

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(51) Classificação Internacional:

A61K 38/00 (2015.01) **C07K 16/18** (2015.01)

C07K 16/28 (2015.01) **C07K 14/47** (2015.01)

C07K 14/705 (2015.01) **G01N 33/50** (2015.01)

G01N 33/68 (2015.01)

(22) Data de pedido: **2004.03.17**

(30) Prioridade(s): **2003.03.19 US 455756 P**
2003.06.20 US 480241 P
2003.08.01 US 492057 P

(43) Data de publicação do pedido: **2010.11.10**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.05.06**
186/2015

(73) Titular(es):

BIOGEN MA INC.

250 BINNEY STREET CAMBRIDGE, MA 02142US

(72) Inventor(es):

JOHN MCCOY

US

SHA MI

US

ALEXEY A. LUGOVSKOY

US

BLAKE R. PEPINSKY

US

H. S. LEE DANIEL

HK

(74) Mandatário:

ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO

RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **PROTEÍNA DE LIGAÇÃO DO RECEPTOR NOGO**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO FORNECE POLIPEPTÍDEOS SP35 E SUAS PROTEÍNAS DE FUSÃO. OS ANTICORPOS SP354 E SEUS FRAGMENTOS DE LIGAÇÃO DO ANTÍGENO E ÁCIDOS NUCLEICOS QUE OS CODIFICAM. A INVENÇÃO FORNECE, AINDA, COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO, E MÉTODOS PARA FAZER E UTILIZAR, TAIS ANTICORPOS SP35, E SEUS FRAGMENTOS DE LIGAÇÃO DO ANTÍGENO, POLIPEPTÍDEOS SP35 E SUAS PROTEÍNAS DE FUSÃO.

DESCRIÇÃO
PROTEÍNA DE LIGAÇÃO DO RECEPTOR NOGO

Campo da Invenção

Esta invenção relaciona-se com neurologia, neurobiologia e biologia molecular. Mais particularmente, esta invenção relaciona-se com moléculas e medicamentos para tratamento de doenças, perturbações e lesões neurológicas, tal como a lesão de medula espinhal.

Antecedentes da Invenção

Axónios e dendritos estendem-se a partir de neurónios. A extremidade distal de um axónio ou neurito de extensão inclui uma região especializada, conhecida como cone de crescimento. Os cones de crescimento percebem o ambiente local e guiam o crescimento axonal em direcção à célula alvo de um neurónio. Os cones de crescimento respondem a indicações ambientais, por exemplo, adesividade de superfície, factores de crescimento, neurotransmissores e campos eléctricos. Os cones de crescimento em termos gerais avançam a uma taxa de um a dois milímetros por dia. O cone de crescimento explora a área à frente dele e de ambos os lados, através de alongamentos classificados como lamelipodia e filopodia. Quando um alongamento contacta com uma superfície desfavorável, retira-se. Quando um alongamento contacta com uma superfície de crescimento favorável, continua estendendo-se e guia o cone de crescimento naquela direcção. Quando o cone de crescimento alcança uma célula alvo apropriada, uma conexão sináptica é criada.

A função da célula nervosa é influenciada pelo contacto entre neurónios e outras células no seu ambiente imediato

(Rutishauser, et al., 1988, *Physiol. Rev.* 68:819). Estascélulas incluem células gliais especializadas, oligodendrócitos no sistema nervoso central (SNC), e células de Schwann no sistema nervoso periférico (SNP), que embainham o axónio neuronal com mielina (Lemke, 1992, em *An Introduction to Molecular Neurobiology*, Z. Hall, Ed., p. 281, Sinauer).

Neurónios do SNC têm o potencial inerente de regenerar-se após lesão, mas são inibidos de fazê-lo através das proteínas inibitórias presentes na mielina (Brittis et al., 2001, *Neuron* 30:11-14; Jones et al., 2002, *J. Neurosci.* 22:2792-2803; Grimpe et al., 2002, *J. Neurosci.* 22:3144-3160).

Várias proteínas inibitórias de mielina encontradas em oligodendrócitos foram caracterizadas. Exemplos conhecidos de proteínas inibitórias de mielina incluem NogoA (Chen et al., *Nature*, 2000, 403, 434-439; Grandpre et al., *Nature* 2000, 403, 439-444), glicoproteína associada à mielina (MAG) (McKerracher et al., 1994, *Neuron* 13:805-811; Mukhopadhyay et al., 1994, *Neuron* 13:757-767) e glicoproteína de oligodendrócito (OM-gp), Mikol et al., 1988, *J. Cell. Biol.* 106:1273-1279). Cada uma destas proteínas tem mostrado separadamente ser um ligando para o NgR1 neuronal (Wang et al., *Nature* 2002, 417, 941 - 944; Grandpre et al., *Nature* 2000, 403, 439-444; Chen et al., *Nature*, 2000, 403, 434-439; Domeniconi et al., *Neuron* 2002, publicado online em 28 de Junho de 2002).

