

PROTEÍNA DE UNIÓN A RGMa Y SU USO

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a una proteína de unión a la molécula guía repelente A (RGMa) y su uso.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La RGM (molécula de guía repelente), que es una proteína de membrana anclada en GPI con un peso molecular de aproximadamente 33 kDa, se ha identificado inicialmente como una molécula de orientación de axón en el sistema visual (véase el documento no de patente 1). La familia RGM incluye tres miembros llamados RGMa, RGMb y RGMc. Entre ellos, RGMa se reexpresa después de la lesión del sistema nervioso central en humanos adultos y ratas, así como en la etapa de desarrollo, y la inhibición de RGMa en rata acelera el crecimiento de neuritas después de la lesión de la médula espinal y promueve la recuperación funcional. Por lo tanto, se cree que RGMa es un inhibidor neurítico después de la lesión del sistema nervioso central.

RGMa también se ha informado de que tienen efectos en el sistema inmunológico. RGMa se expresa en células dendríticas y actúa en las células T, con lo cual mejora la adhesión de las células T a ICAM-1 y fibronectina e induce la producción de citocina (Documento de patente 4). En un modelo de ratón de esclerosis múltiple, la administración de anticuerpos anti-RGMa suprime los síntomas debidos a encefalomielitis y también muestra efectos de supresión del inicio y recaída. Se cree que el anticuerpo anti-RGMa se une a RGMa expresado en células dendríticas para inhibir la activación de células T, ejerciendo de este modo efectos sobre la esclerosis múltiple.

El mecanismo de transducción de señales de RGMa también está siendo elucidado, y la proteína neogenina ha sido reportada como un receptor RGMa (Documento de Patente 3). La neogenina es una proteína transmembrana única expresada en neuronas y células T.

RGMa se une a la neogenina en una membrana celular para inducir la activación intracelular de RhoA y la inactivación de Ras, proporcionando de este modo un efecto inhibidor de crecimiento neurítico. Mientras tanto, se sabe que la neogenina causa apoptosis en ausencia de la unión de RGMa en un cerebro de pollo en desarrollo (Matsunaga et al., Dev.Growth Differ.46, 481, 2004). Así, se cree que la vía RGMa/neogenina tiene dos efectos conflictivos de promover la

supervivencia neuronal, que es un efecto favorable para la regeneración nerviosa, y de inhibir el crecimiento de las neuritas, un efecto negativo.

Como un agente farmacéutico dirigido a RGM, el Documento de Patente 1 describe un agente promotor de la regeneración de axones que contiene un anticuerpo neutralizante anti-RGM como ingrediente activo. Los Documentos de Patente 2 y 3 describen un agente terapéutico para daño mecánico en el cerebro y la médula espinal, un anticuerpo anti-RGM que regula la unión de RGM a su neogenina receptora. El Documento de Patente 4 describe usos médicos de anticuerpos anti-RGM tales como para esclerosis múltiple. El Documento de Patente 5 describe usos terapéuticos del anticuerpo anti-RGM para enfermedades que incluyen esclerosis múltiple, lesión cerebral de mamífero, lesión de médula espinal, apoplejía, enfermedad neurodegenerativa y esquizofrenia. Además, el Documento de Patente 6 describe usos terapéuticos de moduladores de RGM tales como anticuerpo anti-RGM para lesión de médula espinal y esclerosis múltiple, y el Documento de No Patente 3 describe un uso terapéutico para esclerosis múltiple progresiva.

Documentos de la técnica antecedente

Documentos de patente

Documento de Patente 1: WO2005/087268

Documento de Patente 2: Solicitud de patente PCT japonesa traducida publicada No. 2010-537655

Documento de Patente 3: Solicitud de patente PCT japonesa traducida publicada No. 2009-510002

Documento de Patente 4: WO2011/071059

Documento de Patente 5: Solicitud de patente PCT japonesa traducida publicada No. 2011-512806

Documento de Patente 6: Solicitud de patente PCT japonesa traducida publicada No. 2004-525875

Documentos no de patente

Documento no patente 1: Neuron 5, 735-743 (1990)

Documento No de Patente 2: J. Cell Biol. 173, 47-58 (2006)

Documento No de Patente 3: Cell Reports 10, 1-12 (2015)

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Problema Técnico

Los usos terapéuticos del anticuerpo anti-RGMA contra enfermedades neurológicas e inmunológicas se describen como se ha descrito anteriormente, pero los anticuerpos convencionales tienen problemas tales como actividad insuficiente, posibilidad de dañar las funciones intrínsecas de RGMA y efectos secundarios. En particular, los anticuerpos convencionales pueden inhibir la unión entre RGMA y neogenina, inhibiendo también los efectos favorables tales como la supresión de la apoptosis ejercida por la neogenina unida a RGMA.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una proteína de unión a RGMA que no inhiba la interacción RGMA/neogenina pero que neutralice la actividad inhibidora del crecimiento de neuritas de RGMA.

Solución al Problema

Los inventores de la presente invención se estudiaron intensivamente para resolver los problemas anteriores. Como resultado, los presentes inventores han tenido éxito en la obtención de una proteína de unión a RGMA que no inhibe la unión entre RGMA y neogenina sino que neutraliza la actividad inhibidora de crecimiento de neuritas de RGMA y determina que la proteína de unión a RGMA puede usarse como medicamento para enfermedades neurológicas o inmunológicas, completando así la presente invención.

La presente invención es de la siguiente manera:

[1] Una proteína de unión a RGMA aislada que no inhibe la unión entre RGMA y neogenina pero neutraliza la actividad inhibidora del crecimiento neutrítico de RGMA.

[2] La proteína de unión a RGMA descrita en [1], que se une a una RGMA de humano, rata y/o ratón.

[3] La proteína de unión a RGMA descrita en [1] ó [2], que se une a los péptidos EEVVNAVEDWDSQG (SEQ ID NO: 26 en el listado de secuencias), NQQIDFQAFHTNAE (SEQ ID NO: 27 en el listado de secuencias), PTAPETFPYET (SEQ ID NO: 28 en el listado de secuencias), y/o KLPVEDLYYQA (SEQ ID NO: 29 en el listado de secuencias).

[4] La proteína de unión a RGMA descrita en cualquiera de [1] a [3], que se une a los péptidos de las SEQ ID NO: 26 y 27 en el listado de secuencias.

[5] La proteína de unión a RGMA descrita en cualquiera de [1] a [4], que se une a los péptidos de las SEQ ID NO: 26, 27 y 28 en el listado de secuencias.

[6] La proteína de unión a RGMA descrita en cualquiera de [1] a [4], que

se une a los péptidos de las SEQ ID NO: 26, 27 y 29 en el listado de secuencias.

[7] La proteína de unión a RGMA descrita en cualquiera de [1] a [6], en donde la proteína de unión a RGMA es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[8] Una molécula de ácido nucleico que codifica para la porción de proteína de la proteína de unión a RGMA descrita en cualquiera de [1] a [7].

[9] Un vector recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico descrita [8].

[10] Una célula hospedera que contiene un vector recombinante descrito en [9].

[11] Un método para producir la proteína de unión a RGMA descrita en [1] a [7], el método comprende un paso de cultivar la célula hospedera descrita en [10].

[12] Una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión a RGMA descrita en cualquiera de [1] a [7].

[13] La composición farmacéutica descrita en [12] para usarse en la prevención, el tratamiento o prevención de recaídas de enfermedades neurológicas o inmunológicas.

[14] La composición farmacéutica descrita en [13], en donde las enfermedades neurológicas se seleccionan del grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica, lesión del plexo braquial, daño cerebral (incluyendo lesión cerebral traumática), parálisis cerebral, síndrome de Guillain-Barre, leucodistrofia cerebral, esclerosis múltiple (incluyendo esclerosis múltiple recidivante-remitente, esclerosis múltiple progresiva primaria, esclerosis múltiple progresiva secundaria), neuromielitis óptica, síndrome postpolio, espina bífida, lesión de médula espinal, atrofia muscular espinal, neoplasma espinal, enfermedad de Alzheimer, demencia (incluyendo demencia senil, deterioro cognitivo leve), enfermedad de Huntington, disquinesia tardía, manía, enfermedad de Parkinson, síndrome de Steele-Richardson, síndrome de Down, miastenia gravis, neurotrauma (incluyendo trauma del nervio óptico), amiloidosis vascular, hemorragia cerebral asociada con amiloidosis, infarto cerebral, cerebritis, estado confusión aguda, glaucoma, esquizofrenia y degeneración de la capa de fibras nerviosas de la retina (incluyendo retinopatía diabética, neuropatía óptica isquémica, retinosquiasis ligada a X, neuropatía óptica inducida por fármacos, distrofia retiniana, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedades oculares caracterizadas por drusas de disco óptico, enfermedades oculares caracterizadas por determinación genética de degeneración de fotorreceptores, distrofia de conos y bastones autosómica recesiva

, trastorno mitocondrial asociado con neuropatía óptica).

[15] La composición farmacéutica descrita en [13], en donde las enfermedades inmunológicas se seleccionan del grupo que consiste en esclerosis múltiple (incluyendo esclerosis múltiple remitente recidivante, esclerosis múltiple progresiva primaria, esclerosis múltiple progresiva secundaria), neuromielitis óptica, psoriasis, artritis (incluyendo artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica), síndrome de Guillain-Barré, enfermedad neuro-Behcet, anemia perniciosa, diabetes mellitus tipo I (insulino-dependiente), lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), síndrome de Sjogren, síndrome de Goodpasture, Enfermedad de Graves, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, asma, polinosis, dermatitis atópica, glomerulonefritis, miastenia gravis, enfermedad de Hashimoto y sarcoidosis.

[16] La composición farmacéutica descrita en [13], en donde las enfermedades neurológicas o inmunológicas se seleccionan del grupo que consiste en lesión de la médula espinal, neurotrauma (incluyendo trauma del nervio óptico) y esclerosis múltiple (incluyendo esclerosis múltiple remitente recidivante, esclerosis múltiple progresiva primaria, esclerosis múltiple progresiva secundaria).

[17] Un anticuerpo anti-RGMA aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde la secuencia de aminoácidos de cada una de la región determinante de complementariedad de la cadena ligera 1 (LCDR1), la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera 2 (LCDR2), la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera 3 (LCDR3), la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 1 (HCDR1), la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 2 (HCDR2) y la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 3 (HCDR3) comprenden lo siguiente:

LCDR1:RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias)

LCDR2:YTSRLHS (SEQ ID NO: 31 en el listado de secuencias)

LCDR3:QQLNTLP (SEQ ID NO: 32 en el listado de secuencias)

HCDR1:DAWMD (SEQ ID NO: 33 en el listado de secuencias)

HCDR2:EIRSKANNHATYYAESVKG (SEQ ID NO: 34 en el listado de secuencias) y

HCDR3:RDGAY (SEQ ID NO: 35 en el listado de secuencias);

o

LCDR1:RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 36 en el listado de secuencias)

LCDR2:KVSNRFS (SEQ ID NO: 37 en el listado de secuencias)

LCDR3:SQSTHVP (SEQ ID NO: 38 en el listado de secuencias)

HCDR1:TSYYWN (SEQ ID NO: 39 en el listado de secuencias)

HCDR2:YISYDGTNNYNPSLKN (SEQ ID NO: 40 en el listado de secuencias) y

HCDR3:SFG, y

en el que en cada una de las secuencias de CDR uno o varios aminoácidos pueden estar sustituidos, eliminados y/o añadidos.

[18] El anticuerpo anti-RGMA o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en [17],

en donde la región variable de cadena pesada (VH) comprende lo siguiente:

VH:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLEWVAEIRSK
ANNHATYYAESVKGRFTISRDDSKSIVYLQMNSLRTEDTALYYCTRRDGAYWGKGT
TVTVSS (SEQ ID NO: 41 en el listado de secuencias) o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 90% con dicha secuencia de aminoácidos; y

en el que la región variable de cadena ligera (VL) comprende lo siguiente:

VL:

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFASYFCQQLNTPWTFGGGTKVEME (SEQ ID
NO: 42 en el listado de secuencias) o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 90% con dicha secuencia de aminoácidos.

[19] El anticuerpo anti-RGMA o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en [17] ó [18], en donde el anticuerpo anti-RGMA es un anticuerpo humanizado.

[20] El anticuerpo anti-RGMA o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en cualquiera de [17] a [19], en donde el anticuerpo anti-RGMA comprende regiones constantes de IgH humano.

[21] Una proteína de unión a RGMA, que compite con el anticuerpo anti-RGMA descrito en [17] ó [18] para la unión a RGMA.

[22] Una molécula de ácido nucleico que codifica para la porción de proteína del anticuerpo anti-RGMA o un fragmento de unión a antígeno de la misma descrita en cualquiera de [17] a [20].

[23] La molécula de ácido nucleico descrita en [22], en donde las secuencias de nucleótidos que codifican para las secuencias de aminoácidos VH y VL cada una son una secuencia de nucleótidos que comprende:

VH:

gaagtgcagctggtggaatctggcggcgactggtgcagcctggcagatccctgagactgtcctgtaccgcctccgg
cttcaccttctccgacgcctggatggattgggtgcgacaggctcctggcaagggcctggaatgggtggccgagatccg
gtccaaggccaacaaccacgccacactactacgccgagtctgtgaagggccggttcacatctcccgggacgactcc
aagtccatcgtgtacctgcagatgaactccctgcggaccgaggacaccgccctgtactactgcaccagaagggacg
gcgcctactggggcaagggcaccacagtgcagtgctctcc (SEQ ID NO: 43 en el listado de
secuencias) y

VL:

gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgtctccgtggcgacagagtaccatcacctgtcgggcctccc
aggacatctcctctacctgaactggatcagcagaagcccggaagggccccaagctgctgatctactacacctccc
ggctgcactccggcgtgccctctagatttccggctctggctccggcaccgactttaccctgacatctccagcctgcag
cccgaggacttcgcctctacttctgtcagcagctgaacaccctgccctggacctttggcggaggcaccaaggtggaa
atggaa (SEQ ID NO: 44 en el listado de secuencias).

[24] Un vector recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico descrita [22] ó [23].

[25] Una célula hospedera que contiene un vector recombinante descrito en [24].

[26] Un método para producir el anticuerpo anti-RGMA o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en cualquiera de [17] a [20], el método comprende un paso de cultivar la célula hospedera descrita en [25].

[27] Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-RGMA o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en cualquiera de [17] a [20].

[28] La composición farmacéutica descrita en [27] para usarse en la prevención, el tratamiento o prevención de recaídas de enfermedades neurológicas o inmunológicas.

[29] La composición farmacéutica descrita en [28], en donde las enfermedades neurológicas se seleccionan del grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica, lesión del plexo braquial, daño cerebral (incluyendo lesión cerebral traumática), parálisis cerebral, síndrome de Guillain-Barre, leucodistrofia cerebral, esclerosis múltiple (incluyendo esclerosis múltiple recidivante-remitente, esclerosis múltiple progresiva primaria, esclerosis múltiple progresiva secundaria), neuromielitis óptica, síndrome postpolio, espina bífida, lesión de médula espinal, atrofia muscular espinal, neoplasma espinal, enfermedad de Alzheimer, demencia (incluyendo demencia senil, deterioro cognitivo leve), enfermedad de Huntington, disquinesia tardía, manía, enfermedad de Parkinson, síndrome de Steele-Richardson, síndrome de Down, miastenia gravis, neurotrauma (incluyendo trauma del nervio óptico), amiloidosis vascular, hemorragia cerebral asociada con amiloidosis, infarto cerebral, cerebritis, estado confusión aguda, glaucoma,

esquizofrenia y degeneración de la capa de fibras nerviosas de la retina (incluyendo retinopatía diabética, neuropatía óptica isquémica, retinosquiasis ligada a X, neuropatía óptica inducida por fármacos, distrofia retiniana, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedades oculares caracterizadas por drusas de disco óptico, enfermedades oculares caracterizadas por determinación genética de degeneración de fotorreceptores, distrofia de conos y bastones autosómica recesiva, trastorno mitocondrial asociado con neuropatía óptica).

[30] La composición farmacéutica descrita en [28], en donde las enfermedades inmunológicas se seleccionan del grupo que consiste en esclerosis múltiple (incluyendo esclerosis múltiple remitente recidivante, esclerosis múltiple progresiva primaria, esclerosis múltiple progresiva secundaria), neuromielitis óptica, psoriasis, artritis (incluyendo artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica), síndrome de Guillain-Barré, enfermedad neuro-Behcet, anemia perniciosa, diabetes mellitus tipo I (insulino-dependiente), lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), síndrome de Sjogren, síndrome de Goodpasture, Enfermedad de Graves, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, asma, polinosis, dermatitis atópica, glomerulonefritis, miastenia gravis, enfermedad de Hashimoto y sarcoidosis.

[31] La composición farmacéutica descrita en [28], en donde las enfermedades neurológicas o inmunológicas se seleccionan del grupo que consiste en lesión de la médula espinal, neurotrauma (incluyendo trauma del nervio óptico) y esclerosis múltiple (incluyendo esclerosis múltiple remitente recidivante, esclerosis múltiple progresiva primaria, esclerosis múltiple progresiva secundaria).

[32] Un método para prevenir, tratar o prevenir la recaída de enfermedades neurológicas o inmunológicas, el método comprende una etapa de administración de una dosis eficaz de la proteína de unión a RGMA descrita en cualquiera de [1] a [7] a un sujeto que lo necesite.

[33] Un método para prevenir, tratar o prevenir la recaída de enfermedades neurológicas o inmunológicas, el método comprende una etapa de administración de una dosis eficaz del anticuerpo anti-RGMA o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en cualquiera de [17] a [20] a un sujeto que lo necesite.

Efecto ventajoso de la invención

La proteína de unión a RGMA de la presente invención no inhibe la interacción entre RGMA y neogenina, siendo así capaz de mantener efectos tales como la inhibición de apoptosis en neuronas y similares ejercida por neogenina unida a RGMA, teniendo así un fuerte efecto protector sobre neuronas y poca

preocupación por los efectos secundarios asociados con el agotamiento de las neuronas. Además, el anticuerpo anti-RGMA humanizado de la presente invención es superior a los anticuerpos convencionales en propiedades tales como la unión a RGMA humano y la estabilidad térmica. Por lo tanto, el anticuerpo puede usarse como un medicamento para enfermedades neurológicas o inmunológicas, el cual tiene una eficacia excelente y pocos efectos secundarios.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra un resultado de un ensayo de inhibición de unión de neogenina a RGMA usando un anticuerpo policlonal anti-RGMA (AF2459), un anticuerpo de ejemplo comparativo (r5F9) y anticuerpos de la presente invención (r70E4 y 116A3).

La figura 2 muestra un resultado de un ensayo de inhibición de unión de BMP2 a RGMA usando un IgG de ratón control y anticuerpos de la presente invención (B5.70E4 y B5.116A3).

La figura 3 muestra un resultado de un ensayo de estabilidad térmica para anticuerpos que utilizan un anticuerpo de ejemplo comparativo (rH5F9), un anticuerpo quimérico de la presente invención (r116A3C) y anticuerpos humanizados de la presente invención (HE/KA y HA/KC).

La figura 4 muestra un resultado de un ensayo de crecimiento de neuritas usando los anticuerpos de la presente invención (B5.70E4 (izquierda) y B5.116A3 (derecha)).

La figura 5 muestra un resultado de una prueba de eficacia usando una IgG de ratón control (mo-IgG2bk) y los anticuerpos de la presente invención (r70E4 y r116A3) y usando un modelo de rata de lesión de médula espinal. Se muestran los resultados de las pruebas de eficacia en (A) un modelo de aplastamiento de la médula espinal y (B) un modelo de hemisección de la médula espinal.

La figura 6 muestra un resultado de una prueba de eficacia para el anticuerpo de la presente invención (B5.116A3) usando un modelo de ratón de esclerosis múltiple inducido por un péptido PLP₁₃₉₋₁₅₁. La parte izquierda muestra las puntuaciones de EAE, la parte derecha muestra los cambios en el peso corporal y las partes superior e inferior muestran los resultados cuando los anticuerpos de prueba se administraron después de 7 y 10 días y después de 18 y 21 días, respectivamente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Con el fin de facilitar la comprensión de la presente invención, los términos usados en la presente invención se explicarán a continuación.

RGMa

La RGMa es una proteína inhibidora de la proliferación de neuritas en el sistema nervioso central y la proteína de la RGMa humana es biosintetizada como una proteína precursora que comprende 450 aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias. El péptido señal Met 1 a Pro 47 presente en el extremo N (que se refiere al péptido del primer residuo de metionina al 47º residuo de prolina del lado N-terminal, descrito de forma similar a continuación) se elimina, el enlace peptídico entre Asp 168 y Pro 169 se escinde y el péptido C-terminal Arg 423 a Cys 450 se elimina y simultáneamente se agrega un anclaje GPI al grupo carboxilo C-terminal de Gly 422 que se ha convertido en el extremo C-terminal. Una proteína RGMa humana se expresa en una membrana celular a través del anclaje GPI como una proteína madura en la que el dominio N-terminal (Cys 48 a Asp 168) y el dominio C-terminal (Pro 169 a Ala 424) están unidos entre sí por un enlace disulfuro. Una proteína precursora de RGMa de ratón comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias y una proteína precursora de RGMa de rata comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 en el listado de secuencias. Dado que sus péptidos C terminales se eliminan, las proteínas maduras de los mismos tienen las mismas secuencias de aminoácidos. En la presente invención, RGMa puede referirse a una proteína precursora, una proteína madura o un fragmento activo de la misma, o puede ser un derivado o variante de la misma, siempre y cuando actúe mediante la unión a neogenina como se describe más adelante. RGMa puede ser RGMa humana o RGMa derivada de otros organismos, pero se prefiere RGMa humana.

Neogenina

La neogenina se expresa en, por ejemplo, neuronas nerviosas centrales y funciona como uno de los receptores RGMa. Como se muestra en SEQ ID NO: 10 en el Listado de Secuencias, la proteína neogenina humana comprende 1461 aminoácidos y se expresa como una proteína de membrana madura después de la eliminación del péptido señal Met 1 a Ala 33. En la presente invención, la neogenina puede referirse a una proteína precursora, a una proteína madura o a un fragmento de unión a RGMa, o puede ser un derivado o variante del mismo, siempre que se una a RGMa. La neogenina puede ser neogenina humana o neogenina

derivada de otros organismos, pero se prefiere la neogenina humana.

Neutralización

El término "neutralización", como se usa en la presente memoria, se refiere a una acción a través de la cual puede producirse la unión a un objetivo de interés y la inhibición de cualquier función del objetivo. En otras palabras, la frase "neutralizar la actividad inhibidora del crecimiento de neuritas de RGMa" significa que una proteína de unión a RGMa se une a RGMa, inhibiendo de este modo la actividad inhibidora de crecimiento de neuritas de RGMa. La actividad inhibidora de crecimiento de neuritas puede evaluarse mediante uno o más de varios ensayos in vitro o in vivo conocidos en la técnica, y puede evaluarse, por ejemplo, por el ensayo de inhibición de crecimiento de neuritas descrito aquí.

Aislado

El término "aislado", tal como en la proteína de unión a RGMa aislada, significa que se identifica, y se separa y/o se recupera de los componentes en su estado natural. Las impurezas en estado natural son sustancias que pueden interferir con el uso diagnóstico o terapéutico del anticuerpo, incluyendo enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteicos. Generalmente, el aislamiento de la proteína de unión a RGMa o similar puede lograrse por al menos una etapa de purificación. La proteína de unión a RGMa purificada por al menos una etapa de purificación puede denominarse "proteína de unión a RGMa aislada".

Proteína de unión a RGMa

Como se usa en la presente memoria, el término "proteína de unión a RGMa" se refiere a una molécula que comprende una proteína que se une a RGMa. Ejemplos de las proteínas de unión a RGMa incluyen anticuerpos anti-RGMa y fragmentos de unión a antígeno de los mismos; Proteínas de andamio de unión a RGMa; proteínas del receptor RGMa solubles como el dominio extracelular de Neogenina; y proteínas de fusión de los mismos. El término "proteína de andamio de unión a RGMa" se refiere a una proteína que realiza la función de unión a RGMa mediante la introducción de mutaciones en el dominio de Kunitz de un inhibidor de serina proteasa, el dominio extracelular de fibronectina humana, anquirina, lipocalina o similares. El término "proteína de fusión" se refiere a proteínas de unión a RGMa unidas químicamente o genéticamente a moléculas de función distintas de la proteína de unión a RGMa de la presente solicitud, tales como polímeros no péptidos tales como polietilenglicol (PEG), sustancias radioactivas, toxinas, compuestos, citoquinas, factores de crecimiento (por ejemplo, TGF- β , NGF, neurotrofina),

albúmina, enzimas y otros anticuerpos.

Anticuerpo humano

El término “anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo en el que las cadenas ligera y pesada son ambas derivadas de inmunoglobulina humana. Dependiendo de la diferencia en regiones constantes de cadenas pesadas, los anticuerpos humanos incluyen IgG que tiene cadenas pesadas γ (incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgM que tiene cadenas pesadas μ , IgA que tiene cadenas pesadas α (incluyendo IgA1 e IgA2), IgD que tiene cadenas pesadas δ , o IgE que tiene cadenas pesadas ϵ . Las cadenas ligeras, en principio, comprenden cadenas κ o cadenas λ .

Anticuerpo humanizado

El término “anticuerpo humanizado” se refiere a un anticuerpo que comprende regiones variables que comprenden regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo derivado de un animal no humano y regiones de armazón derivadas de un anticuerpo humano y regiones constantes derivadas de un anticuerpo humano.

Anticuerpo quimérico

El término “anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo en el que la cadena ligera, la cadena pesada o ambas comprenden una región variable no derivada de humanos y una región constante derivada humana.

Anticuerpo anti-RGMa

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo anti-RGMa" se refiere a moléculas de inmunoglobulina que se unen a RGMa, o moléculas modificadas de la misma. Las moléculas modificadas incluyen anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos funcionalmente modificados y anticuerpos conjugados.

Anticuerpo multiespecífico

El término “anticuerpo multiespecífico” se refiere a un anticuerpo asimétrico que comprende dos o más sitios de reconocimiento de antígeno independientes que tienen dos o más especificidades de antígeno diferentes, incluyendo anticuerpo biespecífico que tiene dos especificidades de antígeno y anticuerpo trispecífico que tiene tres especificidades de antígeno.

Anticuerpo funcionalmente modificado

Tal como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo modificado funcionalmente" se refiere a un anticuerpo en el que se modifican las funciones distintas de la función de unión al antígeno del anticuerpo, incluyendo la función de eliminación de células, la función de activación del complemento y la función de prolongación de vida media del suero modificando principalmente la aminoácido o cadena de azúcar de la región Fc del anticuerpo.

Anticuerpo conjugado

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo conjugado" se refiere a un anticuerpo unido químicamente o genéticamente a moléculas de función distintas del anticuerpo tales como polímeros no peptídicos tales como polietilenglicol (PEG), sustancias radioactivas, toxinas, compuestos de bajo peso molecular, citoquinas, factores de crecimiento (por ejemplo, TGF- β , NGF, neurotrofina), albúmina y enzimas.

Fragmento de unión al antígeno

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "fragmento de unión al antígeno" se refiere a una proteína que comprende una parte de un anticuerpo y puede unirse a un antígeno. Ejemplos del fragmento de unión al antígeno incluyen F(ab')₂, Fab', Fab, Fv (fragmento variable de anticuerpo), Fv unido a disulfuro, anticuerpo monocatenario (scFv) y sus polímeros. Además, el fragmento de unión al antígeno incluye fragmentos de unión a antígenos conjugados unidos químicamente o genéticamente a moléculas de función distintas del anticuerpo anti-RGMA en la presente solicitud tales como polímeros no péptidos tales como polietilenglicol (PEG), sustancias radioactivas, toxinas, compuestos de bajo peso molecular, citocinas, factores de crecimiento (por ejemplo, TGF- β , NGF, neurotrofina), albúmina, enzimas y otros anticuerpos.

Región determinante de complementariedad

La expresión "región determinante de complementariedad (CDR)" se refiere a una región que forma un sitio de unión a antígeno en una región variable de una molécula de inmunoglobulina, que también se denomina región hipervariable, y se refiere particularmente a una porción en la que la secuencia de aminoácidos cambia mucho para cada molécula de inmunoglobulina. Como CDR, las cadenas ligera y pesada tienen cada una tres CDR (LCDR1, LCDR2, LCDR3 y HCDR1, HCDR2, HCDR3). En la presente solicitud, las CDR de una molécula de inmunoglobulina se determinan de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat

(Kabat et al., 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., NIH, EUA).

Porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos

"Porcentaje (%) de identidad" con respecto a la secuencia de polipéptido de referencia identificada, tal como región variable, se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos de una secuencia de polipéptido de referencia particular, después disponer las secuencias e introducir las brechas según sea necesario para obtener el porcentaje máximo de identidad y asumiendo que no se consideran sustituciones conservadoras parte de la identidad de secuencia. La alineación con el propósito de determinar el porcentaje de la identidad se puede lograr de diversas formas que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, utilizando el software de cómputo disponible públicamente como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros adecuados para alinear las secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los fines de la presente invención, se obtienen los valores de identidad porcentuales utilizando el programa informático BLAST de comparación de secuencias en alineaciones en pares.

En situaciones en las que BLAST se usa para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de una secuencia de aminoácidos A dada a una secuencia de aminoácidos dada B se calcula como sigue:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

en donde X es el número de residuos de aminoácidos registrados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencia Blast en la alineación del programa A y B, y en donde Y es un número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que en donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de la identidad de A a B no será igual al % de la identidad de B a A. A menos de que especifique lo contrario, todos los valores de % d identidad en la presente se obtienen usando el programa BLAST como se muestra en el párrafo inmediatamente anterior.

Competir

Como se usa en la presente memoria, el término "competir" con el anticuerpo anti-RGMA de la presente invención significa que, según se mide por la resonancia de plasmón superficial (SPR) descrita en el presente documento, la unión entre el anticuerpo anti RGMA de la presente invención y RGMA es disminuyó con una diferencia significativa debido a la presencia de dicho anticuerpo anti-RGMA o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

La presente invención será descrita con detalle a continuación.

Proteína de unión a RGMA

La proteína de unión a RGMA aislada de la presente invención es una proteína de unión a RGMA aislada que no inhibe la unión entre RGMA y neogenina pero neutraliza la actividad inhibidora del crecimiento neutrítico de RGMA.

Preferiblemente, las proteínas RGMA son proteínas RGMA derivadas de mamíferos.

Por ejemplo, las proteínas de la RGMA humana incluyen una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias, las proteínas de la RGMA de ratón incluyen una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias, y las proteínas de la RGMA de ratón incluyen una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 en el listado de secuencias. Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o varios (preferiblemente 1 a 20, más preferiblemente 1 a 10, aún más preferiblemente 1 a 5) aminoácidos en estas secuencias son sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos y que tienen sustancialmente el mismo actividad como proteína RGMA; o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 90% o más (preferiblemente 95% o más) de identidad con la secuencia de aminoácidos también puede ser preferida.

Tal como se usa en la presente memoria, un polipéptido "que tiene sustancialmente la misma actividad que la proteína RGMA" incluye cualquier polipéptido mientras el polipéptido tenga acción inhibidora de crecimiento neurítico.

La sustitución de aminoácidos es preferiblemente una sustitución conservadora. Tal como se utiliza en la presente memoria, "sustitución conservadora" significa sustituir un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido químicamente similar para no alterar sustancialmente la actividad del péptido. Por ejemplo, se incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo por otro residuo hidrófobo, la sustitución de un residuo polar por otro residuo polar que tiene la misma carga eléctrica, y similares. Ejemplos de aminoácidos funcionalmente similares con los que tal sustitución es posible incluyen, como aminoácidos no

polares (hidrófobos), alanina, valina, isoleucina, leucina, prolina, triptófano, fenilalanina y metionina. Ejemplos de aminoácidos polares (neutros) incluyen glicina, serina, treonina, tirosina, glutamina, asparagina, cisteína y similares. Ejemplos de aminoácidos de carga positiva (básico) incluyen los aminoácidos arginina, lisina e histidina. Ejemplos de aminoácidos de carga negativa (ácidos) incluyen ácido glutámico y ácido aspártico.

La unión de la proteína de unión a RGMA de la presente invención a RGMA significa la unión específica de RGMA. Más preferida es una proteína de unión a RGMA que tiene una constante de disociación (K_d) baja para la RGMA humana, por ejemplo, de 10^{-8} M o menos, más preferiblemente 10^{-9} M o menos, aún más preferiblemente 10^{-10} M o menos como el valor límite superior y, por ejemplo, sin limitación, de 10^{-14} M o más, más preferiblemente 10^{-13} o más como valor límite inferior.

La proteína RGMA comprende un dominio N-terminal y un dominio C-terminal como una proteína madura, pero tiene actividad inhibidora de crecimiento neurítico con el dominio C-terminal solo. La proteína de unión a RGMA de la presente invención se une preferiblemente solamente al dominio C-terminal de RGMA para neutralizar la actividad inhibidora de crecimiento de neuritas. Más preferida es una proteína de unión a RGMA que tiene una baja constante de disociación (K_d) para el dominio C-terminal de RGMA humano, por ejemplo, de 10^{-8} M o menos, más preferiblemente 10^{-9} M o menos, aún más preferiblemente 10^{-10} M o menos como el valor límite superior y, por ejemplo, sin limitación, de 10^{-14} M o más, más preferiblemente 10^{-13} o más como valor límite inferior.

La proteína de unión a RGMA de la presente invención no inhibe la unión entre RGMA y neogenina. En este caso, la frase "no inhibe la unión entre RGMA y neogenina" significa que, en el sistema de unión de RGMA y neogenina mostrada en los Ejemplos descritos más adelante, incluso cuando la concentración de proteína de unión a RGMA aumenta, la unión entre RGMA y neogenina es no disminuyó sustancialmente. Por ejemplo, en el caso en el que la proteína de unión a RGMA se añade al sistema de unión de RGMA y neogenina y su concentración aumenta, si la concentración de la proteína de unión a RGMA que muestra CI50 no es inferior a 10 μ g/ml, más preferiblemente no menos de 50 μ g/ml, lo más preferiblemente no menos de 100 μ g/ml, se puede decir que la proteína de unión a RGMA no inhibe la unión entre RGMA y neogenina.

La neogenina usada para el ensayo de unión con RGMA es preferiblemente neogenina del mismo tipo que RGMA. En otras palabras, prefiere que se use neogenina de ratón o humana para RGMA de ratón o humana, respectivamente. Un ejemplo de neogenina humana incluye una proteína que tiene

la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10 en el listado de secuencias. Sin embargo, siempre y cuando sea capaz de unirse a RGMA, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de 90% o más (preferiblemente 95% o más) con SEQ ID NO: 10 en el listado de secuencias se puede preferir.

La proteína de unión a RGMA de la presente invención neutraliza la actividad inhibidora de crecimiento de neuritas de RGMA. La actividad inhibidora del crecimiento de las neuritas puede evaluarse mediante un ensayo de crecimiento neurítico mostrado en los Ejemplos descritos más adelante. La adición de RGMA inhibe la proliferación de neuritas, pero la adición de proteína de unión a RGMA previene la inhibición de la proliferación de neuritas por RGMA. La proteína de unión a RGMA de la presente invención puede neutralizar la inhibición de crecimiento de neuritas mediante la adición de RGMA en 50% o más, más preferiblemente en 80% o más y lo más preferiblemente en 90% o más.

Dado que las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la RGMA varían dependiendo de la especie animal, también hay diferencias en la secuencia de aminoácidos entre la RGMA humana representada por la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias y la RGMA de ratón representada por SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias y la RGMA de rata representada por SEQ ID NO: 3 en el listado de secuencias. Dado que los roedores tales como ratones y ratas se usan generalmente como materiales experimentales en ensayos farmacológicos y de seguridad de preparaciones de proteínas tales como preparaciones de anticuerpos, la proteína de unión a RGMA de la presente invención se une preferiblemente a RGMA de ratón y/o rata y más preferidas son aquellas con un Kd bajo para RGMA de ratón y/o rata. Proteínas de unión a RGMA cuyo Kd tiene el límite superior de, por ejemplo, 5×10^{-7} M o menos, más preferiblemente 10^{-8} M o menos, aún más preferiblemente 10^{-9} M o menos, y el valor límite inferior de, por ejemplo, sin limitación, 10^{-12} M o más, más preferiblemente 10^{-11} o más.

La proteína de unión a RGMA de la presente invención es preferiblemente excelente en la estabilidad térmica. La estabilidad térmica puede evaluarse por una disminución en la unión con RGMA mediante tratamiento térmico y la proteína de unión a RGMA de la presente invención es preferiblemente estable incluso por tratamiento térmico a 60°C o más, más preferiblemente incluso por tratamiento térmico a 65°C o superior, lo más preferiblemente incluso por tratamiento térmico a 70°C o superior.

El sitio de unión cuando la proteína de unión a RGMA de la presente invención se une a RGMA no está particularmente limitado. Por ejemplo, en RGMA humana, se prefiere la unión a uno o más de los siguientes péptidos: EEVVNAVEDWDSQG (SEQ ID NO: 26 en el listado de secuencias) (números de

aminoácidos 298-311 de SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias), NQQIDFQAFHTNAE (SEQ ID NO: 27 en el listado de secuencias) (números de aminoácidos 322-335 de SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias), PTAPETFPYET (SEQ ID NO: 28 en el listado de secuencias) (números de aminoácidos 349-359 de SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias), KLPVEDLYYQA (SEQ ID NO: 29 en el listado de secuencias) (números de aminoácidos 367-377 de SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias). La proteína de unión a RGMA de la presente invención se une más preferiblemente a las SEQ ID NO: 26 y 27 del listado de secuencias, más preferiblemente a las SEQ ID NO: 26 y 27 del listado de secuencias, y a las SEQ ID NO: 28 y 29 en el listado de secuencias.

Ejemplos específicos de proteína de unión a RGMA incluyen anticuerpo anti-RGMA, proteína de andamio de unión a RGMA y proteínas de fusión de los mismos.

Anticuerpo anti-RGMA

El anticuerpo anti-RGMA de la presente invención incluye anticuerpos policlonales o monoclonales obtenidos utilizando la proteína RGMA o un fragmento parcial de la misma (por ejemplo, un fragmento que contiene una o más de las SEQ ID NOS: 26 a 29 en la lista de secuencias anterior) como un antígeno y mamíferos inmunizantes tales como ratones con los antígenos; anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados producidos usando tecnología de recombinación génica; anticuerpos humanos producidos utilizando, por ejemplo, animales transgénicos productores de anticuerpos humanos; y similares. Cuando el anticuerpo de la presente invención se administra como un fármaco a seres humanos, es preferible un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano desde el punto de vista de los efectos secundarios.

Los antígenos pueden usarse directamente para la inmunización o pueden usarse como un complejo con una proteína portadora. Para preparar un complejo de un antígeno y una proteína portadora, se pueden usar agentes de condensación tales como glutaraldehído, carbodiimida y éster activo de maleimida. Ejemplos de la proteína portadora incluyen albúmina sérica bovina, tiroglobulina, hemocianina y KLH.

Los ejemplos de mamíferos a inmunizar incluyen ratones, ratas, hámsteres, cobayas, conejos, gatos, perros, cerdos, cabras, caballos y ganado, y los métodos de inoculación incluyen administración subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. Tras la administración, los antígenos se pueden administrar en mezcla con adyuvante de Freund completo o adyuvante de Freund incompleto, y la administración se lleva a cabo habitualmente una vez cada 2 a 5 semanas. Las

células productoras de anticuerpos obtenidas del bazo o ganglios linfáticos de los animales inmunizados se fusionan con células de mieloma y se aíslan como hibridomas. Como células de mieloma, se utilizan las derivadas de un mamífero tales como ratón, rata o humano.

Anticuerpo policlonal

Los anticuerpos policlonales pueden obtenerse mediante métodos de producción comunes existentes. Es decir, se pueden obtener anticuerpos policlonales a partir de suero obtenido de animales sometidos a inmunización, por ejemplo, mediante la inmunización de un mamífero como se ha descrito anteriormente con un antígeno como se ha descrito anteriormente junto con adyuvante de Freund según sea necesario.

Anticuerpo monoclonal

Específicamente, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener como sigue. Es decir, se usa como inmunógeno un antígeno como se ha descrito anteriormente, y el inmunógeno se inyecta o transplanta una o varias veces en combinación con el adyuvante de Freund, si es necesario, a un mamífero como se ha descrito anteriormente por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitonealmente para la inmunización. Generalmente, la inmunización se realiza 1 a 4 veces cada 1 a 14 días desde la inmunización inicial, y se obtienen células productoras de anticuerpos del mamífero inmunizado de aproximadamente 1 a 5 días después de la inmunización final.

Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley and Sons (1987)), Antibodies: A Laboratory Manual, Ed. Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))).

La preparación de anticuerpos monoclonales que secretan "hibridomas" puede llevarse a cabo de acuerdo con el método de Köhler y Milstein et al. (Nature, 256, 495, 1975) y métodos similares a los mismos. Es decir, los hibridomas se preparan fusionando una célula productora de anticuerpos contenida en un bazo o similar obtenida de un mamífero inmunizado con una célula de mieloma que no tiene capacidad de producción de autoanticuerpos derivada de un mamífero, preferiblemente ratón, rata o humano.

Los ejemplos de células de mieloma que pueden usarse para la fusión celular incluyen mieloma derivado de ratón P3/X63-AG8.653 (653), P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1), P3/X63-Ag8.U1 (P3U1), SP2/O-Ag14 (Sp2/O, Sp2), PAI, F0 y BW5147, mieloma derivado de rata 210RCY3-Ag.2.3., y mieloma derivado de humano U-

266AR1, GM1500-6TG-A1-2, UC729-6, CEM-AGR, D1R11 y CEM-T15.

Ejemplos de aceleradores de fusión incluyen polietilenglicol y similares. En general, las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma en una proporción numérica de usualmente aproximadamente 1: 1 a 10: 1 se dejan reaccionar, usando polietilenglicol (peso molecular medio: 1000 a 4000) a una concentración de aproximadamente 20 a 50%, a una temperatura de 20 a 40°C, preferiblemente de 30 a 37°C durante aproximadamente 1 a 10 minutos, con lo que se puede llevar a cabo la fusión celular.

La selección de clones de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales puede llevarse a cabo cultivando los hibridomas, por ejemplo, en placas de microtitulación y midiendo la reactividad de los sobrenadantes de cultivo en los pocillos al inmunógeno por métodos inmunoquímicos tales como ELISA.

En el cribado de los hibridomas productores de anticuerpos, además del ensayo de unión con la proteína RGMa, si el anticuerpo no inhibe la unión entre la proteína RGMa y la neogenina y si el anticuerpo neutraliza la función de la proteína RGMa (actividad inhibidora del crecimiento de las neuritas) también evaluado. Estos métodos de selección permiten la selección del anticuerpo anti-RGMa de la presente invención.

Los clones se pueden obtener adicionalmente a partir de los pocillos que contienen hibridomas produciendo los anticuerpos deseados por clonación usando dilución limitante. La selección y reproducción de hibridomas se llevan a cabo habitualmente en un medio de cultivo de células animales que contiene 10 a 20% de suero bovino fetal suplementado con HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina).

Los anticuerpos monoclonales de hibridomas pueden producirse cultivando los hibridomas in vitro o cultivándolos in vivo, por ejemplo, en fluido ascítico de mamíferos tales como ratones y ratas y aislando anticuerpos monoclonales del sobrenadante de cultivo resultante o del fluido ascítico del mamífero.

Cuando se cultivan in vitro, los hibridomas se cultivan, mantienen y almacenan de acuerdo con diversas condiciones tales como las características y el método de cultivo para las especies de células a cultivar, y un medio nutriente adecuado para producir anticuerpos monoclonales en el sobrenadante de cultivo puede ser usado.

Ejemplos de medios básicos incluyen un medio de bajo contenido de calcio tal como el medio F12 de Ham, medio MEM MCDB 153 o bajo de calcio y un medio de alto contenido en calcio tal como medio MCDB 104, medio MEM, medio D-MEM, medio RPMI 1640, ASF 104 medio o medio RD. Los medios básicos pueden

contener, por ejemplo, suero, hormonas, citocinas y/o diversas sustancias inorgánicas u orgánicas según el propósito.

Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse y purificarse, por ejemplo, sometiéndolo al sobrenadante de cultivo o fluido ascítico antes mencionado a sulfato de amonio saturado, método de precipitación con euglobulina, método de ácido caproico, método de ácido caprílico, cromatografía de intercambio iónico (tal como DEAE o DE52) o cromatografía en columna de afinidad tal como columna de anti-inmunoglobulina o cromatografía en columna de proteína A. Específicamente, la purificación del anticuerpo monoclonal puede llevarse a cabo por cualquier método conocido como método de purificación de inmunoglobulina, y puede conseguirse fácilmente mediante medios tales como fraccionamiento con sulfato de amonio, fraccionamiento PEG, fraccionamiento con etanol y cromatografía de afinidad utilizando un intercambiador aniónico y usando proteínas de la RGMa.

Los anticuerpos monoclonales también pueden obtenerse mediante un método de presentación de fagos. En el método de presentación en fagos, se seleccionan fagos seleccionados de una biblioteca de anticuerpos de fago opcional usando el inmunógeno deseado y se seleccionan fagos que tienen la capacidad de unión deseada al inmunógeno. A continuación, se aísla o secuencia la secuencia correspondiente al anticuerpo contenida en el fago y se construye un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un dominio de unión al antígeno basado en la secuencia aislada o la información de secuencia determinada. Finalmente, se pueden producir anticuerpos monoclonales cultivando líneas celulares transfectadas con tales vectores de expresión. Se puede usar una biblioteca de anticuerpos humanos como una biblioteca de anticuerpos fágicos para generar anticuerpos humanos que tienen propiedades de unión deseadas.

Como una proteína de andamio, por ejemplo, se utilizan un dominio de Kunitz del inhibidor de serina proteasa humana y un dominio extracelular de fibronectina humana y la secuencia de un sitio de unión de diana en el armazón puede modificarse para generar una proteína de andamio que se une a RGMa Clifford Mintz y otros BioProcess International, 2013, Vol.11 (2), pp40-48).

Las proteínas de fusión incluyen proteínas de unión a RGMa unidas químicamente o genéticamente a moléculas de función distintas de la proteína de unión a RGMa de la presente solicitud, tales como polímeros no péptidos tales como polietilenglicol (PEG), sustancias radioactivas, toxinas, compuestos, citocinas, factores de crecimiento (por ejemplo, TGF- β , NGF, neurotrofina), albúmina, enzimas y otros anticuerpos.

Cuando PEG está unido como una molécula funcional, se puede usar PEG que tiene un peso molecular de, sin limitación, de 2,000 a 100,000 Da, más preferiblemente de 10,000 a 50,000 Da, que puede ser lineal o ramificado. Usando, por ejemplo, un grupo activo de NHS, el PEG puede unirse, por ejemplo, a grupos amino N-terminales de aminoácidos de la proteína de unión a RGMA.

En el caso de utilizar una sustancia radioactiva como una molécula funcional, por ejemplo, se utiliza ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{64}Cu , ^{99}Tc , ^{77}Lu o ^{211}At . Las sustancias radioactivas pueden unirse directamente a la proteína de unión a RGMA mediante, por ejemplo, el método de cloramina-T.

Cuando se usa una toxina como molécula funcional, por ejemplo, se usan toxinas bacterianas (por ejemplo, toxina diftérica), fitotoxinas (por ejemplo, ricina), pequeñas toxinas (por ejemplo, geldanamicina), maytansinoides y caliqueamicina.

Cuando se usa un compuesto de bajo peso molecular como molécula funcional, se usan por ejemplo daunomicina, doxorubicina, metotrexato, mitomicina, neocarzinostatina, vindesina y tintes fluorescentes tales como FITC.

Cuando se usa una enzima como molécula funcional, por ejemplo, luciferasa (por ejemplo luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Pat de EE.UU. No. 4,737,456) se utilizan deshidrogenasa de malato, ureasa, peroxidasa (peroxidasa de rábano picante (HRPO)), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasa (por ejemplo, la glucosa oxidasa, la galactosa oxidasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasa heterocíclica (por ejemplo, uricasa y xantina oxidasa), la lactoperoxidasa y microperoxidasa.

Ejemplos de enlazadores utilizados para unir químicamente una toxina, un compuesto de bajo peso molecular o una enzima incluyen radicales divalentes (por ejemplo, alquileo, arileno, heteroarileno), una unidad de repetición de un enlazador o alcoxi representado por $-(\text{CR}_2)_n\text{O}(\text{CR}_2)_n-$ (en donde R es un sustituyente opcional, y n es un entero positivo) (por ejemplo, polietilenoxi, PEG y polimetilenoxi) y alquilamino (por ejemplo, polietilenamino, JeffamineTM) y un éster y amida de diácido (por ejemplo succinato, succinamida, diglicolato, malonato y caproamida). Los métodos de modificación química para la unión de moléculas funcionales ya se han establecido en este campo (DJKing., Aplicaciones e Ingeniería de anticuerpos monoclonales., 1998 TJ International Ltd, Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer., 1998 Marcel Dekker Inc; Chari et al., Cancer Res., 1992 Vol152:127; Liu et al., Proc Natl Acad Sci USA., 1996 Vol 93:8681).

Una modalidad preferida de la proteína de unión a RGMA de la presente invención es un anticuerpo quimérico. Como el "anticuerpo quimérico", un anticuerpo quimérico en el que la región variable es una región variable derivada de

una inmunoglobulina de un animal no humano (tal como ratón, rata, hámster o pollo) y la región constante es una región constante de humano se ejemplifica la inmunoglobulina. Un anticuerpo quimérico puede prepararse, por ejemplo, inmunizando un ratón con un antígeno, cortando una región variable que se une al antígeno del gen que codifica el anticuerpo monoclonal de ratón, y combinando la región variable con una región constante de un anticuerpo derivado de la médula ósea humana. La región constante derivada de la inmunoglobulina humana tiene una secuencia de aminoácidos única dependiendo del isotipo tal como IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgM, IgA (IgA1 e IgA2), IgD e IgE, pero la región constante del anticuerpo quimérico recombinante de acuerdo con la presente invención puede ser una región constante de inmunoglobulina humana perteneciente a cualquier isotipo. La región constante es preferiblemente una región constante de IgG humana. Se puede preparar un vector de expresión utilizando el gen del anticuerpo quimérico así preparado. Las células huésped se transforman con el vector de expresión para obtener células transformantes quiméricas productoras de anticuerpos, y luego las células transformadas se cultivan para obtener el anticuerpo quimérico deseado a partir del sobrenadante del cultivo.

Otra modalidad preferida de la proteína de unión a RGMA de la presente invención es un anticuerpo humanizado. El "anticuerpo humanizado" en la presente invención es un anticuerpo obtenido por injerto sólo de la secuencia de ADN del sitio de unión al antígeno (CDR, región determinante de complementariedad) de un anticuerpo animal no humano tal como ratón a un gen de anticuerpo humano (injerto de CDR). Los anticuerpos humanizados se pueden preparar haciendo referencia a los métodos descritos, por ejemplo, en la Solicitud de Patente PCT Japonesa traducida abierta N° Hei 4-506458 y en la Patente Japonesa No. 2912618. Específicamente, se contempla un anticuerpo humanizado caracterizado porque parte o todas las CDR son CDR derivadas de anticuerpos monoclonales de mamíferos no humanos (tales como ratón, rata y hámster), que las regiones de armazón de la región variable son regiones estructurales de variables regiones derivadas de la inmunoglobulina humana, y que las regiones constantes son regiones constantes derivadas de la inmunoglobulina humana.

El anticuerpo humanizado de la presente invención se puede producir, por ejemplo, como sigue, pero no hace falta decir que el método de producción no está limitado a ello.

Por ejemplo, se puede producir un anticuerpo humanizado recombinante derivado de un anticuerpo monoclonal de ratón mediante ingeniería genética con referencia a la solicitud de patente PCT japonesa traducida, abierta con los números de solicitud Hei 4-506458 y Sho 62-296890. Es decir, el ADN que

codifica la porción CDR de la cadena pesada del ratón y el ADN que codifica la porción CDR de la cadena ligera de ratón se aíslan a partir de hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal de ratón y un gen de cadena pesada humano que codifica toda la región distinta de CDR de cadena pesada humana y un el gen de cadena ligera humano que codifica para toda la región distinta de CDR de la cadena ligera humana se aísla de un gen de inmunoglobulina humana.

El gen de cadena pesada humano al que se injerta el ADN aislado que codifica para la porción de CDR de cadena pesada de ratón se introduce en un vector de expresión apropiado de modo que sea posible su expresión. De manera similar, el gen de la cadena ligera humana al que se injerta el ADN que codifica para la porción de CDR de la cadena ligera de ratón se introduce en otro vector de expresión apropiado de modo que sea posible su expresión. Alternativamente, los genes de cadena pesada y ligera humanos a los que se injerta la CDR de ratón pueden introducirse en el mismo vector de expresión de manera que su expresión sea posible. Las células huésped se transforman con el vector de expresión así preparado para obtener células transformantes humanizadas productoras de anticuerpos, y luego las células transformadas se cultivan para obtener el anticuerpo humanizado deseado a partir del sobrenadante del cultivo.

Otra modalidad preferida de la proteína de unión a RGMA de la presente invención es un anticuerpo humano. Un anticuerpo humano se refiere a un anticuerpo en el que todas las regiones incluyendo regiones variables de cadena pesada y regiones constantes de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera y regiones constantes de cadena ligera que constituyen la inmunoglobulina derivan de genes que codifican inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanos pueden prepararse introduciendo genes de anticuerpos humanos en ratones. Los anticuerpos humanos pueden producirse de la misma manera que el método antes mencionado para preparar anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales, específicamente, por ejemplo, mediante la inmunización de un animal transgénico preparado mediante la integración de al menos genes de inmunoglobulina humana en un locus genético de un mamífero distinto de un ser humano tal como un ratón.

Por ejemplo, los ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos pueden prepararse de acuerdo con los métodos descritos, por ejemplo, en Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997; Japanese Translated PCT Patent Application Laid-open Nos. Hei 4-504365 and Hei 7-509137; WO 94/25585; Nature, Vol.368, p.856-859, 1994; y Japanese Translated PCT Patent Application Laid-open No. Hei 6-500233. Ejemplos específicos de ratones transgénicos incluyen ratones HuMabTM (Medarex, Princeton NJ), ratón KMTM (Kirin Pharma Company, Japón) y ratón KM (FCγRIIb-KO).

Ejemplos específicos del anticuerpo monoclonal de la presente invención incluyen aquellos en los que las CDR en la región variable de la cadena pesada comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 33 (HCDR1), 34 (HCDR2) y 35 (HCDR3) en el Listado de Secuencias y en las que las CDR en la región variable de la cadena ligera comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 30 (LCDR 1), 31 (LCDR 2) y 32 (LCDR 3) en el listado de secuencias. Uno o varios aminoácidos en una o más de las CDR pueden estar sustituidos siempre y cuando las propiedades del anticuerpo de la presente invención tengan la capacidad de unirse a RGMA, no inhibir la unión entre RGMA y neogenina y neutralizar el crecimiento de neuritas actividad inhibidora de RGMA. Uno a varios medios, por ejemplo, uno o dos. La sustitución de aminoácidos es preferentemente una sustitución conservadora con el fin de mantener las propiedades de la presente invención. Mantener las propiedades del anticuerpo significa que estas propiedades se mantienen en el mismo grado, por ejemplo, 80% o más, preferiblemente 90% o más, más preferiblemente 95% o más en comparación con las propiedades antes de las modificaciones de la secuencia de aminoácidos de CDR. El mantenimiento también incluye mejoras.

La región distinta de las CDR no está particularmente limitada, siempre y cuando sea una secuencia que pueda mantener la estructura como un anticuerpo y ejercer su función, y puede ser cualquiera de las secuencias derivadas de ratones, humanos y otros mamíferos, secuencias quiméricas de los mismos, y secuencias artificiales. En el caso de que comprende una región constante, las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes en cadena pesada y cadena ligera se ejemplifican por las descritas en Nucleic Acids Research vol.14, p1779, 1986, The Journal of Biological Chemistry vol. 257, p1516, 1982 y Cell vol.22, p197, 1980.

Ejemplos de anticuerpos de ratón que tienen estas CDR incluyen anticuerpos en los que la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 en el listado de secuencias y en la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 en el listado de secuencias. En estas secuencias de aminoácidos, puede haber sustitución, supresión, adición o inserción de uno o varios aminoácidos (1 a 20, 1 a 10 o 1 a 5) siempre y cuando se mantengan las propiedades del anticuerpo de tener la capacidad de unirse a RGMA, que no inhibe la unión entre RGMA y neogenina, y la neutralización de la actividad inhibitoria de crecimiento de neuritas de RGMA. Dicha sustitución, supresión o adición se pueden introducir en CDR, pero se introduce preferiblemente en una región distinta de las CDR. La sustitución de aminoácidos es preferentemente una sustitución conservadora con el fin de mantener las propiedades de la presente invención.

También se incluyen anticuerpos quiméricos de ratón/humano en los que se derivan regiones constantes en el anticuerpo de ratón anteriormente mencionado de humanos. Un ejemplo de tales anticuerpos quiméricos de ratón/humano es un anticuerpo en el que la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 en el Listado de Secuencias (la región variable se extiende de 1 a 107) y en el que la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 en el Listado de Secuencias (la región variable se extiende de 1 a 116). En estas secuencias de aminoácidos, puede haber sustitución, supresión, adición o inserción de uno o varios aminoácidos (1 a 20, 1 a 10 o 1 a 5) siempre y cuando se mantengan las propiedades del anticuerpo de tener la capacidad de unirse a RGMA, que no inhibe la unión entre RGMA y neogenina, y la neutralización de la actividad inhibitoria de crecimiento de neuritas de RGMA. Dicha sustitución, supresión o adición se pueden introducir en CDR, pero se introduce preferiblemente en una región distinta de las CDR. La sustitución de aminoácidos es preferentemente una sustitución conservadora con el fin de mantener las propiedades de la presente invención.

Además, se ejemplifican los anticuerpos humanizados en los que la región distinta a las CDR se deriva de humanos. Un ejemplo de tales anticuerpos humanizados es un anticuerpo en el que la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 11 a 18 (la región variable es hasta el 116º residuo en el lado N terminal) y en la que la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 19-25 en el Listado de Secuencias (la región variable se extiende desde el 1er al 107º residuo en el lado N-terminal).

En las secuencias de aminoácidos del anticuerpo humanizado (cadena pesada: SEQ ID NO: 11-18 en el listado de secuencias, cadena ligera: SEQ ID NO: 19 a 25 en el Listado de Secuencias), puede haber sustitución, supresión, adición o inserción de uno o varios aminoácidos (1 a 20, 1 a 10 o 1 a 5) siempre que las propiedades del anticuerpo tengan la capacidad de se unen a RGMA, no inhiben la unión entre RGMA y neogenina, y se mantiene la neutralización de la actividad inhibidora de crecimiento de neuritas de RGMA. Dicha sustitución, supresión o adición se pueden introducir en CDR, pero se introduce preferiblemente en una región distinta de las CDR. La sustitución de aminoácidos es preferentemente una sustitución conservadora con el fin de mantener las propiedades de la presente invención.

La secuencia de aminoácidos de cadena pesada y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera pueden ser cualquier combinación de los mismos, pero se prefiere particularmente un anticuerpo que tiene cadenas pesadas que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 en el listado de

secuencias y las cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 en el listado de secuencias. En la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 en el listado de secuencias, la secuencia de aminoácidos correspondiente a la región variable de la cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 41 en el listado de secuencias, la secuencia de aminoácidos correspondiente a la región variable de la cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 42 en el listado de secuencias. De este modo, el anticuerpo particularmente preferido de la presente invención es un anticuerpo en el que la región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 en el listado de secuencias y en la que la región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO 42 en el listado de secuencias.

En estas secuencias de aminoácidos, puede haber sustitución, supresión, adición o inserción de uno o varios aminoácidos (1 a 20, 1 a 10 o 1 a 5) siempre y cuando se mantengan las propiedades del anticuerpo de tener la capacidad de unirse a RGMA, que no inhibe la unión entre RGMA y neogenina, y la neutralización de la actividad inhibitoria de crecimiento de neuritas de RGMA. Dicha sustitución, supresión o adición se pueden introducir en CDR, pero se introduce preferiblemente en una región distinta de las CDR. La sustitución de aminoácidos es preferentemente una sustitución conservadora con el fin de mantener las propiedades de la presente invención.

En la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la presente invención que comprende la sustitución, supresión o similar en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y/o 42 en el Listado de Secuencias como se ha descrito anteriormente, la región variable de cadena pesada es una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 90% o más (más preferiblemente del 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más) con SEQ ID NO: 41 del listado de secuencias y la región variable de cadena ligera es una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de 90% o más (más preferiblemente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más) con SEQ ID NO: 42 en el listado de secuencias.

Otros ejemplos específicos del anticuerpo monoclonal de la presente invención incluyen aquellos en los que las CDR en la región variable de la cadena pesada comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 39 (HCDR1), 40 (HCDR2) y 35 (HCDR3) en el Listado de Secuencias y en las que las CDR en la región variable de la cadena ligera comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 36 (LCDR 1), 37 (LCDR 2) y 38 (LCDR 3) en el listado de secuencias. Uno o varios aminoácidos en una o más de las CDR pueden estar sustituidos siempre y cuando las propiedades del anticuerpo de la presente invención tengan la capacidad de unirse a RGMA, no inhibir la unión entre RGMA y

neogenina y neutralizar el crecimiento de neuritas actividad inhibidora de RGMA.

Uno a varios medios, por ejemplo, uno o dos. La sustitución de aminoácidos es preferentemente una sustitución conservadora con el fin de mantener las propiedades de la presente invención.

La región distinta de las CDR no está particularmente limitada, siempre y cuando sea una secuencia que pueda mantener la estructura como un anticuerpo y ejercer su función, y puede ser cualquiera de las secuencias derivadas de ratones, humanos y otros mamíferos, secuencias quiméricas de los mismos, y secuencias artificiales. En el caso de que comprende una región constante, las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes en cadena pesada y cadena ligera se ejemplifican por las descritas en Nucleic Acids Research vol.14, p1779, 1986, The Journal of Biological Chemistry vol. 257, p1516, 1982 y Cell vol.22, p197, 1980.

Ejemplos de anticuerpos de ratón que tienen estas CDR incluyen anticuerpos en los que la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 en el listado de secuencias y en la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 en el listado de secuencias. En estas secuencias de aminoácidos, puede haber sustitución, supresión, adición o inserción de uno o varios aminoácidos (1 a 20, 1 a 10 o 1 a 5) siempre y cuando se mantengan las propiedades del anticuerpo de tener la capacidad de unirse a RGMA, que no inhibe la unión entre RGMA y neogenina, y la neutralización de la actividad inhibitoria de crecimiento de neuritas de RGMA. Dicha sustitución, supresión o adición se pueden introducir en CDR, pero se introduce preferiblemente en una región distinta de las CDR. La sustitución de aminoácidos es preferentemente una sustitución conservadora con el fin de mantener las propiedades de la presente invención.

Como el anticuerpo de ratón anteriormente mencionado, se incluyen también anticuerpos quiméricos cuyas regiones constantes se derivan de seres humanos. De incluyen los anticuerpos humanizados en los que la región distinta a las CDR se derivan de humanos.

El anticuerpo anti-RGMA de la presente invención incluye anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos funcionalmente modificados y anticuerpos conjugados que tienen CDR que comprenden secuencias de aminoácidos específicas (por ejemplo, secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 en el listado de secuencias para LCDR1, SEQ ID NO: 31 en el listado de secuencias para LCDR2, SEQ ID NO: 32 en el listado de secuencias para LCDR3, SEQ ID NO: 33 en el listado de secuencias para HCDR1, SEQ ID NO: 34 en el listado de secuencias para HCDR2 y SEQ ID NO: 35 en el listado de secuencias para HCDR3), o que tienen regiones variables que comprenden secuencias de aminoácidos específicas (por ejemplo, secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 en el listado de secuencias para

región variable de cadena pesada y SEQ ID NO: 42 para región variable de cadena ligera).

El anticuerpo anti-RGMA de la presente invención puede unirse a un anticuerpo que tiene otra especificidad de unión al antígeno distinta de la especificidad anti-RGMA mediante técnicas de ingeniería genética para preparar anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos. Las técnicas de ingeniería genética ya se han establecido en este campo. Por ejemplo, utilizando una técnica para DVD-Ig en la que regiones variables están conectadas en serie (Wu et al., *Nature Biotechnology* 25 (11), 1290 (2007)) o una técnica para ART-Ig en la que cadenas pesadas de dos tipos de anticuerpos que se unen a diferentes antígenos se combinan modificando la región Fc de un anticuerpo (Kitazawa et al., *Nature Medicine* 18 (10), 1570 (2012), se pueden obtener anticuerpos biespecíficos deseados. Otros antígenos diferentes a RGMA incluyen por ejemplo, factores que inhiben el crecimiento de neuritas tales como Nogo, MAG, Omgp, CSPG, Sema 3A y Lingo-1, y moléculas inmunorrelacionadas como TNF- α , receptor IL-6, CD3, CD20, α 4 integrina, BLys, linfopoyetina estromal tímica, IgE, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-17, IL-23 y IL-25.

Los anticuerpos funcionalmente modificados se ejemplifican como moléculas modificadas del anticuerpo anti-RGMA de la presente invención. Un anticuerpo modificado funcionalmente significa un anticuerpo en el que las funciones tales como la función de muerte celular, la función de activación del complemento y la función para prolongar la vida media de la sangre se modifican principalmente modificando la región Fc o similar (Shitara, *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, Ishii et al., *Nippon Yakubutsugaku Zasshi (Folia Pharmacologica Japonica)*, 2010, Vol.136 (5), pág. 280. Hashiguchi y col., *The Journal of Japanese Biochemical Society*, 2010, Vol. 129 (1), p. 82 (8), p710).

Los anticuerpos funcionalmente modificados del anticuerpo anti-RGMA se preparan mediante el siguiente método. Por ejemplo, cuando se produce el anticuerpo anti-RGMA de la presente solicitud usando, como células huésped, células CHO cuyo gen de α 1,6-fucosiltransferasa (FUT 8) ha sido interrumpido, se obtienen los anticuerpos con contenido reducido de fucosa de cadena de azúcar y aumento de la muerte celular y cuando se produce el anticuerpo anti-RGMA de la presente solicitud usando, como célula huésped, células CHO en las que se ha introducido el gen FUT8, se obtienen anticuerpos con baja función de muerte celular (WO 2005/035586, WO 2002 / 31140 y WO 00/61739). La función de activación del complemento puede regularse modificando los residuos de aminoácidos en la región Fc (Patentes de EE.UU. Nos: 6737056, 7297775 y 7317091). La extensión de la vida media de la sangre se puede lograr usando variantes de la región Fc con una

unión aumentada a FcRn que es uno de los receptores Fc (Hashiguchi y col., The Journal of Japanese Biochemical Society, 2010, vol.82 (8), p710). Estos anticuerpos funcionalmente modificados pueden producirse mediante técnicas de ingeniería genética.

Los anticuerpos conjugados se ejemplifican como moléculas modificadas del anticuerpo anti-RGMA de la presente invención. Ejemplos del anticuerpo conjugado incluyen anticuerpos conjugados en los que los anticuerpos anti-RGMA están unidos químicamente o genéticamente a moléculas de función distintas al anticuerpo anti-RGMA en la presente solicitud tales como polímeros no peptídicos tales como polietilenglicol (PEG), sustancias radioactivas, toxinas, compuestos de bajo peso molecular, citocinas, factores de crecimiento (por ejemplo, TGF- β , NGF, neurotrofina), albúmina, enzimas y otros anticuerpos.

Cuando PEG está unido como una molécula funcional, se puede usar PEG que tiene un peso molecular de, sin limitación, de 2,000 a 100,000 Da, más preferiblemente de 10,000 a 50,000 Da, que puede ser lineal o ramificado. Usando, por ejemplo, un grupo activo de NHS, el PEG puede unirse, por ejemplo, a grupos amino N-terminales de aminoácidos de anticuerpos.

En el caso de utilizar una sustancia radioactiva como una molécula funcional, por ejemplo, se utiliza ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{64}Cu , ^{99}Tc , ^{77}Lu o ^{211}At . Las sustancias radioactivas pueden unirse directamente a anticuerpos mediante, por ejemplo, el método de cloramina-T.

Cuando se usa una toxina como molécula funcional, por ejemplo, se usan toxinas bacterianas (por ejemplo, toxina diftérica), fitotoxinas (por ejemplo, ricina), pequeñas toxinas (por ejemplo, geldanamicina), maytansinoides y caliqueamicina.

Cuando se usa un compuesto de bajo peso molecular como molécula funcional, se usan por ejemplo daunomicina, doxorubicina, metotrexato, mitomicina, neocarzinostatina, vindesina y tintes fluorescentes tales como FITC.

Cuando se usa una enzima como molécula funcional, por ejemplo, luciferasa (por ejemplo luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Pat de EE.UU. No. 4,737,456) se utilizan deshidrogenasa de malato, ureasa, peroxidasa (peroxidasa de rábano picante (HRPO)), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasa (por ejemplo, la glucosa oxidasa, la galactosa oxidasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasa heterocíclica (por ejemplo, uricasa y xantina oxidasa), la lactoperoxidasa y microperoxidasa.

Ejemplos de enlazadores utilizados para unir químicamente una toxina, un compuesto de bajo peso molecular o una enzima incluyen radicales divalentes (por ejemplo, alquileo, arileno, heteroarileno), una unidad de repetición de un

enlazador o alcoxi representado por $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ (en donde R es un sustituyente opcional, y n es un entero positivo) (por ejemplo, polietilenoxi, PEG y polimetilenoxi) y alquilamino (por ejemplo, polietilenamino, JeffamineTM) y un éster y amida de diácido (por ejemplo succinato, succinamida, diglicolato, malonato y caproamida). Los métodos de modificación química para la unión de moléculas funcionales ya se han establecido en este campo (DJKing., Aplicaciones e Ingeniería de anticuerpos monoclonales., 1998 TJ International Ltd, Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer., 1998 Marcel Dekker Inc; Chari et al., Cancer Res., 1992 Vol152:127; Liu et al., Proc Natl Acad Sci USA., 1996 Vol 93:8681).

"Fragmentos de unión a antígeno" de anticuerpos en la presente invención significa una región parcial que tiene propiedad de unión a antígeno, de los anticuerpos descritos anteriormente, incluyendo, en particular, $F(ab')_2$, Fab', Fab, Fv (fragmento variable de anticuerpo), Fv unido a disulfuro, anticuerpo de cadena sencilla (scFv), y sus polímeros. Los fragmentos de unión al antígeno incluyen además fragmentos de unión a antígenos conjugados unidos químicamente o genéticamente a moléculas de función distintas del anticuerpo anti-RGMA en la presente solicitud tales como polímeros no péptidos tales como polietilenglicol (PEG), sustancias radioactivas, toxinas, compuestos de bajo peso molecular, citocinas, factores de crecimiento (por ejemplo, TGF- β , NGF, neurotrofina), albúmina, enzimas y otros anticuerpos.

Tal como se usa en la presente, " $F(ab')_2$ " y "Fab" significan fragmentos de anticuerpo que se producen tratando inmunoglobulinas con una proteasa pepsina o papaína y se generan por digestión corriente arriba y corriente abajo del enlace disulfuro existente entre dos cadenas pesadas en el región bisagra. Por ejemplo, el tratamiento con papaína de IgG puede provocar la escisión corriente arriba del enlace disulfuro existente entre dos cadenas pesadas en la región bisagra para producir dos fragmentos homólogos de anticuerpo que comprenden cada uno una cadena ligera que comprende una VL (región variable de cadena ligera) y un CL (región constante de cadena ligera) y un fragmento de cadena pesada que comprende una VH (región variable de cadena pesada) y una región CH γ 1 (región γ 1 dentro de la región constante de cadena pesada) en la que el fragmento de cadena ligera y de cadena pesada están enlazados entre sí a través de un enlace disulfuro en el dominio de extremo C. Cada uno de los dos fragmentos de anticuerpo homólogos se denomina Fab. El tratamiento con pepsina de IgG puede provocar la escisión corriente abajo del enlace disulfuro existente entre dos cadenas pesadas en la región bisagra para producir un fragmento de anticuerpo ligeramente mayor que uno en el que los dos Fab están unidos entre sí en la región bisagra. Este fragmento de anticuerpo se denomina $F(ab')_2$.

Los fragmentos conjugados de unión al antígeno se ejemplifican como moléculas modificadas del fragmento de unión al antígeno del anticuerpo anti-RGMA de la presente invención. Ejemplos del fragmento de unión al antígeno conjugado incluyen aquéllos en los que una región parcial que tiene la propiedad de unión al antígeno del anticuerpo anti-RGMA está unida químicamente o genéticamente a una molécula de función distinta del anticuerpo anti-RGMA en la presente solicitud, tal como polímeros no peptídicos tales como polietilenglicol (PEG), sustancias radioactivas, toxinas, compuestos de bajo peso molecular, citocinas, factores de crecimiento (por ejemplo, TGF- β , NGF, neurotrofina), albúmina, enzimas y otros anticuerpos.

Cuando PEG está unido como una molécula funcional, se puede usar PEG que tiene un peso molecular de, sin limitación, de 2,000 a 100,000 Da, más preferiblemente de 10,000 a 50,000 Da, que puede ser lineal o ramificado. El PEG puede unirse, por ejemplo, al grupo amino de extremo N de una región parcial que tiene la propiedad de unión al antígeno del anticuerpo anti-RGMA usando, por ejemplo, un grupo activo de NHS.

En el caso de usar una sustancia radioactiva como una molécula funcional, por ejemplo, ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{64}Cu , ^{99}Tc , ^{77}Lu o se utiliza ^{211}At . Las sustancias radioactivas pueden unirse directamente a una región parcial que tiene la propiedad de unión al antígeno del anticuerpo anti-RGMA mediante, por ejemplo, el método de cloramina-T.

Cuando se usa una toxina como molécula funcional, por ejemplo, se usan toxinas bacterianas (por ejemplo, toxina diftérica), fitotoxinas (por ejemplo, ricina), pequeñas toxinas (por ejemplo, geldanamicina), maytansinoides y caliqueamicina.

Cuando se usa un compuesto de bajo peso molecular como molécula funcional, se usan por ejemplo daunomicina, doxorubicina, metotrexato, mitomicina, neocarzinostatina, vindesina y tintes fluorescentes tales como FITC.

Cuando se usa una enzima como molécula funcional, por ejemplo, luciferasa (por ejemplo luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Pat de EE.UU. No. 4,737,456) se utilizan deshidrogenasa de malato, ureasa, peroxidasa (peroxidasa de rábano picante (HRPO)), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasa (por ejemplo, la glucosa oxidasa, la galactosa oxidasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasa heterocíclica (por ejemplo, uricasa y xantina oxidasa), la lactoperoxidasa y microperoxidasa.

Ejemplos de enlazadores utilizados para unir químicamente una toxina, un compuesto de bajo peso molecular o una enzima incluyen radicales divalentes (por ejemplo, alquilenos, arilenos, heteroarilenos), una unidad de repetición de un

enlazador o alcoxi representado por $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ (en donde R es un sustituyente opcional, y n es un entero positivo) (por ejemplo, polietilenoxi, PEG y polimetilenoxi) y alquilamino (por ejemplo, polietilenamino, JeffamineTM) y un éster y amida de diácido (por ejemplo succinato, succinamida, diglicolato, malonato y caproamida). Los métodos de modificación química para la unión de moléculas funcionales ya se han establecido en este campo (DJKing., Aplicaciones e Ingeniería de anticuerpos monoclonales., 1998 TJ International Ltd, Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer., 1998 Marcel Dekker Inc; Chari et al., Cancer Res., 1992 Vol152:127; Liu et al., Proc Natl Acad Sci USA., 1996 Vol 93:8681).

En el anticuerpo anti-RGMA que comprende CDR o regiones variables que tienen las secuencias de aminoácidos específicas de la presente invención, la región constante preferiblemente es una región constante de IgG humana (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) para mantenimiento con una vida media larga en sangre.

La presente invención también incluye un anticuerpo anti-RGMA que compite con el anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos de las CDR específicas como se ha descrito anteriormente para la unión a proteínas de la RGMA, y fragmentos de unión a antígeno de las mismas.

El anticuerpo que compite con el anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos de las CDR específicas como se ha descrito anteriormente para la unión a proteínas de la RGMA incluye epítopos en las regiones seleccionadas de Glu 298 a Gly 311, Asn 322 a Glu 335, Lys 367 a Ala 377 y Pro 349 a Thr 359.

El anticuerpo puede ser obtenido (tamizado) o evaluado permitiendo que el anticuerpo coexista en el sistema de unión del anticuerpo que tiene las secuencias CDR como se describió anteriormente y proteínas RGMA. Por ejemplo, el anticuerpo se puede obtener mediante cribado usando el siguiente método de resonancia de plasmón superficial (SPR).

La proteína de la RGMA humana biotinilada (4 µg/ml) como ligando se carga en un chip de sensor inmovilizado con avidina para inmovilizar proteínas de la RGMA humanas equivalentes a 1300 a 1600 RU. A continuación, se carga un anticuerpo anti-RGMA opcional (15 µg/mL) como un analito y se une a la proteína RGMA humana inmovilizada en el chip sensor. Repitiendo esto una pluralidad de veces, se crea un estado en el que el anticuerpo anti-RGMA opcional está unido a todas las moléculas de proteína de la RGMA humana en el chip de sensor (estado saturado) y se determina la cantidad de unión en estado saturado (enlace saturado cantidad 1).

Un experimento similar se lleva a cabo con el anticuerpo anti-RGMA que comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR específicas de la presente invención para determinar la cantidad de unión en el estado saturado

(cantidad de unión saturada 2).

A continuación, las proteínas de la RGMA humanas en el chip sensor están saturadas con el anticuerpo anti-RGMA que comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR específicas de la presente invención, y luego se carga un anticuerpo anti-RGMA opcional (15 µg/mL) para investigar si el anticuerpo anti-RGMA opcional se une adicionalmente a la proteína de la RGMA humana saturada con el anticuerpo anti-RGMA que comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR específicas de la invención.

Si el anticuerpo anti-RGMA opcional puede unirse adicionalmente a la proteína RGMA humana saturada con el anticuerpo anti-RGMA que comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR específicas de la invención mientras se muestra la cantidad de unión saturada 1 de un anticuerpo anti-RGMA opcional calculado anteriormente, entonces el anticuerpo se juzga como "no competir". Por otra parte, si el anticuerpo anti-RGMA opcional no puede unirse adicionalmente a la proteína de la RGMA humana saturada con el anticuerpo anti-RGMA que comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR específicas de la invención, entonces se juzga que el anticuerpo es "competidor". Incluso si el anticuerpo anti-RGMA opcional puede unirse adicionalmente a la proteína de la RGMA humana saturada con el anticuerpo anti-RGMA que comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR específicas de la invención, cuando la cantidad de unión añadida no alcanza la cantidad de unión saturada 1 con una diferencia significativa, entonces el anticuerpo se juzga como "competidor". Las diferencias significativas se examinan mediante métodos estadísticos generales (por ejemplo, la prueba t de Student), y el nivel de significación se fija en 5% o menos.

El anticuerpo anti-RGMA que compite con un anticuerpo anti-RGMA que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR específica como se ha descrito anteriormente para la unión con RGMA puede ser un anticuerpo derivado de cualquier animal tal como anticuerpo de ratón, humano, rata, conejo, cabra o camello, o puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado que es una combinación de estos anticuerpos, pero preferiblemente es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.

Moléculas de ácido nucleico de la presente invención

Ejemplos de la molécula de ácido nucleico de la presente invención incluyen polinucleótidos en los que la región que codifica una región variable de cadena pesada comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 33, 34 y 35 en el listado de secuencias, respectivamente (en el que uno o varios aminoácidos pueden estar sustituidos,

suprimidos, insertados o añadidos) y la región que codifica una región variable de cadena ligera comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, 31 y 32 en el listado de secuencias, respectivamente (en el que uno o varios aminoácidos pueden estar sustituidos, suprimidos, insertados o añadidos) y polinucleótidos en los que la región que codifica una región variable de cadena pesada comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 39, 40 y SFG en el listado de secuencias, respectivamente (en el que uno o varios aminoácidos pueden estar sustituidos, suprimidos, insertados o añadidos) y la región que codifica una región variable de cadena ligera comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 36, 37 y 38 en el listado de secuencias, respectivamente (en el que uno o varios aminoácidos pueden estar sustituidos, suprimidos, insertados o añadidos).

Otros ejemplos de la molécula de ácido nucleico de la presente invención incluyen polinucleótidos en los que la región que codifica una región variable de cadena pesada comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 en el listado de secuencias y la región que codifica una cadena ligera que comprende la secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 en el listado de secuencias; y polinucleótidos en los que la región que codifica una cadena pesada que comprende la secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 en el listado de secuencias y la región que codifica una cadena ligera que comprende la secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 en el listado de secuencias.

Otros ejemplos de la molécula de ácido nucleico de la presente invención incluyen polinucleótidos en los que la región que codifica una región variable de cadena pesada comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 en el listado de secuencias y la región que codifica una cadena ligera que comprende la secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 en el listado de secuencias.

Otros ejemplos de la molécula de ácido nucleico de la presente invención incluyen polinucleótidos en los que la región que codifica una cadena pesada comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 11 a 18 en el listado de secuencias y la región que codifica una cadena ligera que comprende la secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 19 a 25 en el listado de secuencias.

Ejemplos preferidos particularmente de la molécula de ácido nucleico de la presente invención incluyen polinucleótidos en los que la región que codifica una cadena pesada comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 en el listado de secuencias y la región que codifica una cadena ligera que comprende la secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 en el listado de secuencias.

Otros ejemplos de la molécula de ácido nucleico de la presente invención incluyen polinucleótidos en los que la región que codifica una región variable de cadena pesada comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 en el listado de secuencias y la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de base que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 en el listado de secuencias.

Ejemplos específicos de la molécula de ácido nucleico de la presente invención incluyen polinucleótidos en los que la región que codifica una región variable de cadena pesada comprende la secuencia de bases de SEQ ID NO: 43 en el listado de secuencias y la región que codifica una región de cadena ligera que comprende la base de la secuencia de SEQ ID NO: 44 en el listado de secuencias.

La molécula de ácido nucleico de la presente invención puede ser polinucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas a un ADN de cadena complementaria que tiene la secuencia de bases de SEQ ID NO: 43 en el Listado de Secuencias y polinucleótidos que hibridan bajo condiciones rigurosas con un ADN de cadena complementaria que tiene la secuencia de bases de SEQ ID NO: 44 en el listado de secuencias mientras la molécula de ácido nucleico de la presente invención codifique un anticuerpo monoclonal que tiene capacidad para unirse a RGMa, no inhibe la unión entre RGMa y neogenina y neutraliza la actividad inhibidora de crecimiento de neuritas de RGMa. Ejemplos de las condiciones rigurosas incluyen una condición para llevar a cabo la hibridación del sur y lavar a una concentración de sal correspondiente a 0.1 x SSC, SDS al 0.1% a 68°C.

La molécula de ácido nucleico de la presente invención puede codificar todas las regiones constantes y las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras, y puede codificar solamente las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras. La secuencia de bases de la región constante de cadenas pesada y ligera en el caso de codificar toda la región constante y la región variable es preferiblemente las descritas en Nucleic Acids Research vol.14, p1779, 1986, The Journal of Biological Chemistry vol.257, p1516, 1982 y Cell vol.22, p197, 1980.

La molécula de ácido nucleico de la presente invención puede obtenerse, por ejemplo, en el método siguiente. En primer lugar, el ARN total se prepara a partir de células tales como hibridomas utilizando un kit comercial de

extracción de ARN, y el cDNA se sintetiza con transcriptasa inversa utilizando cebadores aleatorios o similares. A continuación, los ADNc que codifican el anticuerpo se amplifican mediante un método de PCR usando, para cebadores, oligonucleótidos que tienen secuencias conservadas en las regiones variables de genes de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos humanos conocidos, respectivamente. Para la secuencia que codifica la región constante, puede obtenerse amplificando la secuencia conocida por el método PCR. La secuencia de bases del ADN se puede determinar por un método convencional, por ejemplo incorporándolo en un plásmido para la secuenciación.

Alternativamente, también se puede obtener un ADN que codifica el anticuerpo monoclonal de la presente invención sintetizando químicamente una secuencia de la región variable o una parte de la misma y uniéndola a una secuencia que comprende la región constante.

La presente invención también proporciona un vector recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico de la presente invención y un transformante (célula huésped) que comprende el vector recombinante. El vector recombinante puede ser vectores que se pueden expresar en células procariotas tales como *E. coli* (*Escherichia coli*) (por ejemplo, pBR322, pUC119 o un derivado del mismo), y preferiblemente son vectores que pueden expresarse en células eucariotas y más preferiblemente son vectores que pueden expresarse en células derivadas de mamíferos. Ejemplos de los vectores que pueden expresarse en células derivadas de mamíferos incluyen vectores plasmídicos tales como pcDNA 3.1 (Invitrogen), pConPlus, pcDM8, pcDNA I/Amp, pcDNA 3.1, pREP4; y vectores virales tales como ADN pDON-AI (Takara Bio). El vector puede ser un vector que comprende una secuencia codificadora de cadena pesada y una secuencia codificadora de cadena ligera o puede ser dos vectores de un vector que comprende una secuencia codificadora de cadena pesada y un vector que comprende una secuencia codificadora de cadena ligera.

El transformante en el que se introduce el vector recombinante de la presente invención puede ser una célula procariota tal como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*, preferiblemente una célula eucariota, más preferiblemente una célula de mamífero. Ejemplos de la célula de mamífero incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO), COS, mieloma, BHK, HeLa, Vero, 293, NS0, Namalwa y YB2/O.

El anticuerpo anti-RGMa o su fragmento de unión al antígeno obtenido puede purificarse a homogeneidad. Los métodos de separación y purificación usados para proteínas ordinarias pueden usarse para la separación y purificación de anticuerpos y similares. La separación y purificación de anticuerpos puede

conseguirse seleccionando y combinando apropiadamente, por ejemplo, pero sin limitarse a, columnas de cromatografía tales como cromatografía de afinidad, filtros, ultrafiltración, salificación, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida SDS o enfoque isoeléctrico (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Ejemplos de columnas utilizadas para la cromatografía de afinidad incluyen la columna de proteína A, la columna de proteína G, la columna conjugada con anticuerpo anti-inmunoglobulina y la columna conjugada con antígeno. Ejemplos de la columna de proteína A incluyen Hyper D, POROS y Sepharose FF (Amersham Biosciences).

Agentes para prevenir o tratar enfermedades inmunológicas y neurológicas

La proteína de unión a la RGMa, particularmente el anticuerpo anti-RGMa o su fragmento de unión a antígeno de la presente invención, neutraliza la actividad inhibidora de crecimiento de neuritas de RGMa para promover la reparación de la función neuronal y, por lo tanto, puede usarse como un agente para prevenir, o prevenir la recaída de enfermedades neurológicas.

La proteína de unión a la RGMa, particularmente el anticuerpo anti-RGMa o su fragmento de unión a antígeno de la presente invención también neutraliza la activación de las células T mediante RGMa y así puede utilizarse como un agente para prevenir, tratar o prevenir la recaída de enfermedades inmunológicas.

Los ejemplos de la enfermedad neurológica incluyen esclerosis lateral amiotrófica, lesión del plexo braquial, daño cerebral (incluyendo lesión cerebral traumática), parálisis cerebral, síndrome de Guillain-Barre, leucodistrofia cerebral, esclerosis múltiple (incluyendo esclerosis múltiple recidivante-remitente, esclerosis múltiple progresiva primaria, esclerosis múltiple progresiva secundaria), neuromielitis óptica, síndrome postpolio, espina bífida, lesión de médula espinal, atrofia muscular espinal, neoplasma espinal, enfermedad de Alzheimer, demencia (incluyendo demencia senil, deterioro cognitivo leve), enfermedad de Huntington, disquinesia tardía, manía, enfermedad de Parkinson, síndrome de Steele-Richardson, síndrome de Down, miastenia gravis, neurotrauma (incluyendo trauma del nervio óptico), amiloidosis vascular, hemorragia cerebral asociada con amiloidosis, infarto cerebral, cerebritis, estado confusión aguda, glaucoma, esquizofrenia y degeneración de la capa de fibras nerviosas de la retina (incluyendo retinopatía diabética, neuropatía óptica isquémica, retinosquiasis ligada a X, neuropatía óptica inducida por fármacos, distrofia retiniana, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedades oculares caracterizadas por drusas de disco óptico, enfermedades oculares

caracterizadas por determinación genética de degeneración de fotorreceptores , distrofia de conos y bastones autosómica recesiva , trastorno mitocondrial asociado con neuropatía óptica). Se prefieren la lesión de médula espinal y neurotrauma (incluyendo traumatismo del nervio óptico).

Los ejemplos de la enfermedad inmunológica incluyen esclerosis múltiple (incluyendo esclerosis múltiple remitente recidivante, esclerosis múltiple progresiva primaria, esclerosis múltiple progresiva secundaria), neuromielitis óptica, psoriasis, artritis (incluyendo artritis reumatoide , osteoartritis, artritis psoriásica), síndrome de Guillain-Barré, enfermedad neuro-Bechet, anemia perniciosa, diabetes mellitus tipo I (insulino-dependiente), lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), síndrome de Sjogren, síndrome de Goodpasture, Enfermedad de Graves, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, asma, polinosis, dermatitis atópica, glomerulonefritis, miastenia gravis, enfermedad de Hashimoto y sarcoidosis. Se prefiere la esclerosis múltiple.

La proteína de unión a la RGMA, particularmente el anticuerpo anti-RGMA o su fragmento de unión al antígeno de la presente invención, se puede usar como un agente para prevenir, tratar o prevenir la recaída de enfermedades neurológicas/inmunológicas, que incluyen preferiblemente lesiones de la médula espinal, neurotrauma (incluyendo traumatismo del nervio óptico) y esclerosis múltiple (incluyendo esclerosis múltiple remitente-remitente, esclerosis múltiple progresiva primaria, esclerosis múltiple progresiva secundaria).

Tal como se utiliza en la presente, el término "tratar" incluye cualquier tratamiento de enfermedades en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye inhibir los síntomas de la enfermedad, es decir, inhibir su progresión o eliminar las enfermedades o síntomas y aliviar los síntomas de la enfermedad, es decir, regresión de las enfermedades o síntomas o un retraso en el desarrollo de los síntomas.

"Prevención" incluye la prevención de la aparición de las enfermedades descritas anteriormente en un mamífero, particularmente un ser humano.

"Prevenir la recaída" incluye la prevención de la recaída de las enfermedades descritas anteriormente que repiten la remisión y la recaída en un mamífero, particularmente un ser humano.

La proteína de unión a la RGMA (anticuerpo anti-RGMA o fragmento de unión a antígeno de la misma) de la presente invención se puede usar como una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades neurológicas o inmunológicas.

La forma de administración de la proteína de unión a RGMA (anticuerpo anti-RGMA o fragmento de unión a antígeno del mismo) de la presente invención no está particularmente limitada y puede administrarse a mamíferos incluyendo humanos por cualquier vía de administración oral o parenteral (por ejemplo, intramuscular, subcutánea, rectal, transcutánea, intracerebral, intraespinal u otra administración tópica).

Las formas de dosificación para administración oral y parenteral y métodos de preparación de las mismas son bien conocidos por los expertos en la técnica, y una composición farmacéutica puede prepararse combinando el anticuerpo de acuerdo con la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable o similar.

Las formas de dosificación para administración parenteral incluyen preparaciones inyectables (por ejemplo, inyecciones de goteo, inyecciones intravenosas, inyecciones intramusculares, inyecciones subcutáneas, inyecciones intradérmicas, preparaciones de administración intracerebral y preparaciones de administración intraespinal), preparaciones externas (por ejemplo, ungüentos, cataplasmas y lociones), supositorios inhalantes, gotas para los ojos, ungüentos oftálmicos, gotas nasales, gotas para los oídos y liposomas. En particular, cuando el anticuerpo de acuerdo con la presente invención debe actuar directamente sobre un tejido nervioso central, puede ser infundido continuamente utilizando una microbomba médica que es una bomba osmótica, o mezclada con pegamento de fibrina o similar para preparar una sustancia sostenida, liberar la preparación y luego se coloca en el tejido afectado.

Por ejemplo, las preparaciones inyectables se preparan habitualmente disolviendo el anticuerpo en agua destilada inyectable y, si es necesario, un agente solubilizante, un regulador de pH, un agente de ajuste del pH, un agente isotonizante, un agente calmante, un conservante y un agente estabilizador pueden ser adicional. Las preparaciones inyectables también pueden ser preparaciones liofilizadas preparadas antes del uso.

Las formas de dosificación para administración oral incluyen formas de dosificación sólidas o líquidas, en particular comprimidos, comprimidos recubiertos, píldoras, gránulos finos, gránulos, polvos, cápsulas, jarabes, emulsiones, suspensiones, inyecciones y trociscos.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener además otros fármacos terapéuticamente eficaces, y si es necesario, se pueden mezclar componentes tales como microbicidas, antiinflamatorios, vitaminas y aminoácidos.

Los vehículos farmacológicamente aceptables incluyen, por ejemplo, excipientes, lubricantes, aglutinantes y desintegrantes para preparaciones sólidas; y disolventes, agentes solubilizantes, agentes de suspensión, agentes isotonizantes, reguladores de pH y agentes calmantes para preparaciones líquidas. Si es necesario, se pueden usar apropiadamente aditivos tales como antisépticos habituales, antioxidantes, colorantes, edulcorantes, adsorbentes y agentes humectantes en cantidades apropiadas.

La dosificación del anticuerpo según la presente invención se puede determinar basándose en diversos factores tales como la vía de administración, el tipo de enfermedad, el grado de síntomas, la edad, el sexo, el peso corporal, la gravedad de la enfermedad de los pacientes, los hallazgos farmacológicos tales como como características farmacocinéticas y toxicológicas, se utilice o no un sistema de administración de fármacos y si se administra o no como parte de una combinación con otros fármacos. Usualmente, de 1 a 5,000 µg/día, preferiblemente de 10 a 2,000 µg/día, más preferiblemente de 50 a 2,000 µg/día para administración oral o de 1 a 5,000 µg/día, preferiblemente de 5 a 2,000 µg/día, más preferiblemente de 50 a 2,000 µg/día para inyección por adulto (60 kg de peso corporal) en una o varias dosis. Para la administración parenteral a todo el cuerpo, se pueden administrar 10 a 100,000 µg/kg, más preferiblemente 100 a 50,000 µg/kg, e incluso más preferiblemente 500 a 20,000 µg/kg por peso corporal, en un intervalo de una vez al día, una vez al día semana, una vez al mes, o de 1 a 7 veces al año. Para la administración tópica usando una bomba osmótica o similar, en infusión continua usual a una velocidad de 10 a 100,000 µg/día, más preferiblemente de 100 a 10,000 µg/día, aún más preferiblemente de 500 a 5,000 µg/día por adulto (60 kg peso corporal) es posible.

EJEMPLOS

La presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos, pero la presente invención no se limita a los aspectos de los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

Preparación de la proteína de la RGMa humana (Dominio del extremo C)

Se estableció una célula CHO que expresa una proteína de la RGMa recombinante humana en la que se fusionó una etiqueta de histidina al extremo C de Pro 169 a Gly 422 (que se refiere al residuo de prolina en la posición 169 al residuo de glicina en la posición 422 desde el lado de extremo N en lo sucesivo descrito de

manera similar) de la proteína de la RGMa humana (SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias).

El dominio de extremo C de la proteína de la RGMa humana contenida en el sobrenadante de cultivo de células CHO se adsorbió en una columna de níquel (GE Healthcare, 17-5247-01), y se eluyó con una solución de imidazol 100 mM. Por diálisis, la fracción de elución de imidazol se reemplazó con solución salina regulada con fosfato (PBS) y se usó como un inmunógeno.

EJEMPLO 2

Preparación del anticuerpo monoclonal anti-RGMa de ratón

Se mezclaron diez microgramos de proteína de la RGMa recombinante humana preparada en el Ejemplo 1 con adyuvante de Freund completo (Sigma) para preparar una emulsión, y se inmunizó un ratón BALB/c (Charles River Japan) en varios sitios subcutáneos en la espalda. Posteriormente, la inmunización se llevó a cabo de manera similar a intervalos de 1 a 2 semanas con 10 µg de proteína de la RGMa recombinante humana preparada en una emulsión con adyuvante incompleto de Freund (Sigma) y se recogió sangre después de varias inmunizaciones. El título de anticuerpo se midió mediante ELISA descrito a continuación en el que se inmovilizaron proteínas de la RGMa de ratón o humanas. En individuos que mostraron un título de anticuerpo aumentado, se administraron 10 µg de proteína de la RGMa humana por administración intravenosa para aumentar y se recuperaron esplenocitos 2 ó 3 días más tarde.

Para la fusión celular se mezclaron las células de bazo y células de mieloma de ratón (SP2/0, Dainippon Sumitomo Pharma) con la mitad del número de células de bazo y se centrifugaron, y se añadió polietilenglicol (Roche Diagnostics) a la fracción de precipitado resultante para obtener células fusiones. Las células fueron centrifugadas y lavadas dos veces con D-MEM (Invitrogen). Las células se resuspendieron en medio GIT (Nippon Pharmaceutical) que contiene suero bovino fetal al 10% (Invitrogen), BM condimed al 1% (Roche Diagnostics) y HAT (Sigma-Aldrich) y se sembraron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos a 5×10^4 células de mieloma/pocillo. El sobrenadante del cultivo se recuperó y se cribó para células productoras de anticuerpos mediante el ELISA inmovilizado con proteína de la RGMa humana del Ejemplo 3.

Las células productoras de anticuerpos obtenidas mediante el cribado fueron clonadas por el método de dilución limitante, y se seleccionaron células de hibridoma que producían dos clases de anticuerpos monoclonales (B5.116A3 y B5.70E4).

Los isotipos de ambos anticuerpos monoclonales determinados mediante el uso de un kit de isotipificación (ratón MonoAB ID/SP KIT, ZYMED, 93-6550) fueron IgG2b de ratón para cadena pesada y kappa para cadena ligera.

Los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas se sometieron a cromatografía de afinidad utilizando agarosa sobre la que se inmovilizaron anticuerpos IgG anti-ratón (Agarosa IgG anti-ratón fabricada por Sigma) para purificar los anticuerpos monoclonales. Después de que el anticuerpo se unió a la columna, la columna se lavó con PBS. A continuación, el anticuerpo se eluyó con clorhidrato de glicina 10 mM (pH 2.7) y el eluato se neutralizó inmediatamente. A continuación, el eluido neutralizado se reemplazó con PBS a través de un ultrafiltro.

EJEMPLO 3

ELISA en el que las proteínas RGMA humanas o de ratón están inmovilizadas

La proteína de la RGMA humana (Sistemas R&D, 2459-RM) o la proteína de RGMA de ratón (Sistemas R&D, 2458-RG) preparada a 2 µg/mL con PBS se agregó a una placa de 96 pocillos a 50 µL/pocillo cada una y la placa se dejó en reposo a temperatura ambiente por 1 hora. Después de la eliminación de la solución, ApplieBlock (Seikagaku Bio-Business, 200150) diluido 5 veces con PBS se dispensó a 200 µL/pocillo cada uno y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora para bloquear la unión no específica. Después de lavar tres veces con PBST (PBS que contiene 0.05% de Tween 20), se añadieron muestras (por ejemplo, suero de ratón, sobrenadante de cultivo de hibridoma, sobrenadante de cultivo expresado con anticuerpo recombinante descrito más tarde o anticuerpo purificado) diluido en serie con PBS a 50 µL/pocillo cada uno, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se lavó la placa tres veces con PBST y luego se dispensó anticuerpo de IgG anti-ratón de oveja marcado con peroxidasa (GE Healthcare, NA9310V) diluido con PBS a 50 µL/pocillo cada uno, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió un kit de coloración con peroxidasa (Sumitomo Bakelite, ML-1130O) y se dejó desarrollar color durante un cierto tiempo, y se midió la absorbancia a 492 nm con un lector de placas.

EJEMPLO 4

Análisis de epítomos de anticuerpos

Los epítomos a los que se unen los anticuerpos se determinaron por el método de escaneado de péptidos. Se sintetizaron un total de 83 tipos de péptidos

fusionando el lado de extremo N de las secuencias de aminoácidos consistentes en 11 residuos consecutivos desplazados por 3 residuos contenidos en Arg 172 a Ala 424 de la proteína de la RGMA humana (SEQ ID NO: 1 en el Listado de secuencias) con una secuencia espaciadora (SGSG) con extremo N biotinilado (SEQ ID NO: 46 en el listado de secuencias). Después de inmovilizar los péptidos en placas revestidas con avidina, se dejaron reaccionar los anticuerpos de prueba (B5.116A3 y B5.70E4). Posteriormente, se dejó reaccionar un anticuerpo de Ig de conejo anti-ratón marcado con peroxidasa (Dako, P026002). Después de que se añadió una solución de sustrato y se desarrolló el color durante un cierto tiempo, se midió la absorbancia con un lector de placas.

Como resultado, B5.116A3 unido a péptidos derivados de RGMA humano de Glu 298 a Gly 311 (dos tipos de péptidos: Glu 298 a Asp 308 y Val 301 a Gly 311), Asn 322 a Glu 335 (dos tipos de péptidos: Asn 322 a Thr 332 y Ile 325 a Glu 335), y Lys 367 a Ala 377; y B5.70E4 unido a péptidos derivados de RGMA humana de Glu 298 a Gly 311 (dos tipos de péptidos: Glu 298 a Asp 308 y Val 301 a Gly 311), Asn 322 a Glu 335 (dos tipos de péptidos: Asn 322 a Thr 332 y Ile 325 a Glu 335) y Pro 349 a Thr 359.

EJEMPLO 5

Análisis de secuencias y clonación del gen del anticuerpo del ratón

Se extrajo ARN total de células de hibridoma produciendo un anticuerpo monoclonal de ratón (B5.116A3 o B5.70E4). Utilizando el ARN total como una plantilla, el ADNc se sintetizó mediante reacción de transcripción inversa. Utilizando el ADNc como molde, se amplificaron los genes de las regiones variables y constantes de la cadena ligera y las regiones variables y constantes de la cadena pesada por PCR y se determinaron las secuencias de ADN. A continuación, basándose en las secuencias determinadas de las regiones variables y constantes, los genes de anticuerpo de longitud completa se amplificaron por PCR y se clonaron. Las secuencias de aminoácidos codificadas por estos genes de anticuerpo fueron las siguientes.

(1) Secuencia de aminoácidos de cadena ligera B5.116A3 (SEQ ID NO: 4 en el listado de secuencias)

DIQMTQTTSSLSASLGDRVITISCRASQDISSYLNWYQQKPDGTVKLLI
YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQLNLTLPWTFGGGTKL
EIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFFPKDINVKWKIDGSERQNGVLN
SWTDQDSKDYSTYSMSSTLTITKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

(2) Secuencia de aminoácidos de cadena pesada B5.116A3 (SEQ ID

NO: 5 en el listado de secuencias)

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGL
 EWVAEIRSKANNHATYYAESVKGRFTISRDDSKRSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTRR
 DGAYWGQGTTLVTVSAAKTTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVT
 WNSGSLSSSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDK
 KLEPSGPISTINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMLSLTPKVTCVVVD
 VSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQDWMSGKEFK
 CKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISV
 EWTSNGHTEENYKDTAPVLDSGYSYFIYSKLNMKTSKWEKTDSFSCNVRHEGLKN
 YYLKKTISRSPGK

(3) Secuencia de aminoácidos de cadena ligera B5.70E4 (SEQ ID NO: 6 en el listado de secuencias)

DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQRP
 QSPKLLIYKVSNRFSQVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCSQSTHVPYTF
 GGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSR
 QNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN
 NEC

(4) Secuencia de aminoácidos de cadena pesada B5.70E4 (SEQ ID NO: 7 en el listado de secuencias)

DVKLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITTSYYWNWIRQFPGNKLE
 WMGYISYDGTNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLRNLNSVTTEDTATYYCAGSFGYSQ
 GTLVTVSAAKTTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSS
 SVHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDKKLEPSGPIST
 INPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMLSLTPKVTCVVVDVSEDDPDV
 QISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPS
 PIERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHT
 EENYKDTAPVLDSGYSYFIYSKLNMKTSKWEKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRS
 PGK

EJEMPLO 6

Preparación del anticuerpo de ratón recombinante y el anticuerpo recombinante quimérico de ratón y rata

Se prepararon anticuerpos recombinantes de ratón de dos tipos de anticuerpos anti-RGMa B5.116A3 y B5.70E4 derivados de hibridomas (denominados en lo sucesivo "r116A3" y "r70E4", respectivamente).

Además, como ejemplo comparativo, se preparó un anticuerpo recombinante quimérico de ratón y rata (denominado en lo sucesivo "r5F9")

fusionando las regiones variables del anticuerpo de rata 5F9 con las regiones constantes de anticuerpo de ratón (IgG2bk) (la región constante de cadena ligera es Arg 108 a Cys 214 de SEQ ID NO: 4 en el listado de secuencias, y la cadena pesada es Ala 117 a Lys 452 de SEQ ID NO: 5 de la listado de secuencias) según el documento de patente 1 (WO2009/106356).

El ADN que codifica las cadenas ligera y pesada de cada uno de los anticuerpos se insertó en pcDNA 3.3 (Life Technologies) para preparar un vector de expresión. El vector de expresión se introdujo en células HEK293F (Life Technologies) utilizando Neofection 293 (ASTEC). Las células se cultivaron a 37°C bajo atmósfera de gas dióxido de carbono al 8% durante 6 días, y después se recuperó el sobrenadante del cultivo. Para la purificación del anticuerpo recombinante, el sobrenadante del cultivo se aplicó a una columna de afinidad sobre la cual se inmovilizó Proteína A o Proteína G (GE Healthcare), y los anticuerpos unidos a la columna se eluyeron con clorhidrato de glicina 10 mM (pH 2.8). El eluato se neutralizó inmediatamente y después se reemplazó con PBS.

En el caso en que la pureza refinada necesita aumentarse de acuerdo con el propósito de uso, los anticuerpos purificados con la columna de Proteína A se purificaron con una columna de hidroxapatita de cerámica Tipo 1 (CHT) (BIORAD). Los anticuerpos unidos a la columna CHT se lavaron con 10 mM de KH_2PO_4 (pH6.5) y después se eluyeron con 20 mM de KH_2PO_4 (pH6.5), 0.5 M NaCl. Las fracciones eluidas se recogieron y después se reemplazaron con PBS.

EJEMPLO 7

Ensayo de unión a las células que expresan la proteína de la RGMa

Un vector que expresa la proteína de la RGMa humana de longitud completa (Met 1 a Cys 450 de SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias), dominio del extremo C de la proteína de la RGMa humana (Pro 169 a Cys 450 de SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias), proteína de la RGMa de ratón de longitud completa (Met 1 a Trp 454 de SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias), o el dominio del extremo C de la proteína de la RGMa humana (Pro 170 a Trp 449 de SEQ ID NO: 3 en el listado de secuencias) se introdujo en células CHO o HEK 293 para preparar células que expresan antígenos.

En las proteínas de la RGMa, el péptido del extremo C se procesa durante la reacción de adición de anclaje GPI. Las proteínas de la RGMa de ratón y rata se escinden en Ala 427 y se elimina el péptido del extremo C. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de la proteína de longitud completa y el dominio de extremo C expresadas en una célula a través de un anclaje GPI son las mismas en

ratón y rata.

Se hicieron reaccionar los anticuerpos de ensayo (r116A3 y r70E4) y r5F9 (ejemplo comparativo) con una concentración final de 10 µg/mL con las células que expresan el antígeno antes descrito y después se lavaron con PBS que contiene 0.1% de albúmina de suero bovino y 0.05% de NaN₃. Se dejó reaccionar el anticuerpo de inmunoglobulina anti-ratón marcado con FITC (DAKO) y las células se lavaron. La fluorescencia se midió con citometría de flujo (FACSCalibur fabricado por Beckton Dickinson), y se evaluaron las propiedades de unión de los anticuerpos de prueba a las células que expresan el antígeno (Cuadro 1).

Como resultado, se encontró que r116A3 y r70E4 se unen al dominio del extremo C de proteínas de la RGMa humana y de rata, a diferencia de r5F9. La proteína de la RGMa tiene efecto inhibidor de la proliferación de neuritas incluso en el dominio del extremo C solo, y r116A3 y r70E4 inhiben tanto la proteína de la RGMa de longitud completa como el dominio del extremo C.

CUADRO 1
Evaluación de la unión de varios anticuerpos anti-RGMa recombinantes a células que expresan antígeno*

	RGMa humano de longitud completa	Dominio de terminal C de la RGMa humana	RGMa de ratón de longitud completa	Dominio de extremo C de la RGMa de rata
r116A3	++	++	++	++
r70E4	++	++	+	++
r5F9	++	-	++	-

*; ++ Unido fuertemente
+ Unido débilmente
- Sin unión

EJEMPLO 8
Determinación de la constante de disociación para la proteína de la RGMa

La afinidad de los anticuerpos de ensayo (r116A3 y r70E4) y r5F9 (Ejemplo Comparativo) para la proteína de la RGMa se midió por el método de resonancia de plasmón superficial (SPR) usando Proteon XPR36 (Bio-Rad).

La proteína de la RGMa humana (Sistemas R&D, 2459-RM), el dominio del extremo C de la proteína de la RGMa humana (preparada en el ejemplo 1) o la proteína de la RGMa de ratón (Sistemas R&D, 2458-RG) diluidas a 10 µg/mL con 10 mM de regulador de acetato (pH4.5) se inmovilizó en un chip de detección GLC mediante el método de acoplamiento de aminas. Los anticuerpos de ensayo diluidos en serie se aplicaron como analitos a un caudal de 100 µl/min durante 60 segundos para determinar la constante de disociación (valor Kd).

Como se muestra en el cuadro 2, r116A3 y r70E4 también se unieron al dominio del extremo C de la proteína de la RGMa humana, pero r5F9 no. R116A3 unido a la proteína de la RGMa humana 32 veces más fuerte que r5F9 y a la proteína de la RGMa de ratón 44 veces más fuerte que r5F9.

CUADRO 2
Afinidad del anticuerpo monoclonal anti-RGMa

Anticuerpo	Constante de disociación (valor Kd, nM)		
	RGMa humana	Dominio de terminal C de la RGMa humana	RGMa de ratón
r116A3	0.0487	0.0568	0.201
r70E4	2.43	1.12	174
r5F9 (Ejemplo comparativo)	1.59	sin unión	8.98

EJEMPLO 9
Ensayo de Inhibición de Unión RGMa-Neogenina

Se purificó el dominio extracelular (Ala 34 a Leu 1105) de la proteína de neogenina humana recombinante (SEQ ID NO: 10 en el listado de secuencias). Se estableció una línea celular CHO que expresa el dominio extracelular de la proteína Neogenina humana. Se fusionó una etiqueta de histidina con el extremo C. A partir del sobrenadante de cultivo de células CHO, el dominio extracelular fue adsorbido en una columna de níquel (GE Healthcare, 17-5247-01), y después se eluyó con una solución de imidazol 100 mM. Por diálisis, la fracción de elución de imidazol se sustituyó por PBS.

La proteína de la RGMa humana (sistemas R&D, 2459-RM) se etiquetó con biotina usando el Kit de etiquetado con biotina ChromaLink (Solulink). Se mezclaron cantidades iguales de la proteína de la RGMa humana marcada con biotina ajustada a 2 µg/ml y los anticuerpos de ensayo (r116A3 y r70E4) sometidos a dilución en serie 2 veces se mezclaron y se dejaron reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas para preparar una solución mixta.

Al mismo tiempo, se añadieron 50 µL/pocillo del dominio extracelular de proteína neogenina humana ajustado a 2 µg/ml con PBS a una placa de 96 pocillos, y se dejó reposar la placa a temperatura ambiente durante 1 hora para preparar una placa inmovilizada con neogenina. Después de retirar la solución, se añadió solución de albúmina de suero bovino al 2.5% y la placa se dejó reposar durante 1 hora para bloquear la unión no específica. A la placa inmovilizada con neogenina, se añadió la solución mixta descrita anteriormente a 50 µL/pocillo, y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se realizó una

operación de lavado y se añadió Avidina etiquetada con peridoxidasa (sistema VECTASTAIN ABC, fabricado por Vector Laboratories), y se dejó reposar la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Después se realizó una operación de lavado, se añadió una solución de sustrato, se llevó a cabo el revelado del color durante un cierto tiempo y se midió la absorbancia con un lector de placas. La proporción de absorbancia en ausencia del anticuerpo se representó como 1, y se evaluó la inhibición de unión de neogenina a RGMA dependiente de la concentración mediante el anticuerpo (Figura 1).

Como resultado, a diferencia del anticuerpo policlonal RGMA anti-humano (Sistemas R&D, AF2459) y r5F9, r116A3 y r70E4 no inhibieron la unión de neogenina a RGMA.

EJEMPLO 10

Ensayo de inhibición de unión RGMA-BMP2

La proteína de la RGMA humana (Sistemas R&D, 2459-RM) ajustada a 2 µg/mL con PBS se agregó a una placa de 96 pocillos cada una y la placa se dejó en reposo a temperatura ambiente por 1 hora. Se añadió una solución de albúmina de suero bovino al 2.5% y la mezcla se dejó reposar durante 1 hora para bloquear la unión no específica, preparando de ese modo la placa inmovilizada con proteína de la RGMA. Los anticuerpos de ensayo (B5.116A3 y B5.70E4) diluidos en serie a 0.01 a 10 µg/mL se añadieron a la placa inmovilizada con proteína de la RGMA y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, se realizó una operación de lavado y se añadió la proteína BMP2 humana (sistemas R&D, 355-BM) diluida a 0.5 µg/mL y la placa se dejó en reposo a temperatura ambiente por 1 hora.

Se dejó reaccionar un anticuerpo anti-BMP2 marcado con biotina, y se añadió adicionalmente con Avidina marcada con peroxidasa (sistema VECTASTAIN ABC, fabricado por Vector Laboratories) y se agregó una solución de sustrato, se llevó a cabo el desarrollo del color durante un cierto tiempo, y la absorbancia se midió con un lector de placas (figura 2).

Como resultado, en particular, el anticuerpo anti-RGMA (B5.116A3) inhibió débilmente la unión de RGMA-BMP2 de una manera dependiente de la concentración (Absorbancia: 0.45 a 0.01 µg/mL, 0.4 a 0.1 µg/mL, 0.32 a 1 µg/mL, y 0.1 a 10 µg/mL).

EJEMPLO 11
Diseño del anticuerpo humanizado

La humanización del anticuerpo monoclonal de ratón B5.116A3 se llevó a cabo mediante injerto de región determinante de complementariedad (CDR) de acuerdo con el método de Winter et al. descrito en la Patente No. 2912618.

En primer lugar, se prepararon modelos de homología 3D de las regiones variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal de ratón B5.116A3 y se identificaron residuos de aminoácidos dentro de la región del marco (FW), localizados cerca de CDR. Se seleccionaron FW de anticuerpos humanos en los que se mantuvieron estos aminoácidos tanto como sea posible, se injertaron CDR del anticuerpo de ratón y, por lo tanto, se diseñó un anticuerpo humanizado. En la secuencia de anticuerpos humanizada diseñada, la cadena pesada se describe como HA (SEQ ID NO: 11 en el listado de secuencias) y la cadena ligera se describe como KA (SEQ ID NO: 19 en el listado de secuencias). Además, se diseñó una pluralidad de secuencias de anticuerpos humanizadas introduciendo mutaciones adicionales en aminoácidos dentro de FW implicados en la estabilidad estructural de la región variable (Un total de 8 cadenas pesadas que van desde HB a HH incluyendo HA y un total de 7 cadenas ligeras que varían desde KB a KG incluyendo KA).

CUADRO 3
Secuencias de anticuerpos humanizados diseñados

Cadena pesada		SEQ ID NO en el listado de secuencias
HA	Secuencia en la que las CDR del anticuerpo de ratón B5.116A3 se injertaron a FW de anticuerpos humanos	11
HB	Secuencia HA con sustitución de Ala 81 por Val y Lys 89 por Arg	12
HC	Secuencia HA con sustitución de Ala 81 por Val	13
HD	Secuencia HA con sustitución de Lys 89 por Arg	14
HE	Secuencia HA con sustitución de Ala 81 por Val, Lys 89 por Arg, y Phe 37 por Val	15
HF	Secuencia HA con sustitución de Leu 95 por Val	16
HG	Secuencia HA con sustitución de Phe 37 por Val	17
HH	Secuencia HA con sustitución de Phe 37 por Val y Leu 95 por Val	18
Cadena ligera		
KA	Secuencia en la que las CDR del anticuerpo de ratón B5.116A3 se injertaron a FW de anticuerpos humanos	19
KB	Secuencia HA con sustitución de Phe 71 por Tyr	20
KC	Secuencia KA con sustitución de Phe 71 por Tyr y Phe 44 por Val	21
KD	Secuencia KA con sustitución de Ser 85 por Thr	22
KE	Secuencia KA con sustitución de Pro 44 por Val	23
KF	Secuencia KA con sustitución de Pro 44 por Val y Ser 85 por Thr	24
KG	Secuencia KA con sustitución de Phe 71 por Tyr, Pro 44 por Val, y Ser 85 por Thr	25

EJEMPLO 12**Preparación de anticuerpo quimérico humano de ratón recombinante y anticuerpo humanizado recombinante**

(1) Se preparó anticuerpo anti-RGMA quimérico humano de ratón recombinante 116A3 (r116A3C) que tiene las siguientes secuencias de aminoácidos de acuerdo con el Ejemplo 6.

Cadena ligera (SEQ ID NO: 8 en el listado de secuencias)

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISSYLNWYQQKPDGTVKLLI
YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQNLTPWTFGGGTKL
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada (SEQ ID NO: 9 en el listado de secuencias)

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGL
EWVAEIRSKANNHATYYAESVKGRFTISRDDSKRSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTRR
DGAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

(2) Se preparó un total de 20 anticuerpos anti-RGMA humanizados que comprenden las siguientes combinaciones de cadenas pesadas y ligeras de acuerdo con el Ejemplo 6.

Combinaciones de cadena pesada/cadena ligera;

HA/KA, HA/KB, HA/KC, HA/KG, HB/KC, HC/KA, HC/KB, HD/KA,
HD/KB, HD/KC, HD/KD, HE/KA, HF/KA, HF/KF, HF/KG, HG/KD, HG/KH, HH/KA,
HH/KD, HH/KF

(3) Se preparó un anticuerpo anti-RGMA humanizado recombinante (en lo sucesivo denominado rH5F9) de acuerdo con el Ejemplo 6 (Ejemplo Comparativo).

La región variable del anticuerpo monoclonal anti-RGMA humanizado h5F9 descrito en el Documento de Patente 1 (WO2009/106356) (la cadena ligera es seq ID_53 del Documento de Patente 1, y la cadena pesada es seq ID_50 del Documento de Patente 1) se ligó con la región constante de anticuerpo humano (la cadena ligera es Arg 108 a Cys 214 de SEQ ID NO: 26 en el listado de secuencias, y la cadena pesada es Ala 117 a Lys 446 de SEQ ID NO: 27 en el listado de secuencias).

EJEMPLO 13

Prueba de estabilidad térmica para anticuerpos

Se recogieron 20 µl de alícuotas del sobrenadante del cultivo en el que se expresó el anticuerpo recombinante descrito en el Ejemplo 12 y se trataron térmicamente durante 10 minutos a 8 puntos de temperatura de 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 y 75°C, respectivamente, utilizando un termo ciclador (Takara bio, TP 600). El sobrenadante del cultivo se diluyó con PBS de manera que la concentración final del anticuerpo fue de 125 ng/ml. A continuación, el sobrenadante de cultivo se sometió a ELISA en el que se inmovilizaron las proteínas RGMA humanas descritas en el Ejemplo 3 para evaluar la propiedad de unión al antígeno del anticuerpo (Figura 3).

Como resultado, un anticuerpo humanizado que comprende una combinación de cadena pesada HE y cadena ligera KA (denominado en lo sucesivo "rH116A3") y un anticuerpo quimérico humano de ratón (r116A3C) mostró una mejor estabilidad térmica que el anticuerpo humanizado (rH5F9). En lo sucesivo, el anticuerpo humanizado que comprende esta combinación de HE/KA se describe como rH116A3.

Cuando el tratamiento térmico no se realizó, el anticuerpo quimérico humano de ratón (r116A3C) y el anticuerpo humanizado (rH116A3) mostraron propiedades equivalentes de unión al antígeno, y no hubo disminución en la propiedad de unión al antígeno asociada con la humanización.

EJEMPLO 14

Establecimiento de una línea celular estable CHO que produce anticuerpo anti-RGMA humanizado (rH116A3)

Se estableció una línea celular estable CHO que produce anticuerpo anti-RGMA humanizado (rH116A3) utilizando el sistema Lonza GS Xceed (Lonza). Un vector de doble gen pXC que comprende la secuencia codificadora de cadena ligera (SEQ ID NO: 44 en el listado de secuencias) y la secuencia codificadora de

cadena pesada (SEQ ID NO: 43 en el listado de secuencias) del anticuerpo anti-RGMA humanizado (rH116A3) se introdujo en una línea celular madre inactiva CHOK1SV GS, y se obtuvo un grupo de células transformadas bajo selección de metionina sulfoximina (MSX). Después de separar en células individuales mediante citometría de flujo, se evaluó la cantidad de producción de anticuerpos en sobrenadante de cultivo, la proliferación celular y similares y se obtuvo una línea celular estable de CHO.

EJEMPLO 15

Ensayo de crecimiento de neuritas

Se cortó un cerebelo de una rata neonatal (P7), se suspendió en una solución de tripsina (solución de tripsina al 0.25% en PBS que contiene ADNasa al 0.2%) y se digirió a 37°C por 10 a 15 minutos. A continuación, se añadió medio DMEM que contiene suero bovino fetal al 10% y la mezcla se centrifugó. Las células se resuspendieron en el mismo medio y se centrifugaron, y se repitió el mismo procedimiento dos veces para lavar las células. Además, esta suspensión celular se filtró a través de un filtro de células de 70 µm y se centrifugó, y la fracción precipitada se resuspendió en el mismo medio. Se añadió B27 (GIBCO) a la suspensión celular para preparar células de gránulo cerebeloso de rata neonatal.

A continuación, las células de gránulo cerebeloso de rata neonatal se sembraron en una placa de cultivo celular y se cultivaron a 37°C durante 1 día.

Se agregó la proteína RGMA recombinante (sistemas R&D, 2459-RM) con una concentración final de 2 µg/mL y se cultivaron las células a 37° por 2 días. La longitud de las neuritas se midió por microscopía. Como se muestra en la figura 4, la adición de RGMA dio lugar a cambios de longitud de neuritas de 37 µm a 26 µm en el experimento en la figura izquierda y de 38 µm a 27 µm en la figura derecha, inhibiendo así el crecimiento de neuritas. Aunque la adición de sólo el anticuerpo de prueba (B5.116A3 o B5.70E4) a una concentración final de 10 µg/mL no cambió la longitud de neurita, la adición simultánea de proteína RGMA recombinante y el anticuerpo de ensayo indujeron el crecimiento de neuritas en la misma medida que un control (sin RGMA añadido), que indican el efecto neutralizante del anticuerpo contra la proteína RGMA.

EJEMPLO 16

Prueba de eficacia usando un modelo de lesión de médula espinal de rata

Se sometió a una laminectomía de las vértebras anteriores y posteriores alrededor del nivel espinal T9 (T8 a T10) una rata Wistar (hembra, de 8 semanas de edad, con un peso aproximado de 200 g) anestesiada por aspiración de halotano (Takeda Pharmaceutical) y se expuso la médula espinal. En el caso de la evaluación utilizando un modelo de aplastamiento de la médula espinal, se aplicó una presión de 200 kdyn a la médula espinal expuesta utilizando un impactador IH (Sistema de Precisión).

Inmediatamente después de dañar la médula espinal, como se describió anteriormente, una minibomba osmótica llena con 400 µg/ml del anticuerpo de prueba (r116A3 o r70E4) o un anticuerpo de ratón control (mo-IgG2bk) (200 µl de volumen, 0.5 µl/hora, entrega de 14 días) (Alzet, modelo 2002) se colocó bajo la piel de la parte posterior de la rata. La punta de un tubo de silicio conectado a la salida de la minibomba osmótica se colocó debajo de la duramadre en el sitio de la lesión de la médula espinal. El tubo se cosió y fijó a los procesos espinosos en el lado derecho del miembro inferior del sitio laminectomizado, las capas de músculo y de piel se suturaron y se crió la rata.

Se evaluó la función motora de la rata modelo de lesión medular usando marcador Basso-Beattie-Bresnahan (Basso, DM, Beattie, M.S., & Bresnahan, J.C., A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. J Neurotrauma 12, 1-21 (1995)) en 0, 1, 3 y 7 días después de la lesión y cada semana después de la lesión por hasta 8 semanas. Como resultado, como se muestra en la figura 5(A), r116A3 o r70E4 mejoraron significativamente la puntuación BBB 4 o 3 semanas después de la administración, respectivamente, en comparación con el anticuerpo control (mo-IgG2bk) ($p < 0.05$, prueba T de Student).

En el caso de la evaluación utilizando un modelo de hemisección de la médula espinal, el lado dorsal de la médula espinal expuesta se cortó a una profundidad de 1.8 mm a 2.0 mm. De la misma manera que antes, se administró el anticuerpo de ensayo (B5.116A3) o el anticuerpo de ratón control (mo-IgG2bk) usando una minibomba osmótica y se evaluó usando la puntuación BBB en los días 0, 1, 3 y 7 después de la lesión, y cada semana después hasta 10 semanas. Como se muestra en la figura 5(B), B5.116A3 mejoraron significativamente la puntuación BBB 4 semanas después de la administración en comparación con el anticuerpo control (mo-IgG2bk) ($p < 0.01$, prueba T de Student).

EJEMPLO 17

Prueba de eficacia con modelo de ratón con esclerosis múltiple

PLP₁₃₉₋₁₅₁ péptido (HSLGKWLGHDPKF: SEQ ID NO: 45 en el listado de secuencias, Peptide Institute) se disolvió en solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Factory) y se mezcló con adyuvante incompleto de Freund (Sigma) al que se añadió el bacilo tuberculoso muerto H37 Ra (Difco Laboratories) para preparar una emulsión. SJL/JorllcoCrj (SJL/J) ratón (Charles River Japan) se inmunizó subcutáneamente en la parte posterior con el péptido PLP₁₃₉₋₁₅₁ a 50 µg/cabeza y se evaluaron la puntuación EAE y el peso corporal (H. Kataoka, K. Sugahara, K. Shimano, K. Teshima, M. Koyama, A. Fukunari and K. Chiba. FTY720, modulador del receptor de esfingosina 1-fosfato, mejora la encefalomiелitis autoinmune experimental mediante la inhibición de la infiltración de células T. Cellular & Molecular Immunology 6, 439-448, 2005.) (Figura 6).

El anticuerpo de ensayo (B5.116A3) diluido en solución salina fisiológica se administró intraperitonealmente a 20 mg/kg cada uno en los días 7 y 10 o días 18 y 21 después de la inmunización con péptido PLP₁₃₉₋₁₅₁.

Como resultado, como se muestra en la figura 6, en comparación con el anticuerpo control (mo-IgG2bk), el anticuerpo monoclonal de ratón anti-RGMA (B5.116A3) inhibió el deterioro de la puntuación EAE por administración antes del inicio (parte superior de la figura 6) y mostró efecto de prevención de recaídas por administración después del inicio (parte inferior de la figura 6).

EJEMPLO 18

Prueba de inmunogenicidad del anticuerpo

Las células dendríticas no diferenciadas contenidas en la sangre periférica derivadas de 51 donantes sanos se maduraron mediante factor estimulador de colonias de monocitos de granulocitos (GM-CSF) e estimulaciones de Interleucina-4. El anticuerpo de ensayo (rH116A3) a una concentración final de 50 µg/ml se añadió a las células dendríticas maduras y las células se cultivaron durante 4, 5 días para permitir que el anticuerpo se recogiera en las células dendríticas. Se mezclaron las células T CD4⁺ de sangre periférica (células T auxiliares) derivadas del mismo donante con las células dendríticas, y co-cultivadas por otra semana, y luego se midió la proliferación de células T mediante citometría de flujo. Utilizando la actividad de proliferación de células T del anticuerpo de ensayo como índice, se evaluó el riesgo de inmunogenicidad en humanos. Como resultado, se observó la proliferación de células T en 4 (7.8%) de 51 donantes, y por lo tanto el riesgo de inmunogenicidad fue bajo.