100 μ M), in order to provoke a biological effect (Bundtlow *et al.*, 1996; Brocas *et al.*, 2000). The original monoclonal antibody was similarly effective at a 5–10-fold lower concentration, which is in agreement with what has to be expected from the strong avidity effect of an IgM as soon as it interacts with an immobilized antigen at a high surface density. Unfortunately, the precise concentration of the IgM was rarely used as an experimental parameter because of the difficulties associated with its purification from the hybridoma supernatant.

Secondly, the use of IN-1 in immunohistochemical detection experiments, like western blotting, immunohistochemistry,

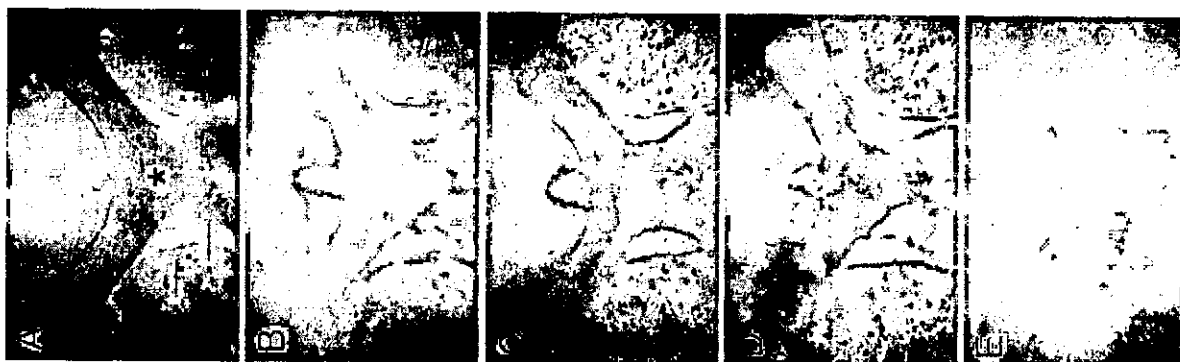


Fig. 4. Specific staining of myelin-rich regions in the rat brain using the IN-1 F_{ab} fragment and its engineered mutants. (A) Staining was performed with an anti-MOG F_{ab} fragment (H. Zander *et al.*, to be published); the myelinated, MOG-positive *Corpus striatum* is marked by an asterisk and myelinated fibres of the *Corpus callosum* are indicated by arrows. (B) Staining with wild-type IN-1 F_{ab} fragment. (C) I.2.6(100%) F_{ab} fragment. (D) I.1.8 F_{ab} fragment. (E) Anti-CD30 F_{ab} fragment (M. Schöpf *et al.*, to be published). Bound F_{ab} fragment was detected with a goat anti-human λ antibody conjugated with alkaline phosphatase and revealed using the Fast Red procedure.

the GCG program package: Devereux *et al.*, 1984) led to electrostatic repulsion within the acceptable range of pH conditions.

Therefore, a NiNTA-derivatized sensor chip (NTA-sensor chip®; Nieba *et al.*, 1997) was chosen, to which NI-454 was immobilized via its C-terminal His $_6$ -tag (Figure 1A; see Materials and methods). In order to prevent binding of the recombinant F_{ab} fragments to the same surface, their variable domain genes were subcloned on the vector pASK107, thus permitting purification—with comparable efficiency—via the *Strept* tag II instead of the His $_6$ -tag (see Materials and methods). The F_{ab} fragments were applied to the sensor chip, each time charged with fresh antigen, at different concentrations and the amount of bound Ig fragment was measured under equilibrium conditions. In this way, binding isotherms were obtained for the wild-type and engineered F_{ab} fragments (Figure 3B), from which dissociation constants were deduced. The K_D value for the recombinant wild-type IN-1 F_{ab} fragment was 7.8 ± 1.9 μ M. In contrast, the dissociation constant for its I.1.8 mutant was 1.04 ± 0.18 μ M, i.e. 8-fold better. Control experiments with an unrelated protein, recombinant cystatin (Aucersveld *et al.*, 1989) carrying a His $_6$ -tag (A. Skerka, unpublished results), that was used instead of the Nogo-A fragment for coating of the sensor chip, confirmed the absence of unspecific binding (data not shown).

The engineered I.1.8 F_{ab} fragment was also employed for the detection of natural Nogo-A by immunohistochemistry. Figure 4 shows cross-sections of adult rat brain which were stained with different recombinant F_{ab} fragments, followed by a secondary antibody conjugated with a reporter enzyme. The I.1.8 mutant specifically stained the myelinated regions, especially the *Corpus callosum* and transected fibre bundles of the *Capula interna* in the *Corpus striatum*. The staining pattern is similar in morphology and intensity to the one obtained with a recombinant F_{ab} fragment derived from the monoclonal antibody 8-18C5, which is directed against the major oligodendrocyte glycoprotein MOG (Linnington *et al.*, 1984). The staining with the recombinant wild-type IN-1 F_{ab} fragment was very weak under the present conditions of fixation. An unrelated recombinant anti-CD30 F_{ab} fragment derived from the HRS-3 antibody (Eigent *et al.*, 1990) gave only background staining. These results demonstrate that the affinity of the I.1.8 mutant of the IN-1 F_{ab} fragment has been raised to a sufficient extent in order to detect the Nogo-A antigen in standard immunohistochemical experiments. Analogous results were obtained using immunofluorescence microscopy (data not shown).

Finally, the engineered F_{ab} fragments were tested for their neutralizing effect on Nogo-A substrate properties using a cell culture assay. As shown in Figure 5, neurite outgrowth of cerebellar granule cells was severely reduced when recombinant Nogo-A was used as a substrate. In contrast, in the absence, poly-L-lysine promoted extensive attachment of granule cells, as well as robust neurite growth with an average neurite length of approximately 70 μ m in 70% of adherent cells. In this *in vitro* bioassay functional neutralization of the inhibitory Nogo-A substrate was observed at different degrees for the various engineered F_{ab} fragments (Figure 5). While the recombinant wild-type IN-1 F_{ab} fragment revealed partial neutralization of Nogo-A activity, as previously demonstrated (Bundtlow *et al.*, 1996), introduction of the mutation Ala ^{15} Val ^{16} into the V_L domain completely abolished this effect. In contrast, the mutants I.2.6(100%) and, in particular,

fluorescence microscopy and immunoprecipitation, was limited, and the original recombinant F_{ab} fragment was even dissatisfactory in this respect. In such experiments an initial incubation period allowing for antibody-antigen association is usually followed by several washing steps, where the Ig protein (or the solubilized antigen) may be quickly lost by a bleeding effect if the kinetics of dissociation are fast. This usually happens if the thermodynamic dissociation constant is high and it was also observed here in the course of our Biacore measurements (data not shown). Unfortunately, as a general implication of reaction kinetics this phenomenon cannot be overcome by simply raising the concentration of the applied complexing partner.

The fundamental nature of this problem explains why it took an increased effort and repeated cycles of mutagenesis in order to finally engineer a derivative of the IN-1 F_{ab} fragment with 8-fold enhanced affinity. The I.1.8 mutant possesses a K_D value equal to 1 μ M, which is obviously sufficient to yield clear antigen-binding signals in an ELISA and to effect specific staining in immunohistochemistry on brain sections. The preceding mutant I.2.6 might actually perform even better, yet its exposed Cys residue at position L96 within CDR-L3, which apparently plays a crucial role, prevents its practical application due to poor expression in *E. coli*. In this respect, one might consider switching to another host organism. However, impaired exposed Cys residues have a general tendency of being post-translationally modified in eukaryotic cells (Lyons *et al.*, 1999) and they provide a problem during storage because of susceptibility towards oxidation. Nevertheless, the mutant I.1.8 IN-1 F_{ab} fragment with its well defined antigen-binding activity presents a promising starting point for future affinity maturation attempts, where the mutagenesis could be focused at hypervariable regions apart from CDR-L3, possibly even within the V_H domain.

The present investigation also sheds light on aspects of the structure and biological function of the Nogo-A antigen. First, our data provide evidence that the epitope for the IN-1 antibody (or its F_{ab} fragment, respectively) resides within the protein domain encoded by exon 3. This exon is exclusively present in the splice form called Nogo-A, which constitutes a potent neurite growth inhibitory protein (Chen *et al.*, 2000; Prinjha *et al.*, 2000). Since the IgM as well as its recombinant F_{ab} fragment on axonal growth (Bundtlow *et al.*, 1996; Brocas *et al.*, 2000) we conclude that the exon 3 domain is involved in the inhibitory activity of Nogo-A. This interpretation is in agreement with observations from immunocytochemical staining of live oligodendrocytes with an unrelated exon 3-specific antibody (Huber and Schwab, 2000) and with functional assays based on an exon 1–3 fragment that was expressed as an IgG F_2 fusion protein (Trifolia *et al.*, 2000). However, an inhibitory effect on axonal regeneration was recently reported for a region called 'Nogo-66', which is found between the two hydrophobic, presumably transmembrane, segments within the C-terminal domain of Nogo-A (GrandPré *et al.*, 2000; Fournier *et al.*, 2001). Therefore, regardless of the current model of its transmembrane topology, it remains possible that both the exon 3 region and the Nogo-66 region inhibit axon growth, possibly via differing receptors.

The fact that the exon 3 moiety of Nogo-A was readily secreted from *E. coli*, including efficient processing of the bacterial signal peptide that was attached to its N-terminus, and recovered as a soluble protein from the periplasmic space,