O receptor de Nogo1 (NgR1) é uma proteína de membrana ancorada através de GPI que contém 8 repetições ricas em leucina (Fournier et al., 2001, *Nature* 409:341-346). Sob interação com proteínas inibitórias (por exemplo, NogoA, MAG e OM-gp), o complexo NgR1 converte sinais que levam ao

colapso do cone de crescimento e à inibição do crescimento do neurito. A WO 01/12662 refere-se a proteínas associadas de membrana humana (MEMAP) e polinucleotídeos que identificam e codificam MEMAP.

Há uma necessidade não encontrada de moléculas e métodos para inibir o colapso do cone de crescimento mediado através de NgR1 e a inibição resultante do crescimento do neurito.

Sumário da Invenção

Fizemos várias descobertas quanto a um polipeptídeo denominado "Sp35" (nossa denominação). Denominações alternativas de Sp35 incluem "LINGO" e "LINGO-1". As nossas descobertas incluem o seguinte. Sp35 liga-se a NgR1. Sp35 liga-se a si próprio numa interação homotípica. Uma proteína de fusão Sp35-Fc induz ou promove fasciculação em neurónios granulares. Uma proteína de fusão Sp35-Fc promove a sobrevivência neuronal tanto no modelo de lesão de hemissecção do trato rubro-espinhal como no modelo de transecção do nervo óptico. Células primárias corticais infectadas através de Sp35 retroviral, quando entregues em ratos com medulas espinhais danificadas, resultam em sobrevivência neuronal aumentada, marcação de β -tubulina III aumentada de axónios e conteúdo de mielina aumentado.

Com base em parte nestas descobertas, a presente revelação caracteriza um ácido nucleico isolado contendo uma sequência nucleotídica que codifica um polipeptídeo em que: (a) o polipeptídeo inclui (i) um domínio LRR de Sp35, (ii) um C-terminal de região básica de Sp35 no domínio LRR, e (iii) um C-terminal de domínio de imunoglobulina (Ig) de Sp35 na região básica; e (b) o polipeptídeo sem um

domínio trans-membrana. O domínio LRR de Sp35 pode conter umcarboxi-terminal de LRR (LRRCT, um amino-terminal de LRR (LRRNT), ou ambos. Em alguns exemplos da revelação, o polipeptídeo Sp35 codificado não tem o domínio citoplasmático. Em alguns exemplos, o polipeptídeo Sp35 codificado inclui resíduos de aminoácido 34 a 532 da SEQ ID N°: 2 e sem os resíduos de aminoácido 533 a 614.

A presente revelação também inclui um ácido nucleico quecodifica um polipeptídeo em que o polipeptídeo inclui umdomínio de Ig de Sp35 e não tem um domínio LRR de Sp35, uma região básica de Sp35, um domínio de trans-membrana e um domínio citoplasmático.

A presente revelação também inclui um ácido nucleico quecodifica um polipeptídeo em que o polipeptídeo inclui um domínio LRR de Sp35 e não tem um domínio de Ig de Sp35, uma região básica de Sp35, um domínio de trans-membrana e um domínio citoplasmático.

A presente revelação também inclui um ácido nucleico quecodifica um polipeptídeo sem um domínio citoplasmático funcional mas incluindo todos os outros domínios de Sp35. Por exemplo, o polipeptídeo codificado pode incluir aminoácidos 1 a 576 da SEQ ID N°: 2 (antes do processamento da sequência sinal).

Em alguns exemplos da revelação, o polipeptídeo codificado é um polipeptídeo de fusão contendo uma porção não Sp35. A porção não Sp35 pode ser, por exemplo, uma porção Ig, uma porção de albumina sérica, uma porção de direcionamento, uma porção repórter, ou uma porção facilitadora de purificação. Uma porção não Sp35 preferencial é uma porçãoIg, por exemplo, uma porção Fc.

A sequência nucleotídica pode ser operacionalmente ligada a uma sequência de controlo de expressão, por exemplo, em um vector de expressão. A presente revelação também inclui uma célula hospedeira transformada com um vector que expressa um polipeptídeo Sp35 da revelação.

A presente revelação também inclui um polipeptídeo Sp35 codificado através de qualquer um dos ácidos nucleicos descritos acima.

A presente revelação também inclui um polipeptídeo Sp35 conjugado a um polímero, por exemplo, um polialquilenoglicol, um polímero de açúcar e um polipeptídeo. Um polímero preferencial é um polialquilenoglicol, por exemplo, polietilenoglicol (PEG). O polipeptídeo pode ser conjugado a 1, 2, 3 ou 4 polímeros. Preferencialmente, o peso molecular total dos polímeros conjugados é de 20.000 Da a 40.000 Da através de polipeptídeo Sp35.

A presente revelação também inclui um método de inibição de transdução de sinal através de NgR1. O método inclui contacto de NgR1 com uma quantidade eficaz de um polipeptídeo Sp35. Polipeptídeos preferenciais para uso no método incluem o seguinte:

- (a) um polipeptídeo Sp35, em que: (a) o polipeptídeo inclui (i) um domínio LRR de Sp35, (ii) um C-terminal de região básica de Sp35 para o domínio LRR, e (iii) um C-terminal de domínio de imunoglobulina (Ig) de Sp35 para (b) a região básica; e polipeptídeo sem um domínio de membrana; e

- (b) o polipeptídeo sem um domínio de trans-membrana; e um polipeptídeo Sp35 que inclui um domínio de Ig de Sp35 e sem um domínio LRR de Sp35, uma região básica de Sp35, um domínio de trans-membrana e um domínio citoplasmático.

A presente revelação também inclui um método de redução de inibição do crescimento axonal de um neurónio do sistema nervoso central (SNC). O método inclui contacto do neurónio com uma quantidade eficaz de um polipeptídeo, tal como um polipeptídeo Sp35, um anticorpo anti-Sp35, ou um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo anti-Sp35.

A presente revelação também inclui um método de inibição de colapso do cone de crescimento de um neurónio do SNC. O método inclui contacto do neurónio com uma quantidade eficaz de um polipeptídeo, tal como um polipeptídeo Sp35, um anticorpo anti-Sp35, ou um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo anti-Sp35.

A presente revelação também inclui um método de tratamento de uma doença, perturbação ou lesão do SNC em um mamífero. O método inclui administração ao mamífero de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um polipeptídeo, tal como um polipeptídeo Sp35, um anticorpo anti-Sp35, ou um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo anti-Sp35. Em alguns exemplos da revelação, a doença, perturbação ou lesão do SNC é uma lesão da medula espinhal. O polipeptídeo Sp35 pode ser administrado localmente. Em alguns exemplos do método, o polipeptídeo Sp35 é administrado inicialmente dentro de 48 horas de uma lesão de medula espinhal. Para administração local, a quantidade terapêuticamente eficaz do polipeptídeo preferencialmente é de 10 µg/kg a 10 mg/kg. Para administração sistémica, a quantidade terapêuticamente

eficaz do polipeptídeo preferencialmente é de 1 mg/kg a 20mg/kg.

A presente revelação também inclui um método de terapia génica ex vivo de tratamento de uma doença, perturbação ou lesão do SNC em um mamífero. O método inclui (a) fornecimento de uma célula hospedeira cultivada expressando um polipeptídeo Sp35 recombinante; e (b) introdução da célula hospedeira no mamífero no sítio de doença, perturbação ou lesão do SNC, por exemplo, lesão de medula espinhal. A célula hospedeira cultivada pode ser derivada do mamífero a ser tratado. Neste método de terapia génica ex vivo o polipeptídeo Sp35 recombinante pode ser um polipeptídeo Sp35 completo.

A presente invenção também inclui um método de promoção da mielinização no sítio de doença, perturbação ou lesão do SNC. O método inclui contacto do sítio da doença, perturbação ou lesão do SNC com uma quantidade eficaz de um polipeptídeo Sp35, por exemplo, um polipeptídeo contendo um domínio LRR de Sp35 e sem um domínio de Ig de Sp35, uma região básica de Sp35, um domínio de trans-membrana e um domínio citoplasmático.

A presente revelação também inclui um método de terapia génica in vivo de tratamento de uma doença, perturbação ou lesão do SNC pela terapia génica in vivo. O método inclui as etapas da administração a um mamífero, no sítio da doença, perturbação ou lesão ou próximo, um vector viral contendo uma sequência nucleotídica que codifica um polipeptídeo Sp35 para que o polipeptídeo Sp35 seja expresso a partir da sequência nucleotídica no mamífero em uma quantidade suficiente para reduzir inibição da extensão axonal através de neurónios no sítio da lesão ou próximo dele. O vector viral pode ser, por exemplo, um vector

adenoviral, um vector lentiviral, um vector baculoviral, um vector viral de Epstein Barr, um vector papovaviral, um vector viral de vaccinia, e um vector viral de herpes simplex. A doença, perturbação ou lesão pode ser, por exemplo, a lesão da medula espinhal ou a lesão do nervo óptico. O vector viral pode ser administrado através de via, tal como administração tópica, administração intra-ocular, administração parenteral, administração intratecal, administração subdural e administração subcutânea.

A presente revelação também inclui um método de promoção da sobrevivência de um neurónio em risco de morte. O método inclui contacto do neurónio com uma quantidade eficaz de um polipeptídeo Sp35. O polipeptídeo Sp35 pode ser uma forma solúvel de Sp35, por exemplo, uma proteína de fusão Sp35-Fc. O neurónio pode ser *in vitro* ou *in vivo*, por exemplo, em um mamífero com uma doença, perturbação ou lesão neurodegenerativa, por exemplo, esclerose múltipla, ALS, doença de Huntington, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, neuropatia diabética, derrame, lesões cerebrais traumáticas e lesão da medula espinhal. Em alguns exemplos da revelação, o polipeptídeo Sp35 é administrado indirectamente por: (a) fornecimento de uma célula hospedeira cultivada expressando um polipeptídeo Sp35 recombinante; e (b) introdução da célula hospedeira no mamífero no sítio do neurónio. Em alguns exemplos da revelação, o polipeptídeo é administrado indirectamente através de terapia génica *in vivo*. Nesse caso, o método inclui administração, no sítio do neurónio ou próximo dele, de um vector viral compreendendo uma sequência nucleotídica que codifica um polipeptídeo Sp35 para que o polipeptídeo Sp35 seja expresso a partir da sequência nucleotídica no mamífero em uma quantidade suficiente para promover sobrevivência do neurónio.

Como utilizado neste pedido, "polipeptídeo Sp35 humano completo" significa o polipeptídeo cuja sequência de aminoácidos são os aminoácidos 34 a 614 da SEQ ID N°: 2.

Como utilizado neste pedido, "porção heteróloga" significa uma sequência de aminoácidos não presente em um polipeptídeo Sp35 completo.

Como utilizado neste pedido, "receptor de nogo 1" significa o polipeptídeo cuja sequência está publicamente disponível sob o número de acesso no Genbank AAG53612.

Como utilizado neste pedido, "polipeptídeo antagonista de Sp35" significa um polipeptídeo Sp35 que bloqueia, inibe ou interfere na actividade biológica de Sp35 de ocorrência natural.

Como utilizado neste pedido, "região básica de Sp35" significa um dos seguintes aminoácidos, motivos:

RRARIRDRK (SEQ ID N° :4)

KKVKVKEKR (SEQ ID N° :5)

RRLRLRDRK (SEQ ID N° :6)

RRGRGRDRK (SEQ ID N° :7)

RRIRARDRK (SEQ ID N° :8)

A linha superior de aminoácidos (em negrito; SEQ ID N°: 4) é a sequência de região básica de Sp35 preferencial, com variantes mostrando substituições opcionais mostradas abaixo (SEQ ID NOS: 5, 6, 7 e 8).

Como utilizado neste pedido, "proteína de fusão Sp35" significa uma proteína de fusão que inclui uma porção Sp35 fusionada em uma porção heteróloga.

Como utilizado neste pedido, "domínio de Ig de Sp35" significa aminoácidos 433 a 493 da SEQ ID N°: 2, contanto que a sequência possa conter até cinco inserções de aminoácido individuais, deleções, ou substituições de aminoácido conservativas. As seguintes substituições (numerando com base na SEQ ID N°: 2) estão expressamente incluídas: V através de M na posição 6; S através de G na posição 294; V através de A na posição 348; e R através de H na posição 419.

Como utilizado neste pedido, "domínio LRR de Sp35" significa um domínio que inclui 10 a 14 sequências de repetições ricas em leucina, incluindo o LRRNT e LRRCT, listados na Tabela 1, contanto que até cinco inserções, deleções, ou substituições conservativas de aminoácido possam aparecer dentro do agregado de 10 a 14 repetições ricas em leucina.

Como utilizado neste pedido, "porção Sp35" significa um fragmento biologicamente activo de um polipeptídeo Sp35 completo.

Como utilizado neste pedido, "polipeptídeo Sp35" significa uma porção Sp35 ou uma proteína de fusão que inclui uma porção Sp35.

Com base na revelação contida neste pedido, a presente invenção providencia o uso de um fragmento de ligação de anticorpo ou antigénio dos mesmo que liga ao polipéptido de SEQ ID NO: 2 para a preparação de um medicamento para o tratamento de doença ou desordem neurodegenerativa em que a extensão axonal seria benéfica num mamífero, em que o anticorpo ou fragmento é capaz de reduzir de inibição d crescimento axonal de um neurão do sistema nervoso central (CNS).

A presente invenção também providencia um fragmento de ligação de um anticorpo ou antigénio do mesmo que liga ao polipéptido da SEQ ID N°2; para uso no tratamento de uma doença ou desordem neurodegenerativa em que a extensão axonal seria benéfica num mamífero, em que o anticorpo é capaz de reduzir o crescimento axonal de um neurónio do sistema nervoso central (CNS).

Outros aspetos e formas de realização da presente invenção encontram-se nas reivindicações anexas.

A menos que de outro modo definido, todos os termos científicos e técnicos aqui usados tendo o mesmo sentido comum comumente compreendido por um técnico comum na técnica a que a invenção pertence. No caso de conflito, a presente descrição, incluindo definições, irá controlar.

Embora métodos e materiais similares ou equivalentes aos descritos neste pedido possam ser usados na prática ou teste da invenção, os métodos e materiais preferenciais são descritos abaixo. Os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos somente, e não são destinados a ser limitantes. Outras características e vantagens da invenção serão evidentes a partir da descrição detalhada e das reivindicações.

Breve Descrição das Figuras

A FIG. 1 é a sequência nucleotídica de um cADN de Sp35 humano completo (SEQ ID N°:1).

A FIG. 2 é a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo Sp35 humano completo (SEQ ID N°: 2).

A FIG. 3 é uma ilustração esquemática da estrutura de domínio de Sp35 e mapeamento de deleção para identificar a sequência(s) Sp35 que se liga a NgR1.

A FIG. 4 é um histograma resumindo os dados da ligação de SP35 a células COS7 transfectadas com um vector de expressão codificando p75 de ratazana ou um vector controlo. Após 48 horas, AP-SP35 ou AP foi incubado com as células. AP ligado foi detectado usando reagente de detecção de AP cromogénico.

A FIG. 5 é um histograma resumindo os dados da ligação de AP-Omgp, e AP-Nogo-66 a células COS7 transfectadas com um vector de expressão que codifica NgR1; NgR1 e p75; NgR1, p75 e SP35, ou um vector de controlo. Após 48 horas, AP-Omgp, AP-Nogo-66 ou AP foi incubado com as células. AP ligado foi detectado usando reagente de detecção de AP cromogénico.

A FIG. 6 é um histograma resumindo os dados do alívio da actividade inibitória de inibidores de mielina sobre crescimento do neurito in vitro. O comprimento do neurito foi medido de neurónios granulares cerebelares de ratazana no dia 7 pós-natal expressando DN-Sp35, Sp35 completo, ou controlos cultivados sobre substrato imobilizado Omgp, Mielina e Nogo 66. Células transfectadas com DN-SP35 exibiram resposta diminuída a substratos inibitórios. O comprimento do neurito foi quantificado em 1000 neurónios através de grupo de tratamento de dois ensaios independentes ($p < 0,01$).

A FIG. 7 é um histograma resumindo os dados da reversão da actividade inibitória de inibidores de mielina através de SP35-Fc. O comprimento do neurito de neurónios granulares cerebelares de ratazana no dia 7 pós-natal (1000 neurónios)

cultivados sobre substrato imobilizado OMgp, Mielina ou Nogo 66 na presença ou ausência de SP35-Fc. SP35-Fc reduziu a inibição do crescimento do neurito causada através de Omgp, Nogo 66 e MAG. O comprimento do neurito foi quantificado em 1000 neurónios através de grupo de tratamento de dois ensaios independentes ($p < 0,01$).

A FIG. 8 é um gráfico resumindo dados de um experimento mostrando que Sp35-Fc administrado intratecalmente melhora a recuperação funcional após hemissecção dorsal em um rato. O escore BBB locomotor medido como uma função de tempo após hemissecção dorsal em controlo (IgG) ou ratos tratados com Sp35-Fc (8 animais através de grupo). O tratamento foi iniciado no momento da lesão da medula espinhal.

A FIG. 9 é um gráfico mostrando escores BBB de animal individual na semana quatro no experimento resumido na FIG. 8.

Descrição Detalhada da Invenção

O Sp35 humano de ocorrência natural é uma proteína específica do SNC glicosilada contendo 614 aminoácidos (FIG. 2; SEQ ID N°: 2). O polipeptídeo SP35 selvagem humano, completo contém um domínio LRR composto através de 14 repetições ricas em leucina (incluindo caps C- e N-terminais), um domínio de Ig, uma região de trans-membrana e um domínio citoplasmático (FIG. 3). O domínio citoplasmático contém um sítio canónico de fosforilação de tirosina. Além disso, a proteína Sp35 de ocorrência natural contém uma sequência sinal, uma região básica curta entre o domínio LRRCT e de Ig, e uma região trans-membrana entre o domínio de Ig e o domínio citoplasmático (FIG. 3). O gene Sp35 humano contém códons de partida de transposição alternativa, para que seis

aminoácidos adicionais, isto é, MQVSKR (SEQ ID N°: 9) possam ou não estar presentes noTerminal-N da sequência sinal de Sp35. A Tabela 1 lista os domínios de Sp35 e outras regiões, de acordo com o número de resíduo de aminoácido, baseado na sequência na FIG. 2 (SEQ ID N°: 2).

Tabela 1

Domínio ou Região	Resíduo inicial	Resíduo Final
Sequência de sinal	1	33
LRRNT	34	64
LRR	66	89
LRR	90	113
LRR	114	137
LRR	138	161
LRR	162	185
LRR	186	209
LRR	210	233
LRR	234	257
LRR	258	281
LRR	282	305

LRR	306	329
LRR	330	353
LRRCT	363	416
Básico	417	424
Ig	433	493
Sequência de ligação	494	551
Transmembrana	552	576
Citoplásmica	577	614

A distribuição tecidual e a expressão de desenvolvimento de Sp35 foram estudadas em humanos e ratos. A biologia de Sp35 foi estudada num modelo animal experimental (rato). A expressão de SP35 de ratazana está localizada nos neurónios do SNC e oligodendrócitos cerebrais, como determinado através de Northern blotting e marcação imunohistoquímica. Nível de expressão de mRNA de Sp35 de ratazana é regulado pelo desenvolvimento, chegando ao ponto máximo um pouco após o nascimento, isto é, aproximadamente no dia um pós-natal. Num modelo de lesão de transecção de medula espinhal de rato, Sp35 é regulado para cima no sítio de lesão, como determinado através de RT-PCR.

Os inventores descobriram que Sp35 completo selvagem liga-se a NgR1. Os derivados solúveis de Sp35 funcionam comopolipeptídeos antagonistas de Sp35 através de ligação a

NgR1 e bloqueio, inibição, ou interferência na sua função, por esse meio aliviando a inibição mediada através de NgR1 de extensão axonal que normalmente se realiza em neurónios do SNC. Isto é benéfico em situações onde a extensão de axónio ou brotamento de neurito são necessários no cérebro ou medula espinhal. A lesão de medula espinhal, incluindo esmagamento ou separação parciais ou completos, exemplifica uma situação na qual a extensão axonal é necessária, mas é normalmente inibida através de operação da via de Nogo. Exemplos de doenças ou perturbações nas quais a extensão de axónio e/ou brotamento de neurito no cérebro seriam benéficos incluem derrame, esclerose múltipla, e outras doenças ou perturbações neurodegenerativas.

Em métodos da presente revelação, um polipeptídeo Sp35 ou um anticorpo que bloqueia Sp35 (ou fragmento de anticorpo de ligação a antígeno) podem ser administrados directamente como um polipeptídeo pré-formado, ou indirectamente através de um vector de ácido nucleico, para antagonizar a função de NgR1 e permitir o crescimento axonal benéfico.

Em alguns exemplos da revelação, um polipeptídeo antagonista de Sp35 solúvel é administrado num método de tratamento que inclui: (1) transformação ou transfecção de uma célula hospedeira implantável com um ácido nucleico, por exemplo, um vector, que expressa um polipeptídeo Sp35; e (2) implante da célula hospedeira transformada num mamífero, no sítio de uma doença, perturbação ou lesão. Por exemplo, a célula hospedeira transformada pode ser implantada no sítio de uma lesão de medula espinhal. Em alguns exemplos da revelação, a célula hospedeira implantável é removida de um mamífero, temporariamente cultivada, transformada ou transfectada com um ácido

nucleico isolado que codifica um polipeptídeo Sp35 solúvel, e implantada de volta no mesmo mamífero do qual foi removida. A célula pode ser, mas não deve ser, removida do mesmo sítio no qual é implantada. Tais exemplos, às vezes conhecidos como terapia génica ex vivo, podem fornecer um suprimento contínuo do polipeptídeo Sp35, localizado no sítio do sítio da acção, através de um período de tempo limitado.

A presente revelação, incluindo a invenção, fornece oligopeptídeos úteis como moduladores da interação de Sp35 com NgR1 e interações homotípicas de Sp35. Estes oligopeptídeos podem incluir um motivo de aminoácido seleccionado a partir do grupo composto por:

L S P R K H (SEQ ID N°: 10)

I T P K R R (SEQ ID N°: 11)

ACPHHK (SEQ ID N°: 12)

VSPRKH (SEQ ID N°: 13)

A linha superior de aminoácidos (em negrito; SEQ ID N°: 10) é a sequência preferencial, com variantes compreendendo substituições opcionais mostradas abaixo (SEQ ID NOS: 11, 12 e 13).

Vários polipeptídeos Sp35 exemplares, anticorpos anti-Sp35 e fragmentos de anticorpo, e métodos e materiais para obtenção destas moléculas para prática da presente revelação, incluindo a invenção, são descritos abaixo.

Proteínas de Fusão e Polipeptídeos Conjugados

Alguns exemplos da presente revelação, incluindo algumas modalidades da invenção, envolvem o uso de um polipeptídeo Sp35, por exemplo, um polipeptídeo antagonista de Sp35, em

que uma porção Sp35 é fusionada a uma porção polipeptídica heteróloga para formar uma proteína de fusão Sp35. Proteínas de fusão Sp35 podem ser usadas para alcançar vários objectivos, por exemplo, meia-vida sérica aumentada, biodisponibilidade melhorada, direccionamento in vivo a um órgão específico ou tipo tecidual, eficiência de expressão recombinante melhorada, secreção de célula hospedeira melhorada, facilidade de purificação e avidéz mais alta. Dependendo do objectivo(s) a ser alcançado, a porção heteróloga pode ser inerte ou biologicamente activa. Também, pode ser escolhida para ser estavelmente fusionada à porção Sp35 ou ser clivável, in vitro ou in vivo. Porções heterólogas para alcançar objectivos diferentes são conhecidas na técnica.

Como uma alternativa para a expressão de uma proteína de fusão Sp35, uma porção heteróloga escolhida pode ser pré-formada e quimicamente conjugada à porção Sp35. Na maioria dos casos, uma porção heteróloga escolhida funcionará similarmente se fusionada ou conjugada à porção Sp35. Por conseguinte, na seguinte discussão de sequências heterólogas de aminoácidos, a menos que de outra maneira observado, deve ser entendido que a sequência heteróloga pode ser juntada à porção Sp35 na forma de uma proteína de fusão ou como um conjugado químico.

Polipeptídeos farmacologicamente activos, tais como Sp35 muitas vezes exibem depuração in vivo rápida, exigindo grandes doses para alcançar concentrações terapêuticamente eficazes no corpo. Além disso, polipeptídeos menores do que aproximadamente 60 kDa potencialmente sofrem filtração glomerular, que às vezes leva à nefrotoxicidade. A fusão ou conjugação de polipeptídeos relativamente pequenos, tais como fragmentos de Sp35 podem ser empregadas para reduzir

ou evitar o risco de tal nefrotoxicidade. Várias sequências de aminoácidos heterólogas, isto é, porções polipeptídicas ou "carreadoras", para aumentar a estabilidade in vivo, isto é, meia-vida sérica, de polipeptídeos terapêuticos são conhecidas.

Devido à sua meia-vida longa, larga distribuição in vivo, e falta de função enzimática ou imunológica, essencialmente, albumina sérica humana completa (HSA), ou fragmento de HSA, é uma porção heteróloga preferencial, através da aplicação de métodos e materiais, tais como aqueles ensinados em Yeh et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sei. EUA, 89:1904-1908 e Syed et al., 1997, Blood 89:3243-3252, a HSA pode ser usada para formar uma proteína de fusão de Sp35 para o conjugado que exhibe actividade farmacológica em virtude da porção Sp35 enquanto exposição significativamente aumentada de estabilidade in vivo, por exemplo, de 10 vezes a 100 vezes superior. Preferencialmente, o C-terminal de HSA é fusionado ao N-Terminal da porção Sp35. Uma vez que HSA é uma proteína naturalmente secretada, a sequência sinal USA pode ser explorada para obter secreção da proteína de fusão Sp35 no meio de cultura celular, quando a proteína de fusão é produzida em um sistema de expressão eucariótico, por exemplo, mamífero.

Alguns exemplos desta revelação, por exemplo, algumas modalidades da invenção, empregam um polipeptídeo Sp35 em que uma porção Sp35 é fusionada a uma região Fc, isto é, a porção C-terminal de uma região constante da cadeia pesada de Ig. Potenciais vantagens de uma fusão Sp35-Fc incluem solubilidade, estabilidade in vivo, e multivalência, por exemplo, dimerização. A região Fc usada pode ser uma região Fc de IgA, IgD, ou IgG (dobradiça-CH2-CH3). Alternativamente, pode ser uma região Fc de IgE ou IgM

(dobradiça-CH2-CH3-CH4). Uma região Fc de IgG é preferencial, por exemplo, uma região Fc de IgG1 ou região Fc de IgG4. Materiais e métodos para construção e expressão de ADN que codifica fusões de Fc são conhecidos na técnica e podem ser aplicados para obter fusões Sp35 sem experimentação excessiva. Alguns exemplos desta revelação, por exemplo, algumas modalidades da invenção, empregam uma proteína de fusão do tipo descrito em Capon et al. Patentes U.S. N°s 5,428,130 e 5,565,335.

A sequência sinal é um polinucleotídeo que codifica uma sequência de aminoácidos que inicia o transporte de uma proteína através da membrana do retículo endoplasmático. Sequências sinal úteis para construir uma imunodifusão incluem sequências sinal da cadeia leve de anticorpo, por exemplo, anticorpo 14.18 (Gillies et al., 1989, J. Immunol. Meth., 125:191-202), sequências sinal da cadeia pesada de anticorpo, por exemplo, a sequência sinal da cadeia pesada do anticorpo MOPC141 (Sakano et al., 1980, Nature286:5774). Alternativamente, outras sequências sinal podem ser usadas. Ver, por exemplo, Watson, 1984, Nucleic Acids Research 12:5145). O peptídeo sinal é normalmente clivado no lúmen do retículo endoplasmático através das peptídates de sinal. Isto resulta na secreção de uma proteína de imunodifusão contendo a região Fc e a porção Sp35.

Em alguns exemplos, por exemplo, em algumas modalidades, a sequência de ADN codifica um sítio de clivagem proteolítico entre a cassete de secreção e a porção Sp35. Um sítio de clivagem prepara para a clivagem proteolítica da proteína de fusão codificada, dessa forma separando o domínio Fc da proteína alvo. Sítios de clivagem proteolíticos úteis incluem sequências de aminoácidos reconhecidas através de

enzimas proteolíticas, tais como tripsina, plasmina, trombina, factor Xa ou enteroquinase K.

A cassette de secreção pode ser incorporada num vector de expressão replicável. Vectores úteis incluem ácidos nucleicos lineares, plasmídeos, fagemídeos, cosmídeos e similares. Um vector de expressão exemplar é pdC, no qual a transcrição de ADN de imunodifusão é colocada sob controlo do potencializador e promotor do citomegalovírus humano. Ver, por exemplo, Lo et al., 1991, *Biochim. Biophys. Acta* 1088:712; e Lo et al., 1998, *Protein Engineering* 11:495-500. Uma célula hospedeira apropriada pode ser transformada ou transfectada com ADN que codifica um polipeptídeo Sp35, e é usada para a expressão e secreção do polipeptídeo Sp35. Células hospedeiras preferenciais incluem células de hibridoma, células de mieloma, células 293, células de ovário de hamster chinês (CHO), células Hela e células COS imortais.

Regiões Fc totalmente intactas, selvagens exibem funções efectoras que normalmente são desnecessárias e indesejadas numa proteína de fusão Fc de acordo com a presente revelação, incluindo a invenção. Por conseguinte, certos sítios de ligação são preferencialmente deletados da região Fc durante a construção da cassette de secreção. Por exemplo, uma vez que a co-expressão com a cadeia leve é desnecessária, o sítio de ligação para a proteína de ligação da cadeia pesada, Bip (Hendershot et al., 1987, *Immunol. Today* 8:111-114), é deletado do domínio CH2 da região Fc de IgE, de forma que este sítio não interfira na secreção eficiente da imunodifusão. Do mesmo modo, os resíduos de cisteína presentes nas regiões Fc que são responsáveis pela ligação à cadeia leve da imunoglobulina devem ser deletados ou substituídos através de outro aminoácido, de forma que

estes resíduos de cisteína não interfiram no enovelamento apropriado da região Fc quando é produzido como uma imunodifusão. Sequências de domínio de trans-membrana, tais como aquelas presentes em IgM, devem ser deletadas.

A região Fc de IgG1 é preferencial. Alternativamente, a região Fc das outras subclasses de imunoglobulina gama (gama 2, gama 3 e gama 4) pode ser usada na cassete de secreção. A região Fc de IgG1 da imunoglobulina gama-1 é preferencialmente usada na cassete de secreção que inclui a região de dobradiça (pelo menos parte), a região CH2, e a região CH3. Em alguns exemplos, tal como em algumas modalidades, a região Fc da imunoglobulina gama-1 é uma Fc com CH2 deletada, que inclui parte da região de dobradiça e da região CH3, mas não a região CH2. Uma Fc com CH2 deletada foi descrita através de Gillies et al., 1990, Hum. Antibod. Hybridomas, 1:47. Em alguns exemplos, tal como em algumas modalidades, as regiões Fc de IgA, IgD, IgE, ou IgM, são usadas.

Proteínas de fusão de Sp35-Fc podem ser construídