



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0818928-5 B1



(22) Data do Depósito: 27/10/2008

(45) Data de Concessão: 07/12/2021

(54) Título: MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO A NOGO-A ISOLADAS, SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO E SEU USO, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, VETOR E SISTEMA DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA ISOLADA, E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: C07K 16/22; A61P 11/06; A61K 39/395; A61P 25/00; A61P 25/28; (...).

(30) Prioridade Unionista: 02/11/2007 US 61/001,741; 02/11/2007 EP 07 119847.7.

(73) Titular(es): NOVARTIS AG; UNIVERSITY OF ZURICH.

(72) Inventor(es): STEFAN FRENTZEL; MARTIN E. SCHWAB; ALESSANDRA VITALITI; CARMEN BARSKE; ANIS KHUSRO MIR.

(86) Pedido PCT: PCT EP2008064501 de 27/10/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/056509 de 07/05/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 03/05/2010

(57) Resumo: MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO NOGO-A APERFEIÇOADAS, SEU USO E SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, VETOR E SISTEMA DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA ISOLADA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA. A presente invenção refere-se a uma molécula de ligação que é capaz de se ligar ao polipeptídeo Nogo-A humano ou NiG humano com uma constante em dissociação 1.000nM, um polinucleotídeo que codifica tal molécula de ligação; um vetor de expressão que compreende o dito polinucleotídeo; um sistema de expressão que compreende um polinucleotídeo capaz de produzir uma molécula de ligação; uma célula hospedeira isolada que compreende um sistema de expressão conforme definido acima; o uso de tal molécula de ligação como um produto farmacêutico, especialmente no tratamento de uma doença do sistema nervoso periférico (SNP) e/ou do sistema nervoso central (SNC); uma composição farmacêutica que compreende a dita molécula de ligação; e um método para o tratamento de uma doença do sistema nervoso periférico (SNP) e/ou do sistema nervoso central (SNC).

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO A NOGO-A ISOLADAS, SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO E SEU USO, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, VETOR E SISTEMA DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA ISOLADA, E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA".

[001] A invenção refere-se a moléculas de ligação NogoA aperfeiçoadas, tais como, por exemplo, anticorpos monoclonais, derivados ou fragmentos Fab destas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] Regeneração neuronal do sistema nervoso central (SNC) adulto é limitada devido à presença de ambiente com mielina inibidora que embainha os axônios e à formação de tecido de cicatrização. Nos últimos poucos anos, informações muito importantes foram obtidas no entendimento molecular de o porquê de o SNC ser inútil para se regenerar espontaneamente após a lesão. Moléculas inibidoras na mielina são o principal impedimento para a regeneração axonal, particularmente após a lesão. Até agora, NogoA, Glicoproteína associada à Mielina (MAG) e mielina-glicoproteína-oligodendrócito (OMgp) foram caracterizadas como potentes inibidores de desenvolvimento de neurite. Além disso, a mielina contém também outros componentes inibidores, tais como, proteoglicanos de sulfato de condroitina. Nogo-A é um membro da família de proteína reticulon e tem pelo menos dois domínios biologicamente ativos e farmacologicamente distintos denominados Amino-Nogo e Nogo-66. Embora o sítio do receptor não seja conhecido até hoje, Nogo-66 inibe o crescimento neuronal in vitro e in vivo do receptor neuronal NgR. Além de Nogo-66, MAG e OMgp se ligam também ao NgR com alta afinidade e inibem o desenvolvimento de neurite.

[003] Novas abordagens de pesquisa correntemente em prosseguimento de regeneração nervosa incluem a digestão de tecido

de cicatriz usando-se uma enzima condroitinase ABC, técnicas em ponte usando células de embainhamento Olfatórias e células-tronco e fatores de crescimento de proteína para reforçar o crescimento neuronal. Ações bloqueadoras de inibidores de desenvolvimento de neurite podem ser obtidas modulando-se os mediadores de sinalização intracelular, tal como Rho, uma guanosina trifosfatase (GTPase) ligada à membrana, que para ter uma ligação-chave na inibição do crescimento axonal. Monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) pode superar a inibição associada à mielina, in vitro e induzir a regeneração in vivo. O inibidor de peptídeo do receptor NgR (NEP 1-40) pode ser usado para induzir o recrescimento neuronal e recuperação funcional em ratos com lesão na espinha.

[004] Além do uso das abordagens descritas acima, muita atenção tem sido também focada no uso de certos anticorpos monoclonais para neutralizar as moléculas inibidoras de desenvolvimento de neurite do sistema nervoso central e periférico, em particular para neutralizar a atividade inibidora do desenvolvimento de neurite de NogoA. Assim, tem sido mostrado que IN-1 de anticorpo monoclonal IN-1 ou o fragmento Fab de IN-1 deste induzem o desenvolvimento de neurite in vitro e intensificam a produção e a regeneração in vivo (Schwab ME et al. (1996) *Physiol. Rev.* 76, 319-37). Anticorpos alternativos para IN-1 estão também descritos em WO2004/052932 (11C7-Ab) e WO2005/028508 (3A6-Ab). Teste de domínios diferentes da NogoA quanto à atividade inibidora do desenvolvimento de neurite delineou vários domínios inibidores na molécula (Chen et al. (2000) *Nature* 403, 434-439; GrandPre et al., (2000) *Nature* 403, 439-444; Prinjha et al. (2000) *Nature* 403, 383-384).

[005] Imunoglobulinas naturais ou anticorpos compreendem uma molécula multimérica geralmente conformada em Y tendo um sítio de ligação de antígeno na extremidade de cada braço superior. O restante

da estrutura em particular o tronco do Y medeia funções efetoras associadas às imunoglobulinas. Os anticorpos consistem em 2 cadeias pesadas e 2 cadeias leves. Ambas as cadeias leves e pesadas compreendem um domínio variável e uma parte constante. Um sítio de ligação de antígeno consiste no domínio variável de uma cadeia pesada associada ao domínio variável de uma cadeia leve. Os domínios variáveis das cadeias pesadas e leves têm a mesma estrutura geral. Mais particularmente, as características de ligação do antígeno de um anticorpo são essencialmente determinadas por 3 regiões específicas no domínio variável das cadeias pesadas e leves que são chamadas de regiões hipervariáveis ou regiões determinantes de complementaridade (CDRs). Essas 3 regiões hipervariáveis se alternam com 4 regiões de estrutura (FRs) cujas sequências são relativamente conservadas e as quais não estão diretamente envolvidas na ligação. As CDRs formam alças e são mantidas em estreita proximidade pelas regiões de estrutura que adotam largamente a conformação em folha β . As CDRs de uma cadeia pesada juntas com as CDRs da cadeia leve associada constituem essencialmente o sítio de antígeno da molécula de anticorpo. A determinação quanto ao que constitui uma região FR ou CDR é usualmente feita comparando-se a sequência de aminoácidos de vários anticorpos produzidos na mesma espécie. As regras gerais para identificação das regiões de CDR e de FR são de conhecimento geral daquele versado na técnica e podem, por exemplo, ser encontradas na website (www.bioinf.org.uk/abs/).

[006] Em geral, há ainda uma clara necessidade por novas maneiras para induzir a regeneração de tecido neural seguinte à lesão do sistema nervoso central (SNC) adulto.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[007] A invenção é direcionada a um anticorpo monoclonal humano novo com propriedades superiores na modulação da atividade

de NogoA em experimentos *in vitro* e *in vivo* e com uma influência positiva na regeneração neuronal seguinte à lesão no sistema nervoso central (SNC) adulto. Portanto, a invenção proporciona novas moléculas de ligação para a proteína NogoA ou seus fragmentos.

[008] Portanto, em uma modalidade, a invenção proporciona uma molécula isolada que compreende pelo menos um sítio de ligação de antígeno que se liga especificamente ao polipeptídeo de NogoA humano (SEQ ID NO:2) ou NiG humano (SEQ ID NO:3), o dito sítio de ligação de antígeno que compreende:

- * em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-H1, CDR-H2, e CDR-H3, em que cada uma das regiões hipervariáveis é pelo menos 90% idêntica às regiões hipervariáveis CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 9) e CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10), respectivamente; e

- * em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-L1, CDR-L2, e CDR-L3, em que cada uma das regiões hipervariáveis são pelo menos 90% idênticas às regiões hipervariáveis CDR-L1- 6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2- 6A3 (SEQ ID NO: 12) e CDR-L3- 6A3 (SEQ ID NO: 13), respectivamente.

[009] Em outra modalidade, o sítio de ligação de antígeno da dita molécula isolada da invenção compreende:

- * em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-H1- 6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2- 6A3 (SEQ ID NO: 9) e CDR-H3- 6A3 (SEQ ID NO: 10); e

- * em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-L1- 6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2- 6A3 (SEQ ID NO: 12) e CDR-L3- 6A3 (SEQ ID NO: 13).

[010] Em ainda outra modalidade, a invenção proporciona uma molécula de ligação que compreende:

- * pelo menos uma cadeia pesada de imunoglobulina ou seu

fragmento, que compreende (i) um domínio variável que compreende, em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-H1- 6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2- 6A3 (SEQ ID NO: 9) e CDR-H3- 6A3 (SEQ ID NO: 10) e (ii) a parte constante ou seu fragmento, que compreende (i) um domínio variável que compreende, em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-L1- 6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2- 6A3 (SEQ ID NO: 12) e CDR-L3- 6A3 (SEQ ID NO: 13) e (ii) a parte constante ou seu fragmento de uma cadeia leve humana.

[011] Em outra modalidade, a molécula de ligação, de acordo com a invenção, tem uma constante de dissociação $< 1.000\text{nM}$.

[012] Em uma modalidade alternativa da molécula de ligação da invenção, a parte constante ou seu fragmento da cadeia pesada humana é do tipo $\gamma 4$ e a parte constante ou seu fragmento da cadeia leve humana é do tipo κ .

[013] Em uma modalidade subsequente, a molécula de ligação, de acordo com a invenção, é um anticorpo monoclonal humano ou quimérico.

[014] Em ainda outra modalidade, a molécula de ligação, de acordo com a invenção, compreende uma ou mais sequências de polipeptídeos selecionadas do grupo que consiste em SEQ ID NO: 4 (IgG1 pesada), SEQ ID NO: 5 (IgG1 leve), SEQ ID NO: 24 (IgG4 pesada) e SEQ ID NO: 25 (IgG4 leve).

[015] Além disso, a invenção proporciona também um polinucleotídeo isolado que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma molécula de ligação de acordo com a invenção.

[016] Em certas modalidades, o dito polinucleotídeo isolado da invenção compreende ou:

* pelo menos uma das sequências de polinucleotídeos selecionadas do grupo que consiste em SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15

e SEQ ID NO:16; ou

- * pelo menos uma das sequências de polinucleotídeos selecionadas do grupo que consiste em SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18 e SEQ ID NO:19.

[017] Em modalidades preferidas, o dito polinucleotídeo da invenção compreende:

- * uma sequência de polinucleotídeos que compreende em sequência SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 e SEQ ID NO:16; e

- * uma sequência de polinucleotídeos que compreende em sequência SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18 e SEQ ID NO:19.

[018] Em ainda outra modalidade preferida, o dito polinucleotídeo da invenção compreende:

- * a sequência de polinucleotídeos da SEQ ID NO:6 e/ou a sequência de polinucleotídeos da SEQ ID NO:7, ou

- * a sequência de polinucleotídeos da SEQ ID NO:26 e/ou a sequência de polinucleotídeos da SEQ ID NO:28.

[019] Adicionalmente, a presente invenção proporciona também um vetor de expressão que compreende um polinucleotídeo de acordo com a invenção conforme definição acima.

[020] Além disso, a invenção proporciona um sistema de expressão que compreende o vetor de expressão conforme definido acima, em que o dito sistema de expressão ou parte deste é capaz de produzir um polipeptídeo da invenção conforme definido acima, quando o dito sistema de expressão ou parte deste está presente em uma célula hospedeira compatível.

[021] Ainda, a presente invenção proporciona também uma célula hospedeira isolada que compreende o vetor conforme definido acima.

[022] Ademais, a presente invenção proporciona também uma composição isolada que compreende a molécula de ligação de acordo com a invenção e um veículo.

[023] Além disso, a presente invenção proporciona também uma composição isolada que compreende o polinucleotídeo de acordo com a invenção, e um veículo.

[024] Ainda, a presente invenção proporciona também uma composição isolada que compreende o vetor de expressão de acordo com a invenção, ou uma célula hospedeira de acordo com a invenção.

[025] A invenção proporciona ainda um método para administrar uma molécula de ligação de acordo com a invenção a uma pessoa em necessidade de tratamento de uma doença do sistema nervoso periférico (SNP) e/ou sistema nervoso central (SNC).

[026] A invenção proporciona também uma composição farmacêutica que compreende uma molécula de ligação de acordo com a invenção, um polinucleotídeo de acordo com a invenção, um vetor de expressão ou sistema de expressão de acordo com a invenção, respectivamente, ou uma célula hospedeira de acordo com a invenção, em associação com pelo menos um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável. Em certa modalidade, a dita composição é uma composição de liberação lenta.

[027] A invenção proporciona também um método para o tratamento de uma doença do sistema nervoso periférico (SNP) e/ou central (SNC) que compreende administrar a um paciente em necessidade de tal tratamento uma quantidade eficaz de uma molécula de ligação de acordo com a invenção, um polinucleotídeo de acordo com a invenção, um vetor ou sistema de expressão de acordo com a invenção, respectivamente, ou uma célula hospedeira de acordo com a invenção. Em uma modalidade preferida, a doença é uma doença neurodegenerativa selecionada do grupo que consiste em mal de Alzheimer, mal de Parkinson, Esclerose lateral amiotrófica (ALS), patologias similares a Lewy ou outras demências em geral, doenças pós-trauma craniano, cerebral ou espinhal, acidente vascular cerebral e

uma doença desmielinizante. Em outra modalidade preferida, a doença desmielinizante é selecionada do grupo que consiste em esclerose múltipla, desmielinização monofásica, encefalomielite, leucoencefalopatia multifocal, panencefalite, doença de Marchiafava-Bignami, mielinólise pontina, adrenoleucodistrofia, doença de Pelizaeus-Merzbacher, degeneração esponjosa, doença de Alexander, doença de Canavan, leucodistrofia metacromática e doença de Krabbe.

[028] Alternativamente, a doença é uma doença ocular degenerativa, que pode envolver direta ou indiretamente a degeneração de células retinianas ou corneanas. Em uma modalidade preferida, a doença ocular degenerativa é selecionada do grupo que consiste em retinopatias isquêmicas, neuropatia óptica isquêmica anterior, neurite óptica, degeneração macular relacionada à idade, retinopatia diabética, edema macular cistoide (CME), retinite pigmentar, doença de Stargardt, degeneração retiniana viteliforme de Best, aumrose congênita de Leber e outras degenerações retinianas hereditárias, miopia patológica, retinopatia de prematuridade, e neuropatia óptica hereditária de Leber, pós-efeitos de transplante de córnea ou de cirurgia corneana refratária, e ceratite por herpes.

[029] Alternativamente, a doença é uma condição psiquiátrica. Preferivelmente, a dita condição psiquiátrica é selecionada do grupo que consiste em esquizofrenia e depressão.

[030] Nos métodos de tratamento conforme indicados acima, a administração é preferivelmente realizada intracranialmente ou intratecalmente.

[031] Além disso, a invenção também proporciona um método para produzir a molécula de ligação de acordo com a invenção, que compreende expressar o polinucleotídeo de acordo com a invenção em um vetor ou sistema de expressão de acordo com a invenção, por meio

de tecnologia de DNA recombinante ou por meio de síntese química.

[032] Além disso, a invenção proporciona um método para administrar a composição farmacêutica de acordo com a invenção localmente no sítio de uma lesão.

[033] Finalmente, a invenção proporciona também um método que compreende um ou mais dos seguintes produtos selecionados do grupo que consiste em: uma molécula de ligação de acordo com a invenção, um polinucleotídeo de acordo com a invenção, um vetor ou sistema de expressão de acordo com a invenção, uma célula hospedeira de acordo com a invenção tal como uma preparação combinada para uso simultâneo, separado ou seqüencial no tratamento de uma doença do sistema nervoso periférico (SNP) e/ou sistema nervoso central.

[034] A invenção proporciona ainda um método para produzir uma molécula de ligação da invenção e um polinucleotídeo, um vetor de expressão, por meio de tecnologia de DNA recombinante ou por meio de síntese química que codifica tal molécula de ligação.

[035] A presente invenção proporciona também uma composição farmacêutica que compreende uma molécula de ligação, um polinucleotídeo, um vetor ou sistema de expressão ou uma célula hospedeira de acordo com a presente invenção em associação com pelo menos um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável. Ela também proporciona produtos que contêm a dita molécula de ligação, polinucleotídeo, vetor ou sistema de expressão ou a dita célula hospedeira, ou um seu derivado farmacologicamente aceitável, como uma preparação combinada para uso simultâneo, separado ou seqüencial no tratamento de uma doença do sistema nervoso periférico (SNP) e/ou sistema nervoso central (SNC).

[036] É também contemplado um método de tratamento de uma doença do sistema nervoso periférico (SNP) e/ou sistema nervoso central (SNC), que compreende administrar a um paciente em

necessidade de tal tratamento de uma quantidade eficaz de uma molécula de ligação, um polinucleotídeo, um vetor ou sistema de expressão ou uma célula hospedeira da presente invenção.

[037] A presente invenção indica ainda nos exemplos que as composições farmacológicas e os produtos podem ser usados para liberação lenta da molécula de ligação e/ou para deposição local da molécula de ligação no sítio de lesão.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1:

[038] Nucleotídeo (SEQ ID NO:7) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:5) que codificam as regiões variáveis da cadeia leve do anticorpo 6A3-IgG1. A seção sublinhada indica o peptídeo líder (SEQ ID NO:22) e a sequência de nucleotídeos que codifica o mesmo.

Figura 2:

[039] Nucleotídeo (SEQ ID NO:6) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:4) que codificam regiões variáveis da cadeia pesada do anticorpo 6A3-IgG1. A seção sublinhada indica o peptídeo (SEQ ID NO:20) e a sequência de nucleotídeos que codifica a mesma (SEQ ID NO:21).

Figura 3:

[040] Regiões de codificação da parte variável leve (SEQ ID NO:29; superior) e pesada (SEQ ID NO:26; inferior) de 6A3-Ig4.

Figura 4:

[041] Sequências de aminoácidos da parte variável da cadeia pesada (SEQ ID NO:24; inferior) e leve (SEQ ID NO:25, superior) de 6A3-Ig4 e constante. O peptídeo líder de a cadeia leve (SEQ ID NO:31) e a pesada (SEQ ID NO:30) são indicados em itálico.

Figura 5:

[042] Superior: aminoácido de cadeia leve de anticorpo 6A3-IgG1 (SEQ ID NO:5) com sequências líder (SEQ ID NO:22) e CDR-L1 (SEQ

ID NO:8), CDR-L2 (SEQ ID NO:9) e CDR-L2 (SEQ ID NO:10).

Figura 6:

[043] RT-PCR usando RNA de M03-13 como iniciadores de modelo e específico para Nogo-A resultou em um fragmento de DNA distinto de cerca de 200 pb.

Figura 7:

[044] Detecção por immunoblot de Nogo-A imunoprecipitado a partir de lipídios de células M03: 13 usando anticorpo 6A3.

[045] Depois da imunoprecipitação (IP) dos lisados de células M03.13 e imunodetecção com o anticorpo Nogo-A anti 6A3, uma banda forte única no tamanho esperado (190 kDa) foi detectada tanto para 6A3-IgG4 (faixa 4) como para 11C7-IgG1 (faixa 6).

Figura 8:

[046] Figura 8a: Coloração imunofluorescente de células M03.13.

[047] Figura 8b: Coloração imunofluorescente de células HOG.

[048] Coloração imunofluorescente de células M03-13 e células HOG com o anticorpo 6A3-IgG4 e secundário anti-humano marcado com Alexa-Fluor 488 resultou em coloração muito clara das células (Figura 8a e 8b, parte direita), ao passo que virtualmente nenhum sinal foi detectado com somente o anticorpo secundário (parte direita).

Figura 9:

[049] Anticorpo 6A3 em concentrações séricas medidas em 6 pacientes até dois meses.

Figura 10:

[050] Anticorpo 6A3 em concentrações em CSF em 6 pacientes até dois meses.

Figura 11:

[051] Tratamento de anticorpo 6A3 em modelo de SCI de macaco, a taxa e grau da recuperação funcional de tamanho independente da lesão.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[052] Na busca por maneiras novas e aperfeiçoadas para proporcionar regeneração neuronal seguinte à lesão no sistema nervoso central (SNC) adulto, foi agora surpreendentemente verificado que um novo anticorpo humano monoclonal 6A3, que foi gerado no HuMabmouse® por Medarex Inc., camundongos geneticamente reconstituídos em que o genes de imunoglobulina humana repõem seus equivalentes murinos, tem propriedades superiores na modulação da atividade NogoA em experimentos in vitro e in vivo. 6A3 foi produzido contra NiG, é do isótipo de IgG e tem propriedades melhores que os anticorpos NogoA descritos na técnica anterior. É agora possível construir outras moléculas de ligação NogoA tendo as mesmas regiões hipervariáveis que o dito anticorpo 6A3, criando novos anticorpos tendo as propriedades vantajosas de 6A3. Derivados dos 6A3-Ab, 6A3-IgG4 e 6A3-Fab reconhecem o NIG humano com alta afinidade de 0,14 nM e 1,1 nM, respectivamente. Além disso, os anticorpos da presente invenção mostram uma alta estabilidade e meia-vida prolongada in vitro e in vivo e retenção. Finalmente, a molécula de ligação e os anticorpos da invenção mostram uma liberação lenta do sítio de introdução, criando deposições locais das moléculas de ligação no sítio de lesão possível. Foram detectadas altas concentrações cerebrospinais (CSF) do anticorpo 6A3 nos animais e pacientes com lesão na medula espinhal por infusão contínua. Essa retenção e residência surpreendentemente alta de 6A3-Ab em, por exemplo, o fluido cerebrospinal torna possível usar injeções de bolo (de, por exemplo, 1 a 3 vezes por semana, mesmo intervalos mais longos de uma vez por 2, 3 ou 4 semanas podem ser factíveis) em vez de fazer constantemente infusão do anticorpo no fluido cerebrospinal. Injeções de bolo intratecais repetidas podem ser usadas. Em uma modalidade preferida, a administração é efetuada através da administração intratecal, por exemplo, usando um cateter

exteriorizado conectado a uma bomba portátil. Em outra modalidade preferida, é usada injeção de bolo intratecal. A seção experimental ilustra ainda as propriedades das moléculas de ligação da invenção.

[053] Por conseguinte, a invenção proporciona moléculas de ligação à NogoA ou NiG (daqui por diante referidas como "as Moléculas de Ligação da invenção" ou simplesmente "Moléculas de Ligação"). Preferivelmente, as Moléculas de Ligação da invenção se ligam à proteína NogoA humana (SEQ ID NO:2, codificada pela SEQ ID NO:1) ou proteína NiG humana (que é o fragmento inibidor de desenvolvimento de neurite mais potente de NogoA e começa no aminoácido N° 186 e termina no aminoácido N° 1004 de NogoA humana, = SEQ ID NO:3), preferivelmente com uma constante de dissociação (K_d) < 1000nM, ou com uma K_d até e incluindo 100nM, mais preferivelmente com uma K_d < 100nM, ou com uma K_d até e incluindo 100nM, mais preferivelmente com uma K_d < 10nM ou com uma K_d até e incluindo 10nM. A reação de ligação pode ser mostrada por métodos padrão (incluindo ambos os ensaios qualitativos e quantitativos) incluindo, por exemplo, Western blotting, métodos de imunoprecipitação e afinidade por biossensores (cf. Exemplo 4). Além disso, a ligação das Moléculas de Ligação da invenção à NogoA humana e NiG humana, e a eficácia destas moléculas de ligação nos ensaios funcionais podem ser escolhidas em um ensaio de desenvolvimento de neurite, por exemplo, conforme descrito abaixo.

[054] Assim, em outra modalidade preferida, as Moléculas de Ligação da presente invenção (em uma concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, preferivelmente 10 $\mu\text{g/mL}$, mais preferivelmente a 1,0 $\mu\text{g/mL}$, ainda mais preferivelmente a 0,1 $\mu\text{g/mL}$) aumentam o número de neuritos de células granulares do cerebelo de rato em um substrato de extrato de proteína de cérebro de macaco de pelo menos 20%, preferivelmente 50%, mais preferivelmente 80%, quando em comparação com vários

neuritos de células granulares de cerebelo de rato que são tratados com um anticorpo de controle que não se liga ao polipeptídeo NogoA humano ou polipeptídeo NiG humano (isto é, que tem uma constante de dissociação $> 1.000\text{nM}$).

[055] Em outra modalidade, a invenção se refere a uma molécula isolada que compreende pelo menos um sítio de ligação de antígeno que se liga especificamente ao polipeptídeo NogoA humano ou polipeptídeo NiG humano (SEQ ID NO:3), compreende pelo menos um sítio de ligação de antígeno, em que o dito sítio de ligação de antígeno compreende:

* pelo menos uma das regiões hipervariáveis CDR-H1, CDR-H2, e CDR-H3, em que cada uma das regiões hipervariáveis é pelo menos 90% idêntica às regiões hipervariáveis de CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO:8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO:9) e CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10), respectivamente; e

* pelo menos uma das regiões hipervariáveis CDR-L1, CDR-L2, e CDR-L3, em que cada uma das regiões hipervariáveis é pelo menos 90% idêntica às regiões hipervariáveis da CDR-L1- 6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2- 6A3 (SEQ ID NO: 12) e CDR-L3- 6A3 (SEQ ID NO: 13), respectivamente.

[056] Reconhecimento específico da NogA ou NiG humana quando CDR-H3 ou CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 estão presentes na molécula de ligação da presente invenção. No entanto, é conhecido por aquele versado na técnica que mesmo a presença de somente um domínio de CDR na molécula de ligação pode ser suficiente para assegurar a ligação específica para a molécula reconhecida. A frase "pelo menos uma das regiões hipervariáveis" significa 1, ou 2 ou 3 regiões hipervariáveis. A frase "pelo menos 90% de identidade" significa mais que 90% de identidade, preferivelmente mais que 91%, 92%, 93%; 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade. A percentagem de

identidade entre duas sequências de aminoácidos pode ser determinada usando-se um algoritmo de computador que analisa a identidade relativa de identidade de duas ou mais sequências de aminoácidos, por exemplo, Basic Local Alignment Search Tool, (BLAST) no website do National Institutes of Health, Altschul et al. 1994, Nature Genetics, 6:119-129, Altschul et al. 1990, J. Mol. Biol.215:403-410, Altschul et al. 1997,Nucleic Acids Research, 25:1389-1402, Karlin e Altschul, 1990 PNAS, 87:2264-68, Karlin e Altschul, 1993 PNAS, 90:5873-68.

[057] A presente invenção refere-se a uma molécula isolada que compreende pelo menos um sítio de ligação de antígeno, que se liga especificamente ao polipeptídeo NogoA humano (SEQ ID NO:2) ou NiG humano (SEQ ID NO:3) com uma constante de dissociação $< 1.000\text{nM}$, em que o dito sítio de ligação de antígeno compreende:

* pelo menos as regiões hipervariáveis CDR-H1, CDR-H2, e CDR-H3, em que cada uma das regiões hipervariáveis é pelo menos 90% idêntica às regiões hipervariáveis de CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO:8). CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO:9) e CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10), respectivamente; e

* pelo menos as regiões hipervariáveis CDR-L1, CDR-L2, e CDR-L3, em que cada uma das regiões hipervariáveis é pelo menos 90% idêntica às regiões hipervariáveis da CDR-L1- 6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2- 6A3 (SEQ ID NO: 12) e CDR-L3- 6A3 (SEQ ID NO: 13), respectivamente.

[058] A frase "sítio de ligação de antígeno que compreende, em sequência, as regiões hipervariáveis" engloba um sítio de antígeno no qual as regiões hipervariáveis não são contíguas uma com a outra; preferivelmente as ditas regiões de anticorpo são interdispersas com regiões de estrutura de anticorpo, ou com sequência que são sequência de estrutura de não-anticorpo, preferivelmente regiões de estrutura de

anticorpo humano.

[059] De acordo com a presente invenção, a molécula de ligação pode compreender também pelo menos um sítio de ligação de antígeno, em que o dito sítio de ligação de antígeno compreende ou:

- * em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-H1- 6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2- 6A3 (SEQ ID NO: 9) e CDR-H3- 6A3 (SEQ ID NO: 10); ou

- * em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-L1- 6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2- 6A3 (SEQ ID NO: 12) e CDR-L3- 6A3 (SEQ ID NO: 13); ou

- * equivalentes diretos destas, que são pelo menos 90% idênticos à sequência das ditas regiões hipervariáveis. A frase "pelo menos 90%" de identidade significa mais que 90% de identidade, preferivelmente mais que 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade.

[060] De acordo com a presente invenção, a molécula de ligação pode compreender também:

- * um primeiro sítio de ligação de antígeno que compreende, em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-H1- 6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2- 6A3 (SEQ ID NO: 9) e CDR-H3- 6A3 (SEQ ID NO: 10); e

- * um segundo sítio de ligação de antígeno que compreende, em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-L1- 6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2- 6A3 (SEQ ID NO: 12) e CDR-L3- 6A3 (SEQ ID NO: 13); ou

- * equivalentes diretos destas, que são pelo menos 90% idênticos à sequência das ditas regiões hipervariáveis. Pelo menos 90% de identidade significam mais que 90% de identidade, preferivelmente mais que 91%, 92%, 93%; 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%.

[061] De acordo com a presente invenção, a molécula de ligação pode compreender também:

- * pelo menos uma cadeia pesada de imunoglobulina ou

fragmento desta, que compreende (i) um domínio variável que compreende, em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-H1- 6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2- 6A3 (SEQ ID NO: 9) e CDR-H3- 6A3 (SEQ ID NO: 10); e (ii) a parte constante ou seu fragmento de uma cadeia pesada humana; e

* pelo menos uma cadeia leve de imunoglobulina ou fragmento desta, que compreende (i) um domínio variável que compreende, em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-L1- 6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2- 6A3 (SEQ ID NO: 12) e CDR-L3- 6A3 (SEQ ID NO: 13); ou

* equivalentes diretos destas, que são pelo menos 90% idênticas à sequência das ditas regiões hipervariáveis. Pelo menos 90% de identidade significam mais que 90% de identidade, preferivelmente mais que 91%, 92%, 93%; 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade.

[062] Na molécula de ligação da presente invenção, a parte constante ou seu fragmento da cadeia pesada humana pode ser do tipo gama (γ), preferivelmente do tipo gama 4 (γ) e a parte constante ou seu fragmento da cadeia leve humana pode ser do tipo lambda (λ) ou preferivelmente (κ). Além disso, a molécula de ligação da presente invenção pode ser um anticorpo monoclonal humano, parcialmente humano ou quimérico ou humanizado.

[063] De acordo com a presente invenção, a molécula de ligação pode compreender uma ou mais sequências de polipeptídeos conforme mostradas em qualquer uma de SEQ ID NO:4 (IgG1 pesada), SEQ ID NO:5 (IgG1 leve), SEQ ID NO:24 (IgG4 pesada) e SEQ ID NO:25 (IgG4 leve).

[064] Em outra modalidade preferida, a Molécula de Ligação da presente invenção compreende pelo menos um sítio de ligação de antígeno, em que o dito sítio de ligação de antígeno compreende, em

sequência, as regiões hipervariáveis CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3 e CDR-H3-6A3; a dita CDR-H1-6A3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID No:8, a dita CDR-H2-6A3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO:9, e a dita CDR-H3-6A3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO:10; e os equivalentes diretos destas, que são pelo menos 90% idênticos à sequência das ditas regiões hipervariáveis. Pelo menos 90% de identidade significam mais que 90% de identidade, preferivelmente mais que 91%, 92%, 93%; 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade.

[065] Em outro aspecto da invenção, a Molécula de Ligação da presente invenção compreende pelo menos:

a) um primeiro domínio que compreende, em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3 e CDR-H3-6A3; a dita CDR-H1-6A3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:8, a dita CDR-H2-6A3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO:9, e a dita CDR-H3-6A3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO:10; e

b) um segundo domínio que compreende, em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-L1-6A3, CDR-L2-6A3 e CDR-L3-6A3; a dita CDR-L1-6A3 tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:11, a dita CDR-L2-6A3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO:12, e a dita CDR-L3-6A3 tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO:13; e) os equivalentes diretos destas, que são pelo menos 90% idênticos à sequência das ditas regiões hipervariáveis. Pelo menos 90% de identidade significam mais que 90% de identidade, preferivelmente mais que 91%, 92%, 93%; 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade.

[066] Além disso, a invenção também proporciona a seguinte Molécula de Ligação da Invenção, que compreende pelo menos um sítio de ligação de antígeno, que compreende:

a) ou a região variável da cadeia pesada 6A3 (SEQ ID NO:4);

ou

b) a região variável da cadeia leve de 6A3 (SEQ ID NO:5), ou equivalentes diretos desta que são pelo menos 90% idênticos à sequência das ditas regiões hipervariáveis.

[067] Quando o sítio de ligação de antígeno compreende tanto o primeiro como o segundo domínios, esses podem estar localizados na mesma molécula de polipeptídeo ou, preferivelmente, cada domínio pode estar em uma cadeia diferente, em que o primeiro domínio é parte de uma cadeia pesada de imunoglobulina ou fragmento desta e o segundo domínio é parte de uma cadeia leve de imunoglobulina ou fragmento desta.

[068] Exemplos de Moléculas de Ligação da invenção incluem anticorpos conforme produzidos por células B ou hibridomas ou anticorpos humanos ou quiméricos ou humanizados ou qualquer fragmento destes, por exemplo, F(ab')₂; e fragmentos Fab, bem como anticorpos de cadeia simples ou de domínio simples, conforme descritos na Publicação de Patente US20070065440A1.

[069] Conforme usado aqui, um "anticorpo de domínio simples" é um domínio variável que pode se ligar especificamente a um epítopo ou a um antígeno ou a um ligante independentemente de outro domínio de ligação Variável que se liga àquele epítopo, antígeno ou ligante. Um anticorpo do domínio simples pode estar presente em um homo- ou heteromultímero com outros domínios de VH ou VL, onde os outros domínios não são requeridos para ligação de antígeno pelo anticorpo de domínio simples, ou seja, onde o anticorpo de domínio simples se liga ao antígeno independentemente dos domínios VH ou VL adicionais. Em uma modalidade preferida, um anticorpo de domínio simples compreende um domínio simples de VH isolado ou um domínio simples de VL isolado. Técnicas para obtenção de um anticorpo de domínio simples com pelo menos alguma da especificidade de ligação do

anticorpo intacto do qual eles são derivados são conhecidos da técnica. Por exemplo, Ward, et al., em "Binding Activities of a Repertoire of immunoglobulin Variable Domains Secretes from *Escherichia coli*", *Nature* 341:644-646, descrevem um método de seleção para obter uma região variável de cadeia pesada de anticorpo (anticorpo de domínio simples de VH) com afinidade suficiente com seu epítipo alvo para se ligar ao mesmo de forma isolada.

[070] Um anticorpo de cadeia simples consiste nos domínios/regiões variáveis de cadeias leves e pesadas de anticorpo covalentemente ligadas por um ligante de peptídeo que consiste usualmente em de 10 a 30 aminoácidos, preferivelmente de 15 a 25 aminoácidos. Métodos preferidos incluem o uso de ligantes de polipeptídeos, conforme descritos, por exemplo, em conexão com moléculas de scFv (Bird et al., (1988) *Science* 242:423-426). Portanto, tal estrutura não inclui a parte constante das cadeias leves e pesadas e acredita-se que o espaçador de peptídeo pequeno deve ser menos antigênico que uma parte constante total. Por "anticorpo quimérico" deve ser entendido um anticorpo no qual as regiões constantes de a cadeia pesada ou a cadeia leve, ou ambas, se originam de uma primeira espécie, enquanto as regiões variáveis de ambas as cadeias pesada e leve se originam de uma segunda espécie. Preferivelmente, um "anticorpo quimérico é um anticorpo no qual as regiões constantes das cadeias pesadas e leves, ou ambas, são de origem humana enquanto que os domínios variáveis de ambas as cadeias pesada e leve são de origem não-humana (por exemplo, murino, macaco, rato, porco, camundongo, galinha, aves). Por "anticorpo humanizado" deve ser entendido um anticorpo no qual as regiões hipervariáveis (CDRs) são de origem não-humana (por exemplo, murino, ao passo que todas ou substancialmente todas as outras partes da imunoglobulina, por exemplo, as regiões constantes e as partes altamente conservadas dos

domínios variáveis, isto é, as regiões de estrutura, são de origem humana. Contudo, um anticorpo humanizado pode reter uns poucos aminoácidos da sequência de murino nas partes das regiões de estrutura adjacentes às regiões hipervariáveis.

[071] As regiões hipervariáveis podem ser associadas a qualquer tipo de regiões de estrutura, preferivelmente de murino ou de origem humana. Regiões de estrutura adequadas são descritas em "Sequences of proteins of immunological interest", Kabat E.A. et al, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health. Preferivelmente, a parte constante de uma cadeia pesada humana das Moléculas de Ligação podem ser do tipo IgG, mais preferivelmente do tipo IgG4, inclusive subtipos, preferivelmente a parte constante de uma cadeia leve humana pode ser do tipo lambda (λ) ou capa (κ), mais preferivelmente do tipo capa (κ).

[072] Anticorpos monoclonais produzidos contra uma proteína naturalmente encontrada em todos os humanos podem ser desenvolvidos em um sistema não-humano, por exemplo, em camundongos. Como consequência direta disso, um anticorpo xenogênico conforme produzido por hibridoma, quando administrado a humanos, gera uma imunorresposta indesejável, que é predominantemente mediada pela parte constante da imunoglobulina xenogênica. Isso limita claramente o uso de tais anticorpos na medida em que eles podem ser administrados por um período de tempo prolongado. Portanto, é particularmente preferido usar anticorpos quiméricos ou humanizados, de cadeia simples, de domínio simples, que não são prováveis de produzirem uma resposta alogênica quando administrados a humanos.

[073] Em vista do acima, a Molécula de Ligação da invenção pode ser selecionada também de um anticorpo quimérico que compreende pelo menos:

a) uma cadeia pesada de imunoglobulina ou fragmento desta, que compreende (i) um domínio variável que compreende, em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3 e CDR-H3-6A3 e (ii) a parte constante ou fragmento desta de uma cadeia pesada humana; a dita CDR-H1-6A3 tendo a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:8), a dita CDR-H2-6A3 tendo a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:9), e a dita CDR-H3-6A3 tendo a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:10), e

b) uma cadeia leve de imunoglobulina ou fragmento desta, que compreende (i) um domínio variável que compreende, em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-L1-6A3, CDR-L2-6A3 e CDR-L3-6A3 e (ii) a parte constante ou fragmento desta de uma cadeia pesada humana; a dita CDR-L1-6A3 tendo a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:11), a dita CDR-L2-6A3 tendo a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:12), e a dita CDR-L3-6A3 tendo a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:13), ou

[074] equivalentes diretos destas que compreendem regiões que são pelo menos 90% idênticos às sequências das ditas regiões hipervariáveis.

[075] Alternativamente, uma Molécula de Ligação da invenção pode ser selecionada de uma molécula de ligação de cadeia simples, que compreende um sítio de ligação de antígeno que compreende:

a) um primeiro domínio que compreende, em sequência, as hipervariáveis CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3 e CDR-H3-6A3; a dita CDR-H1-6A3 tendo a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:8), a dita CDR-H2-6A3 tendo a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:9), e a dita CDR-H3-6A3 tendo a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:10), e

b) um segundo domínio que compreende, em sequência, as hipervariáveis CDR-L1-6A3, CDR-L2-6A3 e CDR-L3-6A3; a dita CDR-L1-6A3 tendo a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:11), a dita CDR-

L2-6A3 tendo a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:12), e a dita CDR-L3-6A3 tendo a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:13); e

c) um ligante de peptídeo que é ligado ou na extremidade N-terminal do primeiro domínio e à extremidade C-terminal do segundo domínio ou à extremidade C-terminal do primeiro domínio e à extremidade terminal do segundo domínio;

[076] ou seus equivalentes diretos que são pelo menos 90% idênticos à sequência das ditas regiões hipervariáveis.

[077] Conforme é bem conhecido, alterações secundárias em uma sequência de aminoácidos tal como deleção, adição ou substituição de um ou vários aminoácidos podem levar a uma forma alélica da proteína original que tem propriedades substancialmente idênticas. Assim, o termo "equivalentes diretos destes" deve ser entendido como sendo qualquer região hipervariável, qualquer sítio de ligação de antígeno, qualquer cadeia de anticorpo ou fragmento deste, ou qualquer Molécula de Ligação da invenção (molécula 6A3)

(i) na qual cada uma das regiões hipervariáveis CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 da Molécula de Ligação é pelo menos 90% idêntica, mais preferivelmente 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% idêntica às regiões hipervariáveis equivalentes de CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 9) e CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10), ao passo que CDR-H1 é equivalente à CDR-H1-6A3, CDR-H2 é equivalente a CDR-H2-6A3, CDR-H3 é equivalente a CDR-H3-6A3; e

(ii) que é capaz de se ligar à NogoA humana ou à NiG humana, preferivelmente com uma constante de dissociação (K_d) < 1.000nM, mais preferivelmente com uma K_d < 100nM, mais preferivelmente com uma K_d < 10nM, ou

[078] qualquer molécula de ligação da invenção que tem pelo menos um, preferivelmente dois domínios por sítio de ligação (molécula 6A3).

(iii) em cada uma das regiões hipervariáveis CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 é pelo menos 90% idêntica, mais preferivelmente pelo menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% idêntica às regiões hipervariáveis equivalentes de CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 9), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 10), CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO: 12), e CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO: 13), ao passo que CDR-H1 é equivalente a CDR-H1-6A3, CDR-H2 é equivalente a CDR-H2-6A3, CDR-H3 é equivalente a CDR-H3-6A3, CDR-L1 é equivalente a CDR-L1-6A3, CDR-L2 é equivalente a CDR-L2-6A3, CDR-L3 é equivalente a CDR-L3-6A3; e

(iv) que é capaz de se ligar à NogoA humana ou à NiG humana, preferivelmente com uma constante de dissociação (K_d) < 1.000nM, mais preferivelmente com uma K_d < 100nM, mais preferivelmente com uma K_d < 10nM.

[079] Assim, outras modalidades da invenção são, por exemplo, uma Molécula de Ligação que é capaz de se ligar à NogoA humana ou à NiG humana com uma constante de dissociação < 1.000nM e compreende pelo menos um sítio de ligação de antígeno, em que o dito sítio de ligação de antígeno compreende ou

* em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, em que cada uma das regiões hipervariáveis é pelo menos 90%, preferivelmente 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% idêntica às regiões hipervariáveis CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 9), e CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10), respectivamente; e/ou

* em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3, em que cada uma das regiões hipervariáveis é pelo menos 90%, preferivelmente 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% idêntica às regiões hipervariáveis CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO: 12), e CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO: 13), respectivamente.

[080] Além disso, uma Molécula de Ligação, conforme descrita aqui, é capaz de se ligar à NogoA humana ou à NiG humana com uma constante de dissociação $< 1.000\text{nM}$ e compreende:

* um primeiro sítio de antígeno que compreende, em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, em que cada uma das regiões hipervariáveis é pelo menos 90%, preferivelmente 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% idêntica às regiões hipervariáveis CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 9), e CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10), respectivamente; e

* um segundo sítio de ligação de antígeno que compreende, em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3, em que cada uma das regiões hipervariáveis é pelo menos 90%, preferivelmente 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% idêntica às regiões hipervariáveis CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO: 12), e CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO: 13), respectivamente.

[081] Essa constante de dissociação pode ser convenientemente testada em vários ensaios, incluindo, por exemplo, o método de afinidade por biossensor (BIAcore) (vide acima). Além disso, o efeito de ligação e o efeito funcional das Moléculas de Ligação podem ser mostrados em um bioensaio, por exemplo, conforme descrição acima.

[082] A parte constante de uma cadeia pesada humana pode ser do tipo $\gamma 1$; $\gamma 2$; $\gamma 3$; $\gamma 4$; $\alpha 1$; $\alpha 2$; δ ou ϵ , preferivelmente do tipo γ , mais preferivelmente do tipo $\gamma 4$; ao passo que a parte constante da cadeia leve humana pode ser do tipo λ ou do tipo κ (que inclui os subtipos $\lambda 1$; $\lambda 2$; $\lambda 3$; e $\lambda 4$), mas é preferivelmente do tipo κ . A sequência de aminoácidos de todas as partes constantes é fornecida por Kabat et al. (acima).

[083] Conjugados das moléculas de ligação da invenção, por exemplo, enzima ou toxina ou conjugados de radioisótopos, estão também incluídos no escopo da invenção. Em outro aspecto, uma

composição contendo a molécula de ligação NogoA ou NiG é estabilizada *in vivo* por ligação ou associação com uma fração estabilizadora polimérica (não polipeptídica), tal como glicosilação, conforme obténível por processos *in vitro* e *in vivo*. Exemplos desse tipo de estabilização são descritos, por exemplo, em WO99/64460 (Chapman et al.) e EP1.160.255 (King et AL.), cada um dos quais é aqui incorporado a título de referência. Especificamente, essas referências descrevem o uso de moléculas de polímeros sintéticos ou naturais, tais como polialquileno, polialquenilenos, polioxialquilenos ou polissacarídeos, para aumentar a vida de prateleira de polipeptídeos de imunoglobulina. Um exemplo típico de uma fração estabilizadora é polietileno glicol ou PEG, um polialquileno. O processo de ligar PEG a um polipeptídeo de imunoglobulina está descrito nessas referências e é referido aqui como "PEGuilação". Conforme descrito lá, uma molécula de ligação de NogoA ou NiG pode ser Peguilada aleatoriamente, como por ligação de PEG à lisina ou a outros aminoácidos na superfície da molécula de ligação de NogoA ou NiG, ou especificamente a sítio, por exemplo, através de ligação de PEG a um resíduo de cisteína de superfície introduzido artificialmente. Dependendo da molécula de ligação de NogoA ou NiG, pode ser preferido usar um método não aleatório de ligação de polímero, porque a ligação aleatória, por ligação no ou próximo ao sítio ou sítios de ligação de antígeno na molécula altera frequentemente a afinidade ou especificidade da molécula com respeito ao seu antígeno-alvo.

[084] É preferido que a adição de PEG ou de outro polímero não interfira com a afinidade ou especificidade do antígeno da molécula de ligação de NogoA ou NiG a anticorpo. Por "não interfere com a afinidade ou especificidade de ligação do antígeno" deve ser entendido que a molécula de ligação de NogoA ou NiG ligada ao PEG tem uma IC50 ou ND50 que não é mais que 10% maior que a IC50 ou ND50,

respectivamente, de uma molécula de ligação NogoA ou NiG ligada a não PEG tendo o mesmo domínio variável simples de anticorpo. Na alternativa, a frase "não interfere com a afinidade ou especificidade por ligação de antígeno" significa que a forma ligada a PEG da molécula de ligação NogoA ou NiG retém pelo menos 90% da atividade de ligação de antígeno da forma não Peguilada do polipeptídeo.

[085] O PEG ou outro polímero útil para aumentar a meia-vida in vivo é geralmente de cerca de 5.000 a 50.000 Daltons de tamanho, por exemplo, cerca de 5.000 kD-10.000 kD, 5.000 kD-15.000 kD, 5.000 kD-20.000 kD, 5.000-25.000 kD, 5.000-30.000 kD, 5.000 kD-35.000 kD, 5.000 kD-40.000 kD, ou cerca de 5.000 kD-45.000. A escolha do tamanho do polímero depende do uso pretendido do complexo. Por exemplo, caso se deseje penetrar em um tecido sólido, por exemplo, um tumor, é vantajoso usar um polímero menor, da ordem de cerca de 5.000 kD. Se, em vez disso, é desejado se manter o complexo em circulação, polímeros maiores, por exemplo, 25.000 kD a 40.000 kD ou mais podem ser usados.

[086] As composições farmacêuticas da invenção podem incluir uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou uma "quantidade profilaticamente eficaz" de uma molécula de ligação de NogoA ou NiG da invenção. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para obtenção do resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz da molécula de ligação de NogoA ou NiG da invenção pode variar de acordo com fatores tais como o estado de doença, idade, sexo, e peso do indivíduo, e a capacidade da molécula de ligação de NogoA ou NiG da invenção para gerar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também uma na qual quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais da molécula de ligação de NogoA ou NiG da invenção são sobrepujados

pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessário, para obtenção do resultado profilático desejado.

[087] Como usada aqui, a frase "se liga especificamente" se refere à ligação de um antígeno por uma molécula de ligação de NogoA ou NiG da invenção com uma constante de dissociação (K_d) de $1\mu\text{M}$ ou menos conforme medido por análise de ressonância de plasmônio de superfície usando, por exemplo, um sistema de ressonância de plasmônio de superfície BIAcore® e software de avaliação cinética BIAcore®.

[088] "Polipeptídeo", se não especificado de outro modo, inclui qualquer peptídeo ou proteína que compreende aminoácidos unidos um ao outro por ligações peptídicas, tendo uma sequência de aminoácidos começando na extremidade N-terminal e finalizando na extremidade C-terminal. Preferivelmente, o polipeptídeo da presente invenção é um anticorpo monoclonal, mais preferido é um anticorpo monoclonal quimérico (também denominado enxertado em V) ou humanizado (também denominado enxertado em CDR). O anticorpo monoclonal humanizado (enxertado em CDR) pode incluir ou não outras mutações introduzidas nas sequências de estrutura (FR) do anticorpo acceptor.

[089] Um derivado funcional de um polipeptídeo como usado aqui inclui uma molécula que tem uma atividade biológica qualitativa em comum com um polipeptídeo para a presente invenção, i.e, tendo a capacidade de se ligar à NogoA humana ou à NiG humana. Um derivado funcional inclui fragmentos e análogos de peptídeo de um polipeptídeo de acordo com a presente invenção. Os fragmentos compreendem regiões dentro da sequência de um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, por exemplo, de uma sequência especificada. O termo "derivado" é usado para definir variantes de sequências de

aminoácidos, e modificações covalentes de um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, por exemplo, de uma sequência especificada. Os derivados funcionais de um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, por exemplo, de uma sequência especificada, por exemplo, da região hipervariável da cadeia leve e da pesada, preferivelmente pelo menos cerca de 90%, mais preferivelmente pelo menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% de identidade de sequência total com a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, por exemplo, de uma sequência especificada, e retêm substancialmente a capacidade de se ligar à NogoA humana ou à NiG humana.

[090] Como usada aqui, a frase "domínio variável" se refere a um polipeptídeo que tem uma sequência derivada de uma região V da imunoglobulina da linha germinativa de mamífero. Uma sequência é "derivada de uma região V da linha germinativa mamífera" quando a sequência é ou isolada de um indivíduo humano, isolada de um animal não-humano, tal como um roedor tal como um camundongo, no qual o animal não-humano é capaz de gerar imunoglobulinas humanas em resposta a um imunógeno, mais preferivelmente o dito animal não-humano não é capaz de produzir anticorpos endógenos a suas espécies, isolados de uma biblioteca de sequências de genes de anticorpos humanos clonados (ou uma biblioteca de sequências de genes da região V de anticorpo humano), quando uma sequência de região V de linha germinativa humana clonada foi usada para gerar uma ou mais sequências diversificadas (por mutagênese aleatória ou marcada) que foram então selecionadas para ligação a um antígeno-alvo desejado. No mínimo, um domínio variável de imunoglobulina humano tem pelo menos 85% de similaridade de aminoácidos (incluindo, por exemplo, 87%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% de similaridade ou mais) com uma sequência de domínios variáveis de imunoglobulina humana natural. Alternativamente, ou ainda, "domínio

variável" é um domínio variável de imunoglobulina que compreende quatro regiões de estrutura variáveis de imunoglobulina (FW1-FW4), que são preferivelmente humanas, como regiões de estrutura que são estabelecidas por Kabat et al. (1991). As "regiões de estrutura de domínio variável" englobam a) uma sequência de aminoácidos de uma região de estrutura, preferivelmente humana, e b) uma região de estrutura que compreende pelo menos 8 aminoácidos contíguos da sequência de aminoácidos de uma região de estrutura humana de uma região de estrutura humana. Um domínio variável de anticorpo pode compreender sequências de aminoácidos de FW1-FW4 que são as mesmas que as sequências de aminoácidos de regiões de estrutura correspondentes codificadas por um segmento de gene de anticorpo de linha germinativa, preferivelmente humano, ou pode compreender também um domínio variável no qual as sequências FW1-Fw4 contêm coletivamente até 10 diferenças de aminoácidos (por exemplo, até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 diferenças de sequências de aminoácidos) com relação às sequências de aminoácidos de regiões de estrutura de linha germinativa, preferivelmente humana. Como usada aqui, a frase "estrutura universal" refere-se a uma sequência de estrutura de anticorpo simples correspondente às regiões de um anticorpo conservado em sequência conforme definidas por Kabat et al. (1991) ou correspondentes ao repertório de imunoglobulinas de linhas germinativas humanas ou estrutura conforme definidas por Chothia e Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:910-917. A invenção proporciona o uso de uma estrutura simples, ou um grupo de tais estruturas, de onde se descobriu que permite a derivação de virtualmente qualquer especificidade de ligação, embora a variação nas regiões hipervariáveis sozinhas. Em uma modalidade, a regiões hipervariáveis ou CDRs se ligam especificamente a NogoA e/ou à Nig. O termo "modificação covalente" inclui modificações de um polipeptídeo de acordo com a

presente invenção, por exemplo, de uma sequência especificada; ou um seu fragmento com um agente de derivatização proteico orgânico ou não-proteico, fusões às sequências de polipeptídeos heterólogas, e modificações pós-traducionais. Polipeptídeos modificados covalentes, por exemplo, de uma sequência especificada, têm ainda a capacidade de se ligar à NogoA humana ou à NiG humana por reticulação. Modificações covalentes são tradicionalmente introduzidas por reação de resíduos de aminoácidos marcados com um agente de derivatização orgânico que é capaz de reagir com laterais selecionadas ou resíduos terminais, ou por mecanismos de atrelagem de modificações pós-traducionais que funcionam em células hospedeiras recombinantes selecionadas. Certas modificações pós-traducionais são o resultado da ação de células hospedeiras recombinantes no polipeptídeo expresso. Resíduos glutaminila e asparaginila são frequentemente desamidados pós-traducionalmente para os resíduos glutamila e aspartila correspondentes. Alternativamente, esses resíduos são desamidados sob condições moderadamente ácidas. Outras modificações pós-traducionais incluem hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxila de resíduos serila, tirosila ou treonila, metilação dos grupos α -amino das cadeias laterais de lisina, arginina, e histidina, vide, por exemplo, T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983). Modificações covalentes podem incluir proteínas de fusão que compreendem um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, por exemplo, de uma sequência especificada e suas variantes de sequências de aminoácidos, tais como imunoadesinas e fusões N-terminais para sequências de sinais heterólogas.

[091] "Identidade" com respeito a um polipeptídeo nativo e seu derivado funcional é definida aqui como a percentagem de resíduos de aminoácidos na sequência de candidatos que são idênticos aos

resíduos de um polipeptídeo nativo correspondente, depois de alinhar as sequências e introduzir lacunas, se necessário, para obtenção da identidade percentual máxima, e sem considerar quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de sequência. Nem as extensões N ou C-terminais nem as inserções serão interpretadas como redutores de identidade. Métodos e programas de computadores para o alinhamento são bem conhecidos, vide Altschul et AL, acima.

[092] "Aminoácidos e aminoácido" se referem a L- α -aminoácidos naturais, por exemplo, e incluem D-aminoácidos. Os aminoácidos são identificados por designações de uma única letra ou por três letras.

[093] A expressão "variante de sequências de aminoácidos" se refere a moléculas com algumas diferenças em suas sequências de aminoácidos em comparação com um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, por exemplo, de uma sequência especificada. Variantes de sequências de aminoácidos de um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, por exemplo, de uma sequência especificada, pode ter ainda a capacidade de se ligar à NogoA humana ou à NiG humana. Variantes substitucionais são aquelas que têm pelo menos um resíduo de aminoácidos removido e um aminoácido diferente introduzido em seu lugar na mesma posição em um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, por exemplo, de uma sequência especificada. Essas substituições podem ser únicas, em que somente um aminoácido na molécula foi substituído, ou podem ser múltiplas, em que dois ou mais aminoácidos foram substituídos na mesma molécula. Variantes insercionais são aquelas com um ou mais aminoácidos inseridos imediatamente adjacentes a um aminoácido em uma posição particular em um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, por exemplo, de uma sequência especificada. Imediatamente adjacente a um aminoácido significa conectado tanto ao grupo funcional α -carbóxi

como ao α -amino do aminoácido. Variantes delecionais são aquelas com um ou mais aminoácidos em um polipeptídeo de acordo com a presente invenção, por exemplo, de uma sequência especificada, removida. Normalmente, variantes delecionais terão um ou dois aminoácidos deletados em uma região particular da molécula.

[094] Uma molécula de ligação da invenção pode ser reproduzida por técnicas de DNA recombinantes. Em geral, as moléculas de ácido nucleico e construções de vetor requeridas para o desempenho da presente invenção podem ser construídas e manipuladas como estabelecido em manuais de laboratório padrão, tal como Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, EUA. Em vista disso, uma ou mais moléculas de DNA que codificam a molécula de ligação devem ser construídas, colocadas sob sequências de controle apropriadas e transferidas para um organismo hospedeiro adequado para expressão.

[095] De um modo bem geral, são, por conseguinte, proporcionados aqui,

(i) moléculas de DNA recombinantes que codificam uma região hipervariável, um sítio de ligação de antígeno, uma cadeia de anticorpo ou fragmento desta, uma Molécula de Ligação de domínio simples da presente invenção; e

(ii) o uso das moléculas de DNA da invenção para a produção de uma Molécula de Ligação da presente invenção por meios recombinantes.

[096] O presente estado da técnica é tal que aquele versado na técnica será capaz de sintetizar as moléculas de DNA da invenção em vista da informação fornecida aqui, i.e, as sequências de aminoácidos das regiões hipervariáveis e as sequências de DNA que codificam as mesmas. Um método para construir um gene de domínio variável é, por exemplo, descrito em EP 239 400 e pode ser brevemente resumido

como a seguir: um gene que codifica um domínio variável de um anticorpo monoclonal de qualquer que seja a especificidade é clonado. Os segmentos de DNA que codificam as regiões de estrutura e hipervariáveis são determinados e os segmentos de DNA que codificam as regiões de estrutura são fundidos juntos com sítios de restrição adequados nas junções. Os sítios de restrição podem ser gerados nas posições apropriadas por mutagênese da molécula de DNA por procedimentos padrão. Cassetes de CDR sintéticos de fita dupla são preparados por síntese de DNA de acordo com a sequências CDR-H1-6A3, CDR-H2-6A3, CDR-H3-6A3, CDR-L1-6A3, CDR-L2-6A3 e CDR-L3-6A3, dadas acima. Esses cassetes são proporcionados com extremidades pegajosas, de modo que eles podem ser ligados, nas junções à estrutura por protocolo padrão para obter uma molécula de DNA que codifica um domínio variável de imunoglobulina.

[097] Além disso, não é necessário ter acesso ao mRNA proveniente de uma linhagem de célula de hibridoma produtora de modo a obter uma construção de DNA que codifica os anticorpos policlonais da invenção. Assim, o Pedido PCT WO 90/07861 fornecem instruções completas para a produção de um anticorpo policlonal por técnicas de DNA recombinante em vista somente da informação escrita quanto à sequência de nucleotídeos do gene.

[098] O método compreende a síntese de vários oligonucleotídeos, sua amplificação pelo método PCT, e seu junção para dar a sequência de DNA desejada.

[099] Numerosos vetores estão disponíveis ao público, incluindo plasmídeos bacterianos, bacteriófago, cromossomos artificiais e vetores epissômicos. Vetores de expressão compreendendo um ou mais promotores adequados e/ou genes que codificam partes constantes de cadeia pesada e cadeia leve estão disponíveis ao público. Vetores de expressão contêm usualmente um promotor que é reconhecido pelo

organismo hospedeiro e está operavelmente ligado à sequência de codificação de interesse. Tal promotor pode ser induzível ou constitutivo. A expressão "operavelmente ligado" se refere a uma justaposição em que os componentes descritos estão em uma relação que permite que eles funcionem de seu modo pretendido. Uma sequência de controle "operavelmente ligada" a uma sequência de codificação é ligada de tal modo que a expressão da sequência de codificação é obtida sob condições compatíveis com as sequências de controle. Assim, uma vez que uma molécula de DNA da invenção é preparada, ela pode ser convenientemente transferida em um vetor de expressão apropriado.

[0100] Moléculas de DNA que codificam anticorpos de cadeia simples podem ser preparadas também por métodos padrão, por exemplo, conforme descritos no WO 88/1649.

[0101] Em uma modalidade particular da invenção, meios recombinantes para a produção de algumas das Moléculas de Ligação da invenção incluem os primeiro e segundo construtos de DNA conforme descrição abaixo:

[0102] O primeiro polinucleotídeo pode compreender ou:

- * pelo menos uma das sequências de polinucleotídeos conforme mostrada nas SEQ ID NO:14, SEQ IDNO:15 e SEQ ID NO:16 ou

- * pelo menos uma das sequências de polinucleotídeos conforme mostradas nas SEQ ID NO:17, SEQ IDNO:18 e SEQ ID NO:19.

[0103] Outro polinucleotídeo de acordo com a invenção compreende:

- * uma sequência de polinucleotídeos conforme mostrada nas SEQ ID NO:14, SEQ IDNO:15 e SEQ ID NO:16; e

- * uma sequência de polinucleotídeos conforme mostrada na

SEQ ID NO:17, SEQ IDNO:18 e SEQ ID NO:19.

[0104] Em outra modalidade, o polinucleotídeos compreende:

* uma sequência de polinucleotídeos conforme mostrada na SEQ ID NO:6 e/ou uma sequência de polinucleotídeos conforme mostrada na SEQ ID NO:7, ou

* uma sequência de polinucleotídeos conforme mostrada na SEQ ID NO: 26 e/ou uma sequência de polinucleotídeos conforme mostrada na SEQ ID NO:28.

[0105] Em ainda outra modalidade, a construção de DNA codifica uma cadeia pesada ou fragmento desta e compreende:

a) uma primeira parte que codifica um domínio variável que compreende alternativamente regiões de estrutura e hipervariáveis, em que as ditas regiões hipervariáveis que compreendem, em sequência, DNA-CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 14), DNA-CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 15) e DNA-CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 16); esta primeira parte começa com um códon que codifica o primeiro aminoácido do domínio variável e termina com um códon que codifica o último aminoácido do domínio variável, e

b) uma segunda parte que codifica uma parte constante de cadeia pesada ou fragmento desta que começa com um códon que codifica o primeiro aminoácido da parte constante da cadeia pesada e termina com um códon que codifica o último aminoácido da parte constante ou fragmento desta, seguido por um códon não-sentido.

[0106] Preferivelmente, a segunda parte codifica a parte constante de uma cadeia pesada humana, mais preferivelmente, a parte constante da cadeia γ 4. Essa segunda parte pode ser um fragmento de DNA de origem genômica (compreendendo introns) ou um fragmento de cDNA (sem introns).

[0107] Em outra modalidade, a construção de DNA codifica uma cadeia leve ou fragmento desta e compreende:

a) uma primeira parte que codifica um domínio variável que compreende alternativamente regiões de estrutura e hipervariáveis; as ditas regiões hipervariáveis que compreendem, em sequência, DNA-CDR-L1-6A3 (SEQ ID NO: 17), DNA-CDR-L2-6A3 (SEQ ID NO: 18) e DNA-CDR-L3-6A3 (SEQ ID NO: 19), essa primeira parte que começa com um códon que codifica o primeiro aminoácido do domínio variável e termina com um códon que codifica o último aminoácido do domínio variável, e

b) uma segunda parte que codifica uma parte constante de cadeia leve ou fragmento desta, que começa com um códon que codifica o primeiro aminoácido da parte constante da cadeia leve e termina com um códon que codifica o aminoácido da parte constante ou fragmento desta seguido por um códon não-sentido.

[0108] Preferivelmente, a segunda parte codifica a parte constante de uma cadeia leve humana, mais preferivelmente a parte constante da cadeia κ humana.

[0109] Os construtos de DNA da presente podem vantajosamente compreender ainda outra parte que está localizada a montante das partes já descritas e que codifica um peptídeo líder; esta parte adicional que começa com o códon que codifica o primeiro aminoácido e que termina com o último aminoácido do peptídeo líder. Esse peptídeo líder é requerido para a secreção das cadeias pelo organismo hospedeiro no qual elas são expressas e é subsequentemente removido pelo organismo hospedeiro. Preferivelmente, essa parte da construção de DNA codifica um peptídeo líder que tem uma sequência de aminoácidos substancialmente idêntica à sequência de aminoácidos da sequência líder de cadeia pesada conforme mostrada em SEQ ID NO:20 (cadeia pesada de IgG1, começando com o aminoácido na posição 19 e começando com o aminoácido na posição 1), tendo uma sequência de aminoácidos conforme mostrada na SEQ ID NO:22 (cadeia leve de

IgG1, começando com o aminoácido na posição 20 e terminando com o aminoácido na posição 1), tendo uma sequência de aminoácidos substancialmente idêntica à sequência de aminoácidos da sequência líder da cadeia pesada conforme mostrada na SEQ ID NO:30 (cadeia pesada da IgG4, começando com o aminoácido na posição 19 terminando com o aminoácido na posição 1), ou, tendo uma sequência de aminoácidos conforme mostrada na SEQ ID NO:31 (cadeia leve da IgG4, começando com o aminoácido na posição 20 e terminando com o aminoácido na posição 1).

[0110] Cada um dos construtos de DNA é colocado sob o controle de sequências de controle adequadas, em particular sob o controle de um promotor adequado. Qualquer tipo de promotor pode ser usado, desde que seja adaptado ao organismo hospedeiro no qual os construtos de DNA serão transferidos para expressão. Contudo, se a expressão é para ocorrer em uma célula mamífera, é particularmente preferido usar o promotor de um gene de imunoglobulina.

[0111] O anticorpo desejado pode ser produzido em uma célula de cultura ou em um animal transgênico. Um animal transgênico pode ser obtido de acordo com padrões desejados que incluem microinjetar nos ovos os primeira e segunda construtos de DNA colocadas sob sequências de controle adequadas, transferindo-se os ovos assim preparados para fêmeas pseudoprenhas e selecionar um descendente que expresse o anticorpo desejado.

[0112] Quando as cadeias de anticorpos têm que ser produzidas em uma cultura de células, primeiramente os construtos de DNA devem ser inseridos ou em um vetor de expressão simples ou em dois vetores de expressão separados, mas compatíveis, em que os últimos são preferidos.

[0113] Por conseguinte, a invenção proporciona também um vetor de expressão capaz de se replicar em uma linhagem de célula

procariótica ou eucariótica que compreende pelo menos uma dos construtos de DNA descritos acima.

[0114] A presente invenção proporciona assim um vetor de expressão que compreende um polinucleotídeo da presente invenção. A presente invenção refere-se também a um sistema de expressão, em que o dito sistema de expressão ou parte deste é capaz de produzir um polipeptídeo da presente invenção, quando o dito sistema de expressão ou parte deste está presente em uma célula hospedeira compatível. Uma célula hospedeira isolada que compreende um sistema de expressão da invenção é também descrita.

[0115] Assim, é também aqui contemplado um método para produzir uma molécula de ligação, um polinucleotídeo, um vetor de expressão, por meio de tecnologia de DNA recombinante ou por meio de síntese química.

[0116] Cada vetor de expressão contendo construção de DNA é, assim, para ser transferida para um organismo hospedeiro adequado. Quando os construtos de DNA são separadamente inseridos nos dois vetores de expressão, eles podem ser transferidos separadamente, isto é, um tipo de vetor por célula, ou cotransferidos, sendo esta última possibilidade a preferida. Um organismo hospedeiro adequado pode ser uma bactéria, uma levedura ou uma linha de célula mamífera, sendo esta última a preferida. Mais preferivelmente, a linhagem de célula mamífera é uma de origem linfoide, por exemplo, um mieloma, hibridoma ou uma célula B, normal, imortalizada, mas não expressa qualquer cadeia pesada ou leve de anticorpo endógena.

[0117] É preferido que o organismo hospedeiro contenha um número grande de cópias dos vetores contendo uma ou mais construções de DNA por célula. Se o organismo hospedeiro é uma linhagem de célula mamífera, essa meta desejável pode ser alcançada amplificando-se o número de cópias de acordo com métodos padrão.

Métodos de amplificação usualmente consistem em seleção quanto à resistência aumentada a um fármaco, em que a dita resistência é codificada pelo vetor de expressão.

[0118] Em outro aspecto da invenção, é proporcionado um processo para produzir uma molécula de ligação de multicadeias da invenção, que compreende (i) cultivar um organismo que é transferido com pelo menos uma construção de DNA da invenção e (ii) recuperar uma molécula de ligação ativa da invenção a partir da cultura.

[0119] Alternativamente, as cadeias pesadas e leves podem ser, por exemplo, recuperadas separadamente e reconstituídas em uma molécula de ligação ativa depois de redobradas. Métodos de reconstituição são bem conhecidos da técnica; Exemplos de métodos são, em particular, proporcionados na EP 120 674 ou EP 125 023.

[0120] Portanto, um processo pode compreender

(i) cultivar um primeiro organismo que é transformado com uma primeira construção de DNA que codifica uma molécula de ligação da invenção e recuperar uma primeira molécula de ligação da cultura, e

(ii) cultivar um segundo organismo que é transformado com uma molécula de ligação da invenção e recuperar uma segunda molécula da cultura, e

(iii) reconstituir *in vitro* uma molécula de ligação ativa da invenção a partir da primeira molécula de ligação obtida em (i) e a segunda molécula de ligação obtida em (ii).

[0121] Se necessário, mais organismos ou células, até três, quatro, cinco, seis, sete ou oito, podem ser produzidos e usados para proporcionar mais moléculas de ligação.

[0122] Em um modo similar, é também proporcionado um processo para produzir uma molécula de cadeia simples ou de domínio simples da invenção, que compreende

(i) cultivar um organismo que é transformado com um

construto de DNA que codifica uma molécula de ligação de cadeia simples ou de domínio simples da invenção, respectivamente, e

(ii) recuperar a dita molécula da cultura.

[0123] As moléculas de ligação de NogoA e NiG da invenção podem exibir atividade de regeneração nervosa muito boa, conforme mostrado, por exemplo, no modelo de desenvolvimento de neurite de células granulares, conforme descrição abaixo.

1. Ensaio de Desenvolvimento de Neurite de Células Granulares (*in vitro*)

[0124] Tecido cerebral (córtex e troncocerebral) é retirado e para cada ensaio, extrato de proteína é preparado fresco conforme descrito previamente (Spillmann et al. 1998, Identification and characterization of a bovine neurite growth inhibitor (bNI-220), J Biol Chem. 24 de julho de 1998 24;273(30):19283-93). Em resumo, um pedaço de tecido congelado (por exemplo, 0,25 g) é homogeneizado em 3-4 volumes de 60mM de Chaps – 20mM de Tris pH 8,0-1mM de EDTA com um bloqueador de Protease (10 µg/mL de Aprotinina – 5 µg/mL de Leupeptina – 1 µg/mL de Pepstatina – 1mM de PMSF) a 4°C. O homogeneizado é colocado em um aparelho rotatório a 4°C por 30 minutos e centrifugado a 100.000 g, por 45 minutos, a 4°C em um rotor TLA 100.3 (Beckman TL-100ultracentrifuge). A concentração de proteína é determinada do sobrenadante usando-se um espectrofotômetro de absorção.

[0125] Células granulares do cerebelo são purificadas em digestores de tripsina de tecido cerebelar de ratos de 5 a 7 dias após nascimento, conforme descrito previamente (Niederost et al 1999, Bovine CNS myelin contains neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans, J Neurosci. 15 de outubro de 1999;19(20):8979-89). As moléculas de ligação da invenção são então pré-incubadas por 30 minutos no substrato de teste e removidas antes

das células serem adicionadas. Células granulares cerebelares são adicionadas e incubadas por 24 horas. Para interromper o experimento, 2 mL de formaldeído tamponado a 4% são adicionados lentamente a placas de cultura. Extrato de proteína membrânica de cérebro de macaco preparado conforme descrição acima foi adsorvido durante a noite em 15 µg de proteína por centímetro quadrado de placa de cultura em placas de 4 poços de Greiner (Greiner, Nuertingen, Alemanha). As placas são lavadas, três vezes, com solução de Hank quente, antes de plaquear os neurônios. Células granulares de ratos de 5 a 7 dias pós-natal são preparadas conforme descrição e plaqueadas em 50.000 células/cm². As células são cultivadas por 24 horas em meio isento de soro, fixadas e imunocloridas com marcador de neuritos MAB 1 b (Chemicon monoclonal Ab, 1:200). Para a coloração dos corpos celulares, DAPI (dicloridrato de 4',6-diamidino-2-fenil-indol da Molecular Probes) é usado depois da coloração com MAB1b. Para experimentos com anticorpos, mAbs anti-Nogo-A ou AB de IgG de controle são pré-incubados nas placas por 30 minutos e, subsequentemente, removidos.

[0126] Quatro campos em uma distância definida até a extremidade do poço são aleatoriamente mostrados para cada poço usando uma objetiva de 40 X por contagem de todas as interseções de neuritos com uma linha colocada através do centro do campo de observação. Todos os corpos celulares que tocam a linha são também contados, e uma razão de índice de neuritos por corpo celular é calculado para cada poço reportado previamente (Simonen et al., 2003, Neuron 38;201-211). Todas as contagens são efetuadas cegamente em experimentos codificados e expressos como um índice de neuritos por corpo celular. Os resultados são expressos como neuritos/corpo celular de índice médio.

[0127] Pode ser observada a intensificação de desenvolvimento de neurite de célula granular cerebelar no ambiente não permissivo do

extrato de medula espinhal preparado acima por pré-incubação com uma molécula de ligação da invenção.

[0128] A atividade neutralizante das moléculas da invenção pode ser também estimada medindo-se a produção regeneradora e o desenvolvimento de neurite e recuperação funcional nos modelos de lesão na medula espinhal *in vivo*, conforme breve descrição abaixo.

2. Modelos de Lesão da Medula Espinhal em Ratos e Camundongos (*in vivo*)

[0129] Ratos de Lewis adultos são lesionados cirurgicamente por transecção da metade dorsal da medula espinhal bilateralmente no nível da 8ª vértebra torácica. Laminectomia, anestesia e cirurgia são descritos por Schnell e Schwab 1993 (Eur.J. Neurosci. 5: 1156 – 1171). Tracejamento neuroanatômico: O motor e o trato corticoespinhal sensorial é traçado por injeção do traçador de biotina dextrana amina (BDA) no córtex do lado oposto à bomba ou ao enxerto. BDA é transportada para a medula espinhal dentro de 10 a 14 dias e visualizada usando diaminobenzidina (DAB) como um substrato conforme descrito por Brösamle et AL., (2000 J. Neurosci. 20: 8061-8068).

[0130] Duas semanas depois da lesão na medula espinhal destruir cerca de 40% do segmento da medula espinhal T8, principalmente na metade dorsal, incluindo ambas as transecções de medula espinhal cervical (CSTs): tracejamento da CST em animais de controle mostram um grau moderado de produção reativa do trato. Esse fenômeno corresponde à produção espontânea em resposta à lesão bem conhecida na literatura. Ratos lesionados que estão sendo tratados com as moléculas de ligação da invenção ou com bombas de distribuição das moléculas de ligação da invenção podem mostrar uma produção aumentada no sítio da lesão e a regeneração dos axônios lesionados do desenvolvimento de neurite dos neuritos danificados. Além disso, os

animais podem mostrar recuperação aperfeiçoada das funções sensorimotoras. Tais testes funcionais estão descritos previamente (Merkler et al, 2001, J. Neuroscience 21,3665-73).

3. Distribuição de Tecido de Anticorpos no SNC de Macacos Adultos

[0131] As moléculas de ligação da invenção são purificadas como IgG e concentradas para 3 mg/mL em PBS. IgG derivada de soro camundongos (Chemicon Int., Temecula/Ca, EUA) ou um mAB direcionado contra auxina (MAS Biotechnology, Oxo/GB) são usados como tratamentos de controle. Dois macacos Macaque adultos, machos (*Macaca fascicularis*) são usados nesse estudo para infusão intratecal.

Procedimentos Cirúrgicos

[0132] Anestesia é induzida por injeção é induzida por injeção intramuscular de cetamina (Ketalar®; Parke-Davis, 5 mg/kg, i.m.). Atropina é injetada i.m. (0,05 mg/kg) para reduzir secreções bronquiais. Um cateter intravenoso é colocado na veia femoral para perfusão contínua com uma mistura de propofol a 1% (Fresenius® e solução a 4% de glicose (1 volume de Propofol e 2 volumes de solução de glicose), induzindo uma anestesia mais profunda. O animal é então colocado em uma estrutura estereotáxica. Sob condições estéreis, uma incisão na pele de linha média vertical é realizada de C2 para Th1. A fáscia cortada e os processos espinhais de C2 a Th1 são expostos. Os músculos paravertebrais são retraídos e as lâminas de C6, C7 e Th1 dissecadas. Uma laminectomia C6 completa e uma hemilaminectomia C7 são então realizadas. A dura-máter é exposta e incisada longitudinalmente acima de os 7° e 8° segmentos espinais cervicais, correspondendo à zona rostral da porção espinhal coberta pela 6ª lâmina cervical. Um tubo de polietileno (10 cm de comprimento), conectado a uma bomba osmótica (Alzet®, 2ML1; fluxo: 50µg/h) distribuindo o anticorpo hNogo-A, é inserido abaixo da dura e empurrado uns poucos milímetros rostralmente e anexado à dura com uma sutura. A bomba osmótica é

colocada e presa em uma cavidade feita na massa de músculos das costas uns poucos centímetros mais baixo que a laminectomia, no lado esquerdo. O tubo é preso ao longo de sua trajetória com suturas ao tecido muscular. Os músculos e a pele são suturadas e o animal é recuperado da anestesia usualmente de 15 a 30 minutos depois de interrupção da perfusão venosa com propofol. O animal é tratado no pós-operatório com antibiótico (Ampicilina a 10%, 30 mg/kg, s.c.). Doses adicionais de Carprofeno são dadas diariamente durante uma semana.

[0133] Os macacos são sacrificados 8 dias depois do implante da bomba osmótica. A sedação é inicialmente induzida com cetamina, conforme mencionado acima, seguido por uma anestesia profunda obtida por injeção intraperitoneal (i.p.) de uma dose letal de pentobarbital (90 mg/kg). Os animais são perfundidos transcardialmente com 0,4 litro de solução salina a 0,9%, seguido por 4 litros de fixador (solução a 4% de paraformaldeído em tampão de fosfato 0,1M, pH=7,6). A perfusão prossegue com 3 soluções de sacarose de concentração crescente (10% em fixador, 20 e 30% em tampão de fosfato).

Procedimentos Histológicos, Imunofluorescência e Imuno-histoquímica

[0134] Cérebros e medulas espinhais dos macacos são cuidadosamente dissecados, crioprotégidos em sacarose a 30% e seccionadas em 40 µm em um criostato. Para detecção de mAbs infundidos, um anticorpo secundário humano é usado (Jackson Laboratories). Para marcação dupla, os seguintes anticorpos podem ser usados: o coelho AS472 (purificado por afinidade) para Nogo-A endógena (Chen, 2000), anticorpos de coelho contra GFPA para astrócitos, e um anticorpo de coelho contra Catepsina D (DAKO) para localização lipossômica. Todos os antissoros são visualizados por anticorpos secundários correspondentes acoplados a TRITC ou FITC, ou usando-se o sistema ABC-DAB (Vetor). As secções são analisadas por epifluorescência em um microscópio Zeiss Axiophot ou confocal

(Zeiss LSM 410).

[0135] As medulas espinhais são analisadas no sítio de infusão e a 6 cm caudais para ele. Níveis altos das moléculas de ligação da invenção estão presentes no sítio de infusão. Na medula espinhal mais caudal, o canal central e a superfície da medula são fortemente marcadas, ao passo que a matéria cinza e branca mostra uma marcação mais homogênea, que, contudo, está específica e claramente sobre o fundo. Situação similar está presente no prosencéfalo com forte marcação da superfície e ventrículos e boa penetração do anticorpo Nogo-A no parênquima.

[0136] Esses experimentos mostram que a infusão intratecal espinhal de anticorpos contra um antígeno de superfície de célula do SNC levam a uma boa distribuição das moléculas de ligação e anticorpos da invenção através da circulação de CSF nos espaços de licor internos (ventrículos, canal central) e externos. Os anticorpos de IgG penetram bem no tecido cerebral e da medula espinhal. Enquanto o anticorpo IgG é lavado rapidamente, o anticorpo contra Nogo-A é retido no tecido cerebral e da medula espinhal.

4. Testes para Regeneração e Aperfeiçoamento Funcional dos Nervos em Lesões Espinhais em Macacos

[0137] Anestesia é induzida por injeção intramuscular de cetamina (Ketalar®; Parke-Davis, 5 mg/kg, i.m.). Atropina é injetada i.m. (0,05 mg/kg) para reduzir secreções bronquiais. Um cateter intravenoso é colocado na veia femoral para perfusão contínua com uma mistura de propofol a 1% (Fresenius®) e solução a 4% de glicose (1 volume de Propofol e 2 volumes de solução de glicose), induzindo uma anestesia mais profunda. O animal é então colocado em uma estrutura estereotáxica. Sob condições estéreis, uma incisão na pele na linha média vertical é realizada de C2 para Th1. A fáscia cortada e os processos espinhais de C2 para Th1 são expostos. Os músculos

paravertebrais são retraídos e as lâminas de C6, C7 e Th1 dissecada. Uma laminectomia de C6 completa e uma hemilaminectomia de C7 superior são então realizadas. De modo a distribuir as moléculas em estreita proximidade com a lesão, a ponta livre de um tubo de polietileno ligado à bomba é fixada sob a dura uns poucos milímetros rostralmente à lesão.

Testes de Destreza Manual Comportamental podem ser Realizados de acordo com o Procedimento Publicado

[0138] Destreza manual é treinada colocando-se o macaco sentado em uma cadeira para primata em frente de um "painel de Brinkman" modificado com Perspex (10 cm x 20 cm) contendo 50 furos aleatoriamente distribuídos; 25 furos estando orientados horizontalmente e 25 verticalmente {Liu, 1999 15428/id; Rouiller, 1998 13239/id}. 2.7. A regeneração e produção de fibras podem ser avaliadas conforme descrição. O traçador de anterógrado injetado no hemisfério direito é Dextrana Amina Biotinilada (BDA, Molecular Probe®, 10% em solução salina). No hemisfério esquerdo, o traçador anterógrado fluorescente Fluoresceína Dextrana (Molecular Probe®, solução salina a 10%) é injetado. Processamento histológico para visualizar os traçadores pode ser realizado conforme descrito em detalhes previamente {Rouiller, 1994 8322 /id}.

[0139] Portanto, a invenção proporciona também:

(i) o uso das moléculas de ligação Nogo e NiG da invenção no reparo de nervos do sistema nervoso mamífero, em particular, do sistema nervoso humano,

(ii) um método para reparar os nervos do sistema nervoso mamífero, em particular, um sistema nervoso humano, que compreende administrar uma quantidade eficaz das moléculas de ligação Nogo e NiG da invenção a um paciente que necessite de tal tratamento, ou

(iii) uma composição farmacêutica para reparo de nervos do

sistema nervoso mamífero, em particular, um sistema nervoso humano, que compreende as moléculas de ligação da invenção e um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável.

[0140] Portanto, a presente invenção proporciona uma molécula de ligação, um polinucleotídeo, um vetor ou sistema de expressão, e uma célula hospedeira de acordo com a presente invenção para uso como medicamento. Em particular, a dita molécula de ligação, polinucleotídeo, um vetor ou sistema de expressão ou célula hospedeira pode ser usado no tratamento de uma doença do sistema nervoso periférico (SNP) e/ou do sistema nervoso central (SNC) ou na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença do sistema nervoso periférico (SNP) e/ou sistema nervoso central (SNC).

[0141] A presente invenção proporciona também uma composição farmacêutica que compreende uma molécula de ligação, um polinucleotídeo, um vetor ou sistema de expressão ou uma célula hospedeira de acordo com a presente invenção em associação com pelo menos um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável. São também proporcionados produtos que contêm a dita molécula de ligação, polinucleotídeo, vetor ou sistema de expressão ou a dita célula hospedeira, ou um derivado farmacologicamente aceitável destes, conforme uma preparação combinada para uso simultâneo, separado ou seqüencial no tratamento de uma doença do sistema nervoso periférico (SNP) e/ou sistema nervoso central (SNC).

[0142] É também contemplado um método para o tratamento de uma doença do sistema nervoso periférico (SNP) e/ou sistema nervoso central (SNC), que compreende administrar a um paciente que necessite de tal tratamento uma quantidade eficaz de uma molécula de ligação, um polinucleotídeo, um vetor ou sistema de expressão ou uma célula hospedeira da presente invenção.

[0143] A presente invenção indica também nos exemplos que as

composições farmacêuticas e os produtos podem ser usados para liberação lenta da molécula de ligação e/ou para deposição local da molécula de ligação no sítio da lesão.

[0144] Como usado aqui, o termo "liberação lenta" ou os termos equivalentes "liberação controlada" ou "liberação prolongada" se referem a formulações de fármacos que liberam um fármaco ativo, tal como um fármaco de polipeptídeo, incluindo uma molécula de ligação NogoA ou NiG da invenção, tal como um anticorpo direcionado para NogoA ou NiG, por um período de tempo seguinte à administração a um indivíduo. Liberação prolongada de fármacos de polipeptídeos, que pode ocorrer em uma faixa de tempos, por exemplo, minutos, horas, dias, semanas ou mais, dependendo da formulação de fármaco, está em contraste com as formulações padrões, nas quais substancialmente a unidade de dosagem inteira está disponível para absorção imediata ou distribuição imediata via corrente sanguínea. Formulações de liberação prolongada preferidas resultam em um nível de fármaco circulante de uma administração única que é sustida, por exemplo, por 8 horas ou mais, 12 horas ou mais, 24 horas ou mais, 36 horas ou mais, 48 horas ou mais, 60 horas ou mais, 72 horas ou mais, 84 horas ou mais, 96 horas ou mais, ou mesmo, por exemplo, por 1 semana ou 2 semanas ou mais, por exemplo, 1 mês ou mais. Formulações de liberação prolongada estão bem descritas na técnica e podem ser selecionadas de acordo com o perfil de liberação de anticorpo preferido. Polímeros adequados incluem materiais biodegradáveis e não biodegradáveis tal como poli(ácido láctico glicólico) (PLGA).

[0145] Como usado aqui, o termo "epítipo" se refere a uma unidade de estrutura convenientemente ligada por um par de VH/VL de imunoglobulina. Epítipos definem o sítio de ligação mínimo para um anticorpo e assim representam o alvo da especificidade de um anticorpo. No caso de um anticorpo de domínio simples, um epítipo

representa a unidade de estrutura ligada por um domínio variável simples em isolamento.

[0146] Como usado aqui, o termo "neutralizante", quando empregado com referência à molécula de ligação NogoA ou NiG conforme descrição aqui, significa que a molécula de ligação interfere com uma atividade mensurável ou função de NogoA ou NiG. Uma molécula de ligação NogoA ou NiG é um polipeptídeo "neutralizante" se ela reduz a atividade mensurável ou função do antígeno-alvo, por exemplo, Nogo ou NiG, de pelo menos 50%, e, preferivelmente, pelo menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou mais, até e incluindo 100% de inibição. Essa redução da atividade mensurável ou função do antígeno-alvo pode ser avaliada por aquele versado na técnica usando-se métodos padrões para medir um ou mais indicadores de tal atividade ou função. Como exemplo, quando o alvo é Nogo ou NiG, a atividade neutralizante pode ser avaliada usando-se um ensaio de desenvolvimento de neurite descrito acima.

[0147] Em particular, as moléculas de ligação da invenção são úteis para regeneração de axônios e a produção aperfeiçoada depois do dano à fibra nervosa. Assim, as moléculas da invenção têm uma ampla utilidade, em particular, em pacientes humanos. Por exemplo, as moléculas de ligação da invenção são úteis no tratamento de várias doenças do sistema nervoso periférico (SNP) e/ou do sistema nervoso central (SNC), i.e., mais particularmente em doenças neurodegenerativas tais como mal de Alzheimer, mal de Parkinson, Esclerose lateral amiotrófica (ALS), patologias similares a Lewy ou outras demências em geral, doenças após trauma craniano, cerebral ou espinhal, acidente vascular cerebral e uma doença desmielinizante. Tais doenças desmielinizantes incluem, mas sem limitação, esclerose múltipla, desmielinização monofásica, encefalomielite, leucoencefalopatia multifocal, panencefalite, doença de Marchiafava-

Bignami, mielinólise pontina, adrenoleucodistrofia, doença de Pelizaeus-Merzbacher, degeneração esponjosa, doença de Alexander, doença de Canavan, leucodistrofia metacromática e doença de Krabbe. Em um exemplo, a administração das moléculas de ligação da invenção pode ser usada para tratar uma doença desmielinizante associada à proteína NogoA.

[0148] Em outro exemplo, células que expressam as moléculas de ligação da invenção podem ser transplantadas para um sítio de lesão da medula espinhal para facilitar o crescimento de axônios por todo o sítio lesionado. Tais células transplantadas proporcionariam um meio para restaurar a função da medula espinhal depois de lesão ou trauma. Tais células poderiam incluir células de embainhamento olfativo e células-tronco de linhagens diferentes de nervo ou enxertos de tecidos.

[0149] Além disso, as Moléculas de Ligação da invenção são úteis para o tratamento de distúrbios oculares degenerativos que podem envolver direta ou indiretamente a degeneração de células retinianas ou corneanas, incluindo retinopatias isquêmicas em geral, neuropatia óptica isquêmica anterior, todas as formas de neurite óptica, degeneração macular relacionada à idade, retinopatia diabética, edema macular cistoide (EMC), retinite pigmentar, doença de Stargardt, degeneração retiniana viteliforme de Best, amaurose congênita de Leber e outras degenerações retinianas hereditárias, miopia patológica, retinopatia de prematuridade e neuropática óptica hereditária de Leber, os efeitos após transplante de córnea ou de cirurgia corneana refrativa, e ceratite pro herpes.

[0150] Além disso, as Moléculas de Ligação da invenção são úteis para o tratamento de condições psiquiátricas, particularmente esquizofrenia e depressão.

[0151] Para essas indicações, a dosagem apropriada variará dependendo, naturalmente, por exemplo, da molécula particular da

invenção a ser empregada, do modo de administração, e da natureza e da gravidade da condição que estão sendo tratadas. Em geral, a dosagem estará preferivelmente na faixa de 1 µg/kg/dia a 1 mg/kg/dia.

[0152] As Moléculas de Ligação da invenção são convenientemente administradas por bombas ou injetadas no sítio lesionado, por exemplo, elas podem ser administradas diretamente no SNC intracranialmente ou na espinha intratecalmente ao sítio lesionado. O espaço preenchido com fluido (CSF) flui através dessa área, banha e protege o cérebro e a medula espinhal. Uma bomba de fármaco intratecal pode operar muito mais eficazmente que a medicação oral porque ela distribui o medicamento diretamente no CSF, desviando do caminho que a medicação oral leve através do corpo. Portanto, em uma modalidade preferida, a administração é efetuada através da administração fecal, por exemplo, usando-se um cateter exteriorizado conectado a uma bomba portátil. E outra modalidade preferida, é usada injeção de bolo intratecal. Dispositivos e métodos adequados para administração intratecal de fármacos são conhecidos daqueles versados na técnica. Exemplos não limitativos de bombas são: a bomba Alzer® e os sistemas de infusão Medtronic SynchroMed® ou Isomed®. As moléculas de ligação podem ser infundidas continuamente, ou podem ser preferivelmente administradas como doses fixas em intervalos de tempo específicos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 21, ou 30 dias, por exemplo, por injeções de bolo diretas no fluido espinhal.

[0153] As Moléculas de Ligação da invenção podem ser proporcionadas sozinhas, ou em combinação, ou em combinação sequencial com outros agentes. Por exemplo, as moléculas de ligação da invenção podem ser administradas com agentes anti-inflamatórios tais como, mas sem limitação, corticosteroides seguinte ao derrame acidente vascular cerebral ou lesão na corda espinhal como meio para bloquear mais dano neuronal e inibição de regeneração de axônios,

Fatores Neurotróficos tal como Fator de Crescimento Nervoso (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) ou outros fármacos para doenças neurodegenerativas, tais como Exelon® (Rivastigmina) ou Levodopa (L-DOPA (3,4-diidróxi-L-fenilalanina)). Outros parceiros de combinação adequados para o tratamento de acidente vascular cerebral são Alteplase e Desmoteplase (DSPA, por exemplo, descrita no WO 90/09438). Em uma modalidade, a presente invenção proporciona uma combinação que compreende uma Molécula de Ligação da invenção e Desmoteplase, em particular para o tratamento de acidente vascular cerebral bem como composições farmacêuticas que compreendem a dita combinação. Como usados aqui, é dito que dois agentes são administrados em combinação quando os dois agentes são administrados simultaneamente ou são administrados independentemente em um modo tal que os agentes agirão ao mesmo tempo.

[0154] A estrutura dos ingredientes ativos identificados por códigos numéricos, nomes genéricos ou comerciais, pode ser encontrada na edição real do compêndio padrão "The Merck Index" ou em bases de dados, por exemplo, Patents International (por exemplo, IMS World Publications) ou outras bases de dados por IMS Health. O teor correspondente destes é aqui incorporado a título de referência. Qualquer pessoa versada na técnica é inteiramente capaz de identificar os ingredientes ativos e, com base nessas referências, estará igualmente habilitado a fabricar e testar as indicações e propriedades farmacêuticas em modelos de teste padrão, ambas in vitro e in vivo.

[0155] As composições farmacêuticas da invenção podem ser fabricadas de modo convencional. Por exemplo, uma composição da invenção que compreende as moléculas da invenção é preferivelmente proporcionada na forma liofilizada. Para administração imediata, ela é dissolvida em um veículo aquoso adequado, por exemplo, água estéril

para injeção ou soro fisiológico tamponado.

[0156] Para auxiliar na preparação de composições adequadas, as moléculas de ligação da invenção e opcionalmente um segundo fármaco que intensifica o efeito das Moléculas de Ligação da invenção, podem ser embalados separadamente dentro do mesmo recipiente, com instruções para misturar ou para administração concomitante. Candidatos ao segundo fármaco opcional são fornecidos acima.

[0157] O efeito sinérgico de uma combinação das moléculas de ligação da invenção e fatores de crescimento tal como NGF pode ser demonstrado in vivo pelos modelos de lesão na medula espinhal.

[0158] A presente invenção se refere também ao uso da composição farmacêutica da invenção na preparação de medicamento de liberação lenta da molécula de ligação da invenção.

[0159] A presente invenção se refere também ao uso da composição farmacêutica da invenção na preparação de um medicamento para deposição local da molécula de ligação da invenção no sítio da invenção.

[0160] A presente invenção refere-se ainda ao produto farmacêutico da invenção para liberação lenta da molécula de ligação da invenção e para deposição local da molécula de ligação da invenção no sítio da lesão.

[0161] A presente invenção também se refere a um método para liberação lenta de uma molécula de ligação da invenção e para deposição local de uma molécula de ligação da invenção.

[0162] A invenção será mais inteiramente entendida por referência aos seguintes exemplos. Contudo, eles não devem ser interpretados como limitativos do escopo da invenção.

[0163] Nos seguintes exemplos, todas as temperaturas estão em graus Celsius (°C).

[0164] Os anticorpos monoclonais mostrados nos Exemplos são

Moléculas de Ligação da presente invenção que compreendem a região variável da cadeia leve representada por SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada representada por SEQ ID NO:4 (6A3-IgG1), ou compreendendo a região variável da cadeia leve representada por SEQ ID NO:25 e a região variável da cadeia pesada representada por SEQ ID NO:24 (6A3-IgG4).

[0165] É evidente que nos parágrafos dados acima, o termo "compreendendo" engloba o termo "consistindo em".

[0166] São usadas as seguintes abreviações:

ELISA	ensaio de imunossorbante ligado à enzima
FACS	seleção de células ativada por fluorescência
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FBS	soro fetal bovino
FCS	soro fetal de bezerro
HCMV	promotor de citomegalovírus humano
IgG	isótipo G de imunoglobulina
mAb	anticorpo monoclonal
VH	região variável da cadeia pesada
VL	região variável da cadeia leve
LC	cadeia leve
HC	cadeia pesada
CDR	região determinante de complementaridade
BSA	albumina de soro bovino
aa	aminoácidos
SNC	sistema nervoso central
HRP	Rábano silvestre peroxidase
T. amb	temperatura ambiente
PBS	solução salina tamponada com fosfato
TBS	solução salina tamponada com Tris
CEA	antígeno carcinoembrionário

ELISA	ensaio de imunossorbante ligado à enzima
IF	Imunofluorescência
IgG	imunoglobulina G
PBS-T	solução salina tamponada com fosfato com Tween 20 a 0,05%
PFA	Paraformaldeído

EXEMPLOS

[0167] A invenção é ilustrada pelos seguintes exemplos não limitativos.

Exemplo 1: Sequência do anticorpo monoclonal anti-hu-NogoA 6A3 de Medarex

[0168] Um anticorpo monoclonal de IgG1 humano com alta afinidade com o fragmento de NiG humano de NogoA foi selecionado. Os monoclonais originais foram secretados dos clones de células de hibridoma que foram derivados por tecnologia de hibridoma padrão usando "camundongos Medarex"; camundongos reconstituídos recombinantemente com genes de imunoglobulina humana, por Medarex Inc., Annandale, NJ. A geração de Camundongos Medarex imunizada com NiG humana, e a produção de hibridomas destes, é bem conhecida na técnica; condições similares àsquelas descritas no WO 2005/028508 devem ser seguidas. O nível de produção de anticorpo da maioria dos hibridomas foi muito baixo; portanto, tecnologia de DNA recombinante foi empregada para construir vetores de expressão especializados para produção de nível alto de anticorpo inteiro ou do fragmento Fab em uma linhagem de célula. A geração de fragmentos Ab e Fab purificados é bem conhecida e descrita em detalhes no, por exemplo, WO 2005/028508. Etapas similares foram seguidas para a geração de 6A3-mAb e 6A3-Fab purificados.

[0169] cDNAs que codificam as regiões variáveis das cadeias pesadas e leves do anticorpo de 6A3-IgG1 foram amplificadas por PCR

(reação de cadeia polimerase) da mRNA de hibridoma, clonadas e caracterizadas por seqüenciamento (Figuras 1 e 2; SEQ id noS: 7 E 6).

Exemplo 2: Geração de Fab e IgG4.

[0170] O 6A3 mAb é do isótipo de IgG1. Anticorpos de isótipo de IgG1 humana têm alta afinidade com receptores de Fc celular e podem induzir toxidez celular dependente de anticorpo (AADC) e citotoxicidade (CDC) (Jerries et AL., 2002, Hezareh et al., 2001). Além disso, foi reportado que mAbs de IgG efluí rapidamente do cérebro para o sangue através da barreira de sangue-cérebro via transcitose reversa mediada por receptor de Fc (Zhang et al., 2001). De modo a remover as interações potenciais mediadas por receptor de Fc do mAb de 6A3 IgG1, seu isótipo foi deslocado recombinantemente para uma IgG4 e também para produção recombinante de um fragmento Fab monovalente para alta capacidade de expressão em células SP2/0 e E. coli.

[0171] O sequenciamento dos domínios variáveis das cadeias pesadas e leves deste anticorpo anti-NogoA humano permitiu a produção recombinante do fragmento 6A3-Fab e anticorpo de isótipo 6A3-IgG4 em linhagens de células produtoras de alta capacidade.

[0172] Para expressão de E. coli de fragmento Fab, ambos os cDNAs (SEQ ID NO:7 e SEQ ID NO:6) foram clonados com pASK116. O plasmídeo usado para clonar os cDNAs proporciona os genes de domínio constante de IgG1/ κ (Skerra, 1994). As duas cadeias de polipeptídeo dos fragmentos de anticorpo são codificadas em um óperon sob controle transcricional do promotor de tetraciclina. O primeiro cístron codifica a fração de cadeia pesada do fragmento Fab. O domínio VH foi fundido ao peptídeo de sinal OmpA em sua terminação N e ao domínio CH1 da classe IgG1 de murino em sua extremidade C-terminal. O segundo cístron codifica a cadeia pesada com o domínio de VL fundido ao peptídeo líder e ao domínio de CH1 de murino. Mediante indução de expressão, as duas cadeias do fragmento Fab foram

simultaneamente secretadas no periplasma de *E. coli* onde a dobradura de proteína, formação de ligação de dissulfeto e montagem de cadeia ocorreram. Para expressão do Fab em *E. coli*, os plasmídeos foram transferidos para BMP para produção em larga escala.

[0173] Para clonagem da região variável de cadeia leve e de cadeia pesada do anticorpo 6A3 para expressão como um anticorpo de IgG4 em células SP2/0, os cDNAs correspondentes foram clonados no plasmídeo LCvec-AAL160 e hcMCPfin. Para expressão do anticorpo inteiro de IgG4, os plasmídeos foram linearizados com NotI para a construção LC e PvuI para o construto de HC e transfectados para células SP2/0.

[0174] 6A3 IgG4 e fragmento monovalente 6A3 Fab com his-tag foram sucessivamente produzidos e purificados. Os anticorpos recombinantes exibem altas afinidades com fragmento de NogoA humana hNiG em BIAcore Experiments (vide abaixo). Os valores de Kd respectivos são 0,14nM e 1,1nM, confirmando a clonagem e expressão recombinante correta e bem-sucedida do Ab que retém sua alta afinidade por fragmento de NogoA humana hNiG.

[0175] Regiões de codificação e sequências de aminoácidos da cadeia pesada e da cadeia leve de 6A3-IgG4 são mostradas nas Figuras 3 e 4 (SEQ ID Nos: 24, 25, 28 e 28).

Exemplo 3: Determinação das regiões determinantes de complementaridade do 6A3-Ab.

[0176] As regiões determinantes de complementaridade da cadeia leve e da cadeia pesada do anticorpo 6A3 foram determinadas usando a base de dados na URL de www.bioinf.org.uk/abs/. A definição de Kabat é baseada na variabilidade de sequência e é o método mais comumente usado para determinar as CDRs das regiões de variáveis do anticorpo (Wu TT, Kabat EA, 1970).

[0177] Todas as 6 definições de CDR bem correlacionadas com as

seqüências de aminoácidos determinadas experimentalmente exceto para CDR-H2, onde os resíduos típicos antes da CDR deve ser LEWIG, LEWVA foi encontrada (Figura 5). Contudo, muitas variações são possíveis para CDR-H2.

Exemplo 4: Medições de afinidade de biossensor para 6A3-IgG1, 6A3-IgG4 e Fab de 6A3 para NiG.

[0178] A afinidade de mAb de 6A3-IgG1, mAb de 6A3-IgG4, e de Fab de 6A3, e do Fab 6A3 foi medida por ressonância por plasmônio de superfície (SPR) usando-se um biossensor ópticos BIAcore 2000 (Biacore, Uppsala, Suécia) de acordo com as instruções do fabricante. NiG humana recombinante foi covalentemente imobilizada em uma célula de fluxo de chip de sensor CM5 usando química de acoplamento de amina. Em resumo, a matriz de dextrana carboximetilada foi ativada injetando-se 35 µL de uma solução contendo NHS 0,025M e EDC 0,1M. Para a imobilização do chip do sensor, a NiG humana recombinante foi diluída em tampão de citrato 0,01M, em pH 4, e injetada em uma vazão de 5 µL/min para obter níveis de acoplamento que permitem medições de afinidade. A desativação do grupo de NHS-éster foi realizada por injeção de 5 µL de HCl 0,1M. Para a medição da afinidade, os anticorpos foram injetados em concentrações, variando de 0,50nM a 100nM, em uma vazão de 200 µL/min. Depois de cada injeção, a superfície do chip do sensor foi regenerada com a injeção de 10 µL de HCl 0,1M sem perda de atividade de ligação na superfície. As constantes cinéticas, k_A e k_D e as constantes de afinidade K_A e K_D foram avaliadas usando-se o software BIAevaluations 3.0 suprido pelo fabricante.

[0179] Medição de afinidade em BIAcore: as constantes cinéticas e de ligação por afinidade do mAb de 6A3-IgG1, mAb de 6A3-IgG4 e o fragmento Fab monovalente derivado de 6A3 para NogoA humana recombinante foram medidas em tempo real usando-se tecnologia de ressonância de plasmônio de superfície (SPR) (Biacore). Para essa

análise, NIG humana recombinante é acoplada à superfície do chip do sensor e diferentes concentrações dos anticorpos são injetadas. Os parâmetros cinéticos das interações de ligação foram derivados do sensogramas por ajuste de curva não linear. As constantes de afinidade em equilíbrio para NIG humana para os anticorpos estavam na faixa de KDs 0,13nM to 2,5 nM for 6A3-IgG4, 6A3-IgG1, 6A3 Fab.

Exemplo 5: Ligação de anticorpos anti-NogoA NVP-6A3-Ab-NX-1 e NVP-IIC7-NX-1 para NogoA humana endógena.

[0180] Nesse exemplo, é mostrada a ligação dos anticorpos a NogoA humana endógena. Com essa finalidade, duas linhagens de células humanas, que foram caracterizadas previamente para mostrar a expressão de gene oligodendrítico-específico de Nogo-A, e, subsequentemente, para ligação específica dos anticorpos foram usadas para caracterizar os dois anticorpos anti-NogoA NVP-6A3-Ab-NX-1 (6A3-Ab) e NVP-IIC7Ab-NX-1 (IIC7-Ab) com respeito a sua ligação a NogoA endógena. As células podem ser ainda usadas para desenvolver uma biomassa para a caracterização das diferentes bateladas de anticorpos para experimentos clínicos. Em dois conjuntos experimentais dependentes, a ligação de 6A3-Ab à Nogo-A humana endógena naquelas células foi analisada e detectada.

[0181] Em uma primeira etapa, as células MO3:13 foram analisadas quanto à presença de mRNA de Nogo-A por RT-PCR usando iniciadores específicos para Nogo-A humana. Em segundo lugar, a ligação de ambos os anticorpos à Nogo-A endógena foi mostrada por imunoprecipitação de lisados de células MO3.13 e imunodeteção. Finalmente, coloração imunofluorescente das células MO3.13 e HOG com o 6A3-Ab confirmou os resultados das imunoprecipitações.

[0182] Assim, foi verificado que ambos 6A3-AB e 11C7-Ab eram capazes de se ligar especificamente à Nogo-A humana endógena.

Métodos

[0183] Linhagem de células: As células MO3.13 foram obtidas de Dr. N. Cashman, Universidade de Toronto. Elas se originaram da fusão de um mutante resistente à 6-tioguanina de rabdomiossarcoma (RD) humano com oligodendrócitos humanos, adultos, cultivados de espécime cirúrgico. As células HOG foram obtidas por Dr. G. Dawson da Universidade de Chicago. Essa linhagem de células foi estabelecida a partir de um oligodendroglioma removido cirurgicamente. Todas as células foram cultivadas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco com alto teor de glicose (Gibco) suplementado com Glutamax, 10% de soro fetal de bezerro e Penicilina/Estreptomicina.

[0184] RT-PCR: RNA total foi preparado a partir de 5×10^5 células MO3.13 usando-se reagente Tripure (Roche Diagnostics). Depois de tratamento com DNase, 1 µg de RNA foi submetido à transcrição reversa em um volume total de 20 µL usando Omniscript RT (Qiagen) e um oligo dT-iniciador. Os iniciadores usados para PCR são específicos para Nogo-A, amplificando um fragmento de 194 pb iniciando na posição PB de 1997 em Nogo-A humana de tamanho natural 5'-TGAGGGAAGTAGGGATGTGC-3' (SEQ ID NO: 32), 5'-CAGGTGATGTACGCTCTGGA-3' (SEQ ID NO: 33)). Uma reação foi preparada usando-se 2 µL de cDNA (ou 0,1 µg de RNA-RT), 5 µL de 10 x de tampão, 3 µL de dNTPs (5mM cada), 2,5 µL de Iniciador 5' (10µM), 2,5 µL de Iniciador 3' (10µM), 0,5 µL de Taq-polimerase HotStar (Qiagen) e 34,5 µL de H₂O. Os seguintes ciclos de PCR foram usados: 95°C 15 minutos, (94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 15 s)x35, 72°C 10 min → 4°C. Depois de terminada a PCT, uma alíquota de 10 µL foi analisada em gel de agarose em 2% de brometo de etídio.

[0185] Imunoprecipitação e Imunodetecção: Para cada IP uma placa de cultura de 10 cm de diâmetro de células MO3.13 crescidas para confluência foi lavada com PBS e as células lisadas em 500 µL de Reagente de Extração de Proteína de Mamífero M-PER (Pierce)

contendo coquetel de inibidor de protease Completo (Roche Diagnostics). A fração solúvel do lisado foi pré-limpa com ProteinG-Sepharose (Sigma) por 15 minutos à temperatura ambiente. Ao sobrenadante pré-limpo, ProteinG-Sepharose fresca e o anticorpo correspondente (50nM de concentração final) foram adicionados e incubados a 4°C, por 4 horas, em um misturador rotativo. Os anticorpos eram 6A3 IgG4, 11C7 IgG1 ou anti-CEA IgG4 contra uma proteína não relacionada (antígeno carcinoembrionário), que serviram como controle negativo. Uma alíquota de cada sobrenadante foi mantida para análise da fração não ligada; a Sepharose foi lavada 4 vezes com tampão TNS (10mM de Tris HCl pH 7,8, 1% (p/v) de N-Laurilsarcosina, 100mM de NaCl), uma vez com PBS, e a fração ligada à sepharose foi eluída com 20 µL de tampão de carga de SDS-PAGE (Invitrogen). As amostras foram aquecidas para 95°C, por 5 minutos, e uma alíquota de 10 µL de cada uma foi corrida em um NuPage com gradiente de gel de 4 a 12% (Invitrogen) em tampão MES. As proteínas foram absorvidas em uma membrana de celulose por 4 horas a 30 V e analisadas quanto à transferência completa com corante de Ponceau. Depois da transferência, a membrana foi bloqueada durante a noite a 4°C em reagente bloqueador Western (Roche Diagnostics) em PBS-T. Para imunodeteção, a membrana foi incubada com o anticorpo 6A3-IgG4 em concentração de 1mM, por 2 horas, à temperatura ambiente e, subsequentemente, com anticorpo secundário acoplado à peroxidase anti-humana, por 1 hora, à temperatura ambiente. Sinais foram detectados usando-se ECL-Advance (Amersham) e expostos a filme por 1 minuto.

[0186] Imunofluorescência: células MO3.13 e HOG foram plaqueadas em lâminas de compartimento (Becton Dickinson) e crescidas até 80% de confluência. Depois de lavar em PBS, as células foram fixadas em PFA a 4%, por 30 minutos, à temperatura ambiente.

Ligação não específica foi bloqueada com 20% de FCS, 0,1% de Triton X-100, por 20 minutos. As células foram incubadas em 1% de FCS, 0,1% de Triton X-100, por 1 horas, ou com 6A3-IgG4 5nM ou somente com tampão como controle negativo. Depois da incubação dos anticorpos, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com um anticorpo de IgG anti-humano (Molecular Probes) marcado com Alexa Fluor em uma diluição de 1:200 em PBS por 1 hora.

Resultados

[0187] TR-PCR: RT-PCR usando RNA de MO3-13 como modelo resultou em fragmento de DNA distinto de cerca de 200 pb (Figura 6). Nenhum produto foi detectado nos controles negativos (RNA sem transcrição reversa e H₂O). Estava presente um fragmento de PCR do tamanho esperado de 194 pbs; nenhum produto foi amplificado nas amostras de controle negativo (RNA tratado com DNase e H₂O).

[0188] Imunoprecipitação: Depois da imunoprecipitação (IP) dos lisados de células MO3.13 e imunodeteção com o anticorpo anti-Nogo-A 6A3 (Figura 7), foi detectada uma banda única, forte, do tamanho esperado (190kDa), tanto para anticorpo 6A3-IgG4 (faixa 4) como para 11C7-IgG1 (faixa 6). Nenhum sinal foi detectado depois da IP com o anticorpo de controle anti-CEA contra uma proteína não relacionada (antígeno carcinoembrionário) (faixa 1) e nas frações não ligadas (faixas 5 e 7). Uma banda tênue é visível no lisado de célula MO3-13 bruto antes da IP (faixa 2). Um sinal não específico tênue em um peso molecular inferior é visto na fração de lisado de célula insolúvel (faixa 3).

[0189] Imunofluorescência: a coloração com imunofluorescente de células MO3.13 permeabilizadas e nas células HOG com o anticorpo 6A3-IgG4 e o anticorpo secundário anti-humano marcado com Alexa-Fluor 488 resultou em uma coloração bastante clara das células (Figura 8a e 8b, parte esquerda), ao passo que virtualmente nenhum sinal foi

detectado com o anticorpo secundário sozinho (parte direita).

Discussão

[0190] Análise com RT-PCR das células MO3.13 usando os iniciadores específicos de Nogo-A para PCR resultou em um fragmento de DNA de tamanho esperado (194 pb), ao passo que nenhum produto de PCR foi detectado com a amostra de RNA de transcrição não-reversa ou com a água de controle. Desse resultado, concluímos que as células expressam Nogo-A endógena.

[0191] Imunoprecipitação de lisados de células MO3-13 e imunodeteção com o anticorpo 6A3 anti-Nogo-A mostrou uma faixa de Nogo-A forte e única do tamanho esperado (190 kDa). Em contraste, o anticorpo de controle (IgG4) anti-CEA não produziu banda de tamanho correspondente. A diferença de intensidade entre as bandas resultantes das imunoprecipitações de 6A3 e 11C7 são mais prováveis devido às afinidades diferentes dos isótipos de anticorpos diferentes pela Proteína G Sepharose (afinidade 6A3 > afinidade 11C7). Os resultados da coloração com imunofluorescente intracelular tanto das células MO3-13 quanto HOG mostraram que 6A3-IgG4 se liga à Nogo-A endógena.

[0192] A partir desses resultados, foi concluído que as duas linhagens de células expressam endogenamente Nogo-A e que tanto o anticorpo 6A3 IgG4 (6A3-Ab) como o 11C7 IgG1 (11C7-Ab) se ligam especificamente à Nogo-A humana endógena. Essas constatações sugerem que a linhagem de células MO3.13 pode ser usada para estabelecer ensaios de ligações de Nogo-A para, por exemplo, caracterização de anticorpos.

Exemplo 6: Efeito do tratamento com 6A3 na recuperação de macacos Macaque submetidos a lesões cerebrais.

[0193] Em um estudo posterior, macacos Macaque foram submetidos à lesão conforme descrição anterior e tratados com infusão intratecal, por 4 semanas, de 6A3 ou IgG de controle a partir do tempo

da lesão. Destreza manual com a mão esquerda afetada foi determinada usando-se o teste de painel de Brinkamann modificado sob condições conforme descritas aqui anteriormente. Tratamento com 6A3 aperfeiçoou a taxa de grau de recuperação funcional em comparação com o tratamento de IgG de controle. Quando o tamanho da lesão foi determinado no final do experimento, verificou-se que a recuperação funcional de macacos tratados com IgG de controle foi aproximadamente e inversamente correlacionada ao tamanho da lesão, variando de 90% para uma lesão de 50% a 53% para uma lesão de 90%. Inversamente, a quantidade de recuperação dos animais tratamento com mAb anti-Nogo-A não foi afetada significativamente pelo tamanho da lesão e para animais tratados com 6A3 qualquer atingiram seu desempenho de pré-lesão quando o tamanho da lesão era tão grande quanto 85%.

Exemplo 7: Retenção de CSF e meia-vida do anticorpo 6A3 em pacientes humanos.

[0194] A retenção de CSF e meia-vida do anticorpo 6A3 em pacientes humanos foi determinada após infusões de CSF durante 14 dias (dose diária de 15 mg/dia) e concentrações individuais medidas no soro e CSF (Figuras 9 e 10).

[0195] As concentrações de CDS permaneceram constantes ou diminuíram somente marginalmente, em dois casos duraram para Dias 34 e 56, isto é, aproximadamente 20 e 42 dias depois do fim da infusão, em comparação com os níveis medidos durante a infusão, que indica a residência e/ou a meia-vida surpreendentemente longas no CSF de 6A3. Esse comportamento farmacocinético permitiria vias de administração e regimes de dose com intervalos mais longos. Injeções de bolo no CSF durante intervalos de 2 ou mais dias ou semanas seriam factíveis. O anticorpo 6A3 seria também adequado para formulações de controle liberado, tal como formulações em polímeros biodegradáveis

ou não biodegradáveis e implantes.

Exemplo 8: Eficácia em modelo de Macaque SCI

[0196] Três macacos são submetidos a uma secção unilateral da medula espinhal na borda C7/C8, uma lesão conhecida por incapacitar a geração dos movimentos dos dedos, finos, precisos, e implantados com uma bomba osmótica Alzet®, que distribui intratecalmente para o sítio de lesão tanto no anticorpo IgG de camundongo do animal de controle como no anticorpo 6A3 dos animais tratados, por 4 semanas, em uma dose de 1 mg/dia (Figura 11 e Freund et al., Nat Med12:7 90-2, 2006). A destreza manual é avaliada por pegar pelotas de ração em fendas verticais e horizontais em um teste de painel de Brinkman modificado. Outras tarefas comportamentais incluem retirar pelotas de ração de uma gaveta, movimentos balísticos do braço, capacidade motora dos pés para pegar alimentos e observação comportamental quando em dor e desconforto. Os testes são realizados a partir de 60 dias antes da lesão até 120 dias depois da lesão em intervalos regulares.

[0197] Os macacos foram submetidos a uma secção da medula espinal unilateral e tratados intratecalmente tanto com o anticorpo de controle IgG de camundongo (n=2, i.e Cont. 1 com 50% de lesão e Cont. 2 com 90% de lesão) como com 6A3 (n=2, i.e. ATI1 com 85% de lesão e ATI2 com 80% de lesão) em uma dose de 1 mg/dia por 4 semanas (pesos do macacos: Cont 1. 5,1 kg, Cont 2, 4,1 kg, ATI 1, 5,0 kg, ATI 2, 4,5 kg). Os resultados são mostrados como o número total de péletes durante as sessões de teste no dias de tratamentos específicos. Os valores foram calculados usando-se escores comportamentais individuais de pré-lesão e pós-lesão quando o nível de desempenho permaneceu estável.

[0198] O tratamento com anticorpo 6A3 nos macacos rendeu um aperfeiçoamento gradual da retiradas de pelotas de ração usando a mão

esquerda afetada a partir das fendas horizontais e verticais em comparação com um macaco tratado com IgG de controle. O macaco de controle mostrou um déficit persistente total na retirada de pelotas das fendas horizontais, um movimento que requer maior destreza manual que a retirada a partir das fendas verticais.

[0199] Após a recuperação ter atingido o nível máximo no teste de painel de Brinkmann, os macacos foram testados quanto a sua capacidade de segurar o puxador de gaveta com sua mão esquerda afetada, puxá-lo e abri-la e extrair uma pelota de um poço na gaveta. O macaco tratado com IgG de controle com uma lesão de 90% (Cont. 2) foi totalmente incapaz de segurar o puxador e abrir a gaveta. O movimento do braço foi mais lento que o normal e a mão conformada de modo anormal. Isso pode ser derivado da linha em seta dupla, indicando uma clara diferença entre a atividade antes da lesão e depois da lesão e o tratamento com anticorpo de IgG de controle, indicando somente recuperação parcial. Os animais tratados com anticorpo 6A3 com lesões de 85% (ATI-1) ou 80% (ATI-2) recuperaram a capacidade para realizar a tarefa tanto rápida como eficazmente, independente do tamanho da lesão. Não há diferença substancial de atividade antes e depois da lesão quando do tratamento com o anticorpo 6A3, apontando para uma recuperação completa devido ao tratamento com o anticorpo 6A3. O tratamento com o anticorpo 6A3 proporciona assim um efeito benéfico claro na recuperação depois de lesões cerebrais induzidas em Macaque, em comparação com o anticorpo de controle de IgG.

Exemplo 9: Experimentos Clínicos

[0200] Um estudo clínico adequado é descrito como a seguir:

[0201] o estudo tem três fases: Fase de seleção (inclusive a linha de base), a Fase de Tratamento de Marcação Aberta e pelo menos a Fase de Acompanhamento de 22 semanas. O estudo é conduzido sob a supervisão de um Painel de Monitoramento de Segurança de Dados

(DSMB), independente.

[0202] Vinte de dois pacientes no total foram envolvidos em coortes sequenciais de sobreposição para receber uma infusão contínua de anticorpo 6A3. Todos os pacientes têm um período de acompanhamento de pelo menos 22 semanas pós-infusão para posterior avaliação de segurança.

[0203] A distribuição dos pacientes e dose de tratamento e duração por coorte foi como a seguir:

- Coorte 1: 3 pacientes paraplégicos recebem 5 mg [em 2,5 mL] por 24 horas;
- Coorte 2: 3 pacientes paraplégicos recebem 30 mg [em 2,5 mL] por 24 horas;
- Coorte 3: 6 pacientes paraplégicos recebem até 30 mg/dia [em 2,5 mL/dia] por 14 dias;
- Coorte 4: 10 pacientes paraplégicos e tetraplégicos recebem até 30 mg/dia [em 2,5 mL/dia] por 28 dias.

[0204] Os pacientes são monitorados de perto por um período de pelo menos seis meses depois do início da infusão. O estado dos pacientes é monitorado de perto por medições dos sinais vitais, registros ECG (interpretação por uma unidade central) e avaliações laboratoriais com base em matrizes: sangue, urina e CSF. São realizados Exames neurológicos usando a escala ASIA (Applicable Standard Neurological Classification of Spinal Cord Injury by the American Spinal Injury Association) (Ditunno, et al, 1994; American Spinal Cord Injury Association. Paraplegia 32(2): 7080) por clínicos qualificados para avaliação da eficácia, mas também para avaliar a exacerbação potencial da lesão na medula espinhal. Um total de quatro MRIs cerebrais e espinhais é feito para cada paciente. Amostras do CSF são retiradas em três pontos de tempo de cada paciente (pré-dose, durante a fase de tratamento e durante a fase de acompanhamento) para

análise farmacocinética (PK). Amostras de sangue são também obtidas para análise de PK através das fases de tratamento e de acompanhamento. Os dados de todos os pacientes são revistos pelo DSMB independente conforme o protocolo.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula isolada, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos um sítio de ligação a antígeno, que se liga especificamente ao polipeptídeo NogoA humano (SEQ ID NO:2) ou NiG humano (SEQ ID NO:3), sendo que o dito sítio de ligação a antígeno compreende:

* em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-H1-6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2-6A3 (SEQ ID NO: 9) e CDR-H3-6A3 (SEQ ID NO: 10); e

* em sequência, as regiões hipervariáveis CDR-L1- 6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2- 6A3 (SEQ ID NO: 12) e CDR-L3- 6A3 (SEQ ID NO: 13), respectivamente.

2. Molécula de ligação, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende:

* pelo menos uma cadeia pesada de imunoglobulina ou fragmento desta, que compreende (i) um domínio variável que compreende em sequência as regiões CDR-H1- 6A3 (SEQ ID NO: 8), CDR-H2- 6A3 (SEQ ID NO: 9) e CDR-H3- 6A3 (SEQ ID NO: 10) e (ii) a parte constante ou fragmento desta de uma cadeia pesada humana; e

* pelo menos uma cadeia leve de imunoglobulina ou fragmento desta, que compreende (i) um domínio variável que compreende em sequência as regiões hipervariáveis CDR-L1- 6A3 (SEQ ID NO: 11), CDR-L2- 6A3 (SEQ ID NO: 12) e CDR-L3- 6A3 (SEQ ID NO: 13) e (ii) a parte constante ou fragmento desta de uma cadeia leve humana.

3. Molécula de ligação, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a parte constante ou fragmento desta da cadeia pesada humana é do tipo $\gamma 4$ e a parte constante ou fragmento desta da cadeia leve humana é do tipo κ .

4. Molécula de ligação, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizada pelo fato de que a dita molécula de ligação é um anticorpo monoclonal humano ou quimérico ou humanizado.

5. Molécula de ligação, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende uma ou mais sequências de polipeptídeos selecionadas do grupo que consiste em SEQ ID NO: 4 (IgG1 pesada), SEQ ID NO: 5 (IgG1 leve), SEQ ID NO: 24 (IgG4 pesada) e SEQ ID NO: 25 (IgG4 leve).

6. Polinucleotídeo isolado, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma molécula de ligação, como definida na reivindicação 1.

7. Polinucleotídeo isolado, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que compreende:

* pelo menos uma das sequências de polinucleotídeos selecionadas do grupo que consiste em SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 e SEQ ID NO:16, ou

* pelo menos uma das sequências de polinucleotídeos selecionadas do grupo que consiste em SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18 e SEQ ID NO:19.

8. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende um polinucleotídeo, como definido na reivindicação 6 ou 7.

9. Sistema de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende o vetor de expressão, como definido na reivindicação 8, sendo que o dito sistema de expressão ou parte deste é capaz de produzir um polipeptídeo, como definido na reivindicação 1, quando o dito sistema de expressão ou parte deste está presente em uma célula hospedeira compatível.

10. Célula hospedeira isolada, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor, como definido na reivindicação 9, em que a célula hospedeira é uma célula de micro-organismo.

11. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de

que compreende uma molécula de ligação, como definida na reivindicação 1, um polinucleotídeo, como definido na reivindicação 6, um vetor ou sistema de expressão, como definido na reivindicação 8 ou 9, respectivamente, ou uma célula hospedeira isolada, como definida na reivindicação 10, em associação com pelo menos um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável.

12. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que é uma composição de liberação lenta.

13. Método para produzir a molécula de ligação, como definida na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende expressar o polinucleotídeo, como definido na reivindicação 6, em um vetor ou sistema de expressão, como definido na reivindicação 8 ou 9, respectivamente, por meio de tecnologia de DNA recombinante ou por meio de síntese química.

14. Uso da molécula de ligação, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica para tratamento de uma doença do sistema nervoso periférico (SNP) e/ou do sistema nervoso central (SNC) em pessoa que necessite de tal tratamento.

Fig 1

ATG GAA GCC CCA GCT CAG CTT CTC TTC CTC CTG CTA CTC TGG CTC CCA GAT ACC ACC GGA
 M E A P A Q L L F L L L L W L P D T T G

GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GGC ACC
 E I V L T Q S F A T L S L S F G E R A T

CTC TCC TGC AGG GCG AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC CAA CAG AAA CCT
 L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P

GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG GGC ACT GGC ATC CCA GCC
 G Q A P R L L I Y D A S N E A T G I P A

AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT
 R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P

GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG CCG ATC ACC TTC GGC CAA
 E D F A V Y Y C Q Q R S N W P I T F G Q

GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTG ATC TTC CCG CCA
 G T R L E I K R T V A A F S V F I F P F

TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT
 S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y

CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG
 P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q

GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTC AGC
 E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T

CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAG GTC TAC GCC TCC GAA GTC ACC CAT CAG GGC
 L S K A D Y E K K K V Y A C E V T H Q G

CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GCA GAG TGT TAG
 L S S P V T E S F N R G E C

Fig 2

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA GAA GGT GTC CAG TGT GAG
 M E F G L S W V P L V A I L E G V Q C E

GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC
 V Q L V E S G G G L V Q P G G S L E L S

TGT GCA GCT TCT GGA TTC ACC TTT AGT AAC TAT TGG ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CGG
 C A A S G F T F S N Y W M S W V R Q A P

GGG AAA GGG CTG GAG TGG GTG GGC ACC ATA AAG CAA GAT GGA AGT CAG AAA AAC TAT GTG
 G K G L E W V A T I K Q D G S Q E N Y V

GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG
 D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L

CGA TTG AAC AGC CTG AGA GGC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG ACT GAA CTC TTC
 R L N S L E A E D T A V Y Y C A T E L F

GAT CTC TGG GGC CTT GGC TCC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG
 D L W G R G S L V T V S S A S T K G P S

GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GGC CTG GGC TGC
 V F P L A F S S K S T S G G T A A L G C

CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC
 L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T

AGC GGC GTG CAG ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC
 S G V H T F P A V L Q S S S L Y S L S S

GTG GTS ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTS GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC
 V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H

AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC
 K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H

ACA TGC CCA CCG TGC CCA TAA
 T C P P C P

Fig 3

Parte variável da cadeia leve da sequência de DNA:

gaaattgtgtgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggcc
agtcagagtgttagcagctacttagcctgggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgat
gcatccaacagggccactggcatcccagccaggttcagtggcagtggtctgggacagacttcaactctcaccat
cagcagcctagagcctgaagatttgcagtttattactgtcagcagcgtagcaactggccgatcacctcggcca
agggacaaagcttgaatcaaa

Parte variável da cadeia pesada da sequência de DNA:

gaggtgcagctgggtgagctctgggggaggcttggtccagcctggggggtccctgagactctcctgtgcagcttct
ggattcacctttagtaactattggatgagctgggtccgccaggctccggggaaagggtggagtggtggccac
cataaagcaagatggaagtcagaaaaactatgtggactctgtgaaggccgattcaccatctccagagacaa
cgccaagaactcactgtatctgcgattgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgactg
aactcttcgatctctggggccgtggctccctggtcaccgtctctca

Fig 4

Parte variável e constante da cadeia leve de 6A3 IgG4, incluindo sequência líder:

LÍDER **CDRL-1**
MSVLTQVLALLLWLTGTRCEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA
 WY

CDRL-2
CDRL-3
 QQKPGQAPRLLIY**DAS**NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC**QQ**
RSN

Cκ
WPITFGQG**T**KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY**P**REAKVQ
 WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
 GLSSPVTKSFNRGEC

Sequência de aa completa de cadeia pesada de 6A3 IgG4

incluindo líder, CH1, região de *hinge*, CH2 e Ch3:

LÍDER
CDR-H1
MAWVWTLPLFLMAAAQSVQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSNY**
WM

CDR-H2
SWVRQAPGKGLEWVATIK**QDGSQ**KNY**VDSVK**GRFTISRDNAKNSLYRLNSLR
 AE **CDR-H3**
 DTAVYYCATELFDLWGRGSLVTVSS

CH1
 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAV **HINGE**
 LQSSGLYSLSSVWTVPSSSLGKTYTCNV**D**HKPSNTKV**D**KRV
 ESKYGPPCPSCP

CH2
 APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS
 KAK

CH3
 GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV**M**HEALHNHYTQKSLSLSL
 GK

Fig 5

Cadeia leve de 6A3 IgG1 com CDRs:**Líder**

MEAPAQLLFLLLWL P D T T G
 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T
 CDR-L1
 L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P
 CDR-L2
 G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A
 R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P
 CDR-L3
 E D F A V Y Y C Q Q R S N W P I T F G Q
 G T R L E I K R T V A A P S V F I F P P
 S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y
 P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q
 E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T
 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G
 L S S P V T K S F N R G E C

Cadeia pesada de 6A3 IgG1 com CDRs:**Líder**

M E F G L S W V F L V A I L E G V Q C E
 V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S
 CDR-H1
 C A A S G F T F S N Y W M S W V R Q A P
 CDR-H2
 G K G L E W V A T I K Q D G S Q K N Y V
 D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L
 CDR-H3
 R L N S L R A E D T A V Y Y C A T E L F
D L W G R G S L V T V S S A S T K G P S
 V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C
 L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T
 S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S
 V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H
 K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H
 T C P P C P

Fig 6

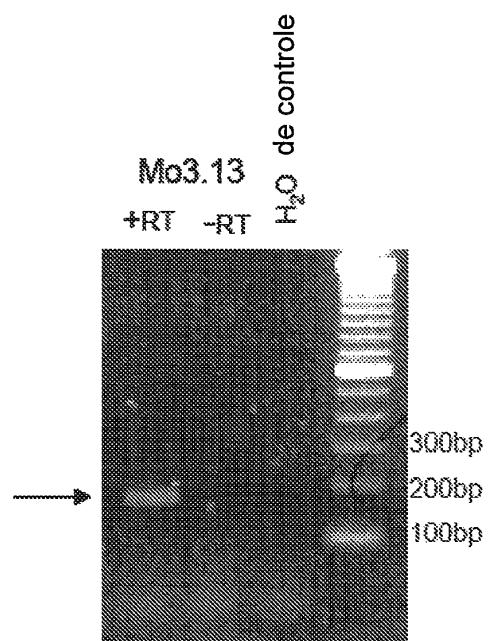


Fig 7

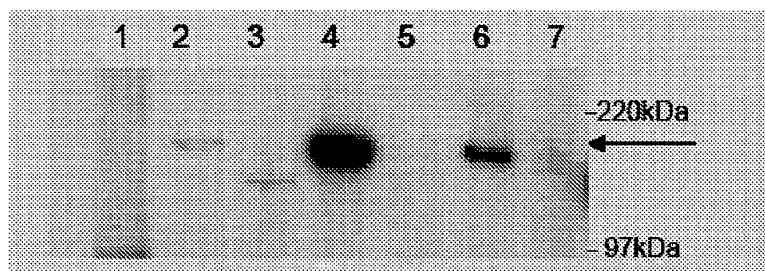
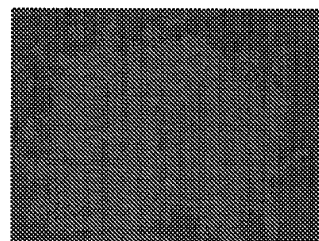
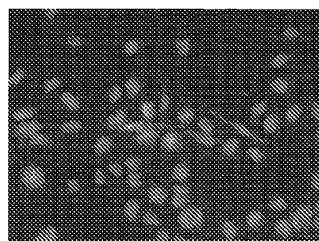


Fig 8

Figure 8a:
Células MO3.13

5mM 6A3
IgG4

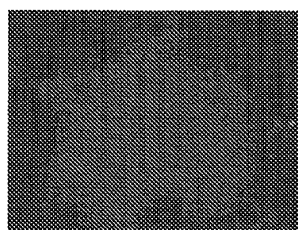
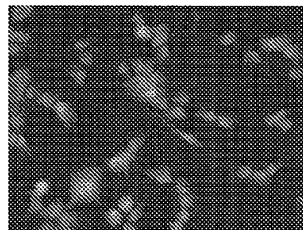


Anticorpo
Secundário
sozinho

Figure 8b:

Células HOG

5mM 6A3
IgG4



Anticorpo
Secundário
sozinho

9/11

Fig 9

Coorte=3 (15 mg/dia por 14 dias)

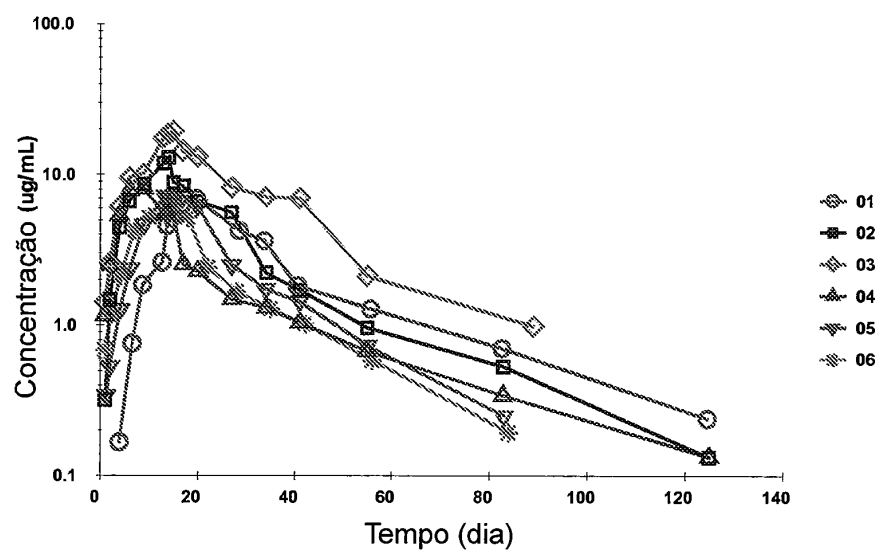
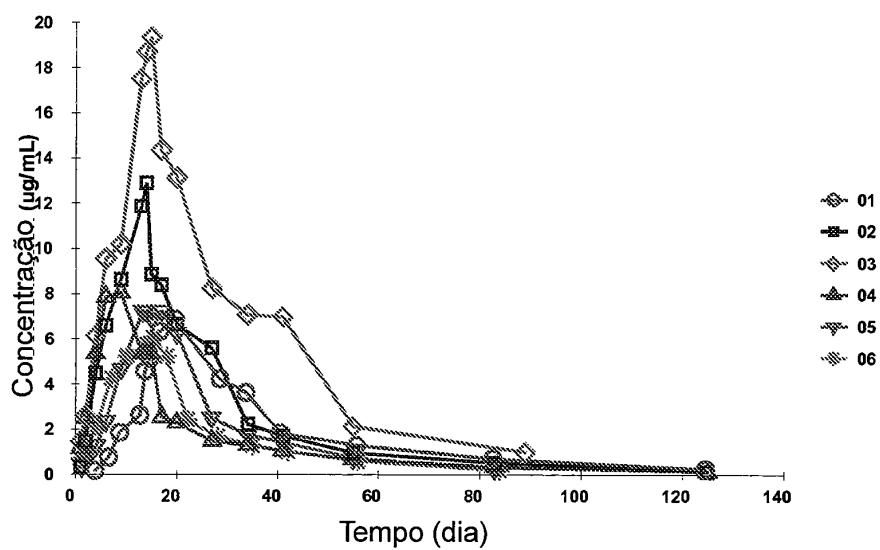


Fig 10
(15 mg/dia por 14 dias)

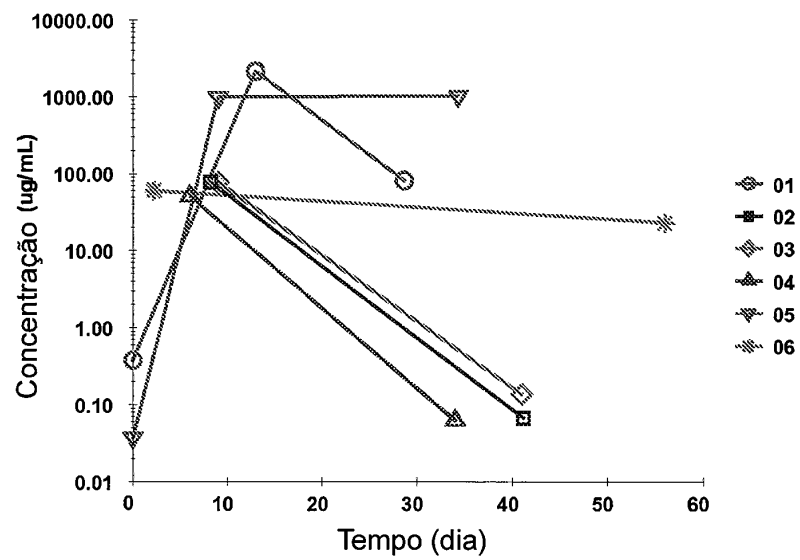
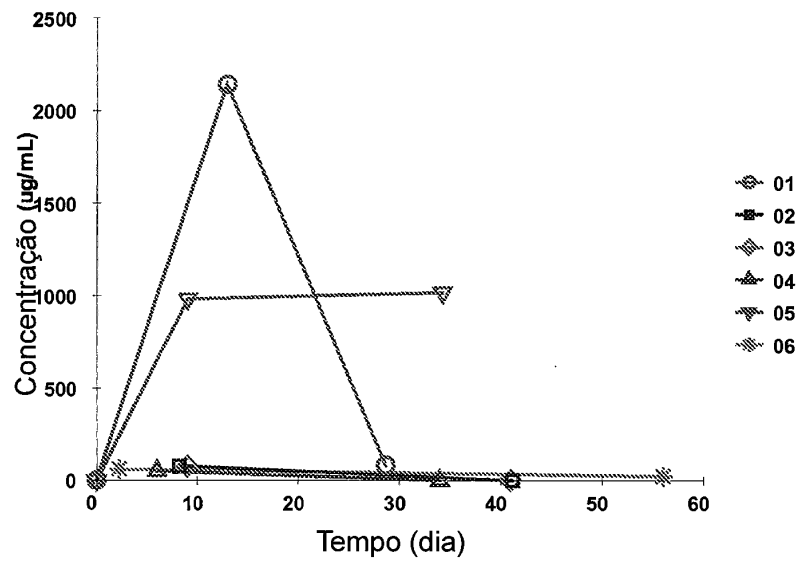


Fig 11

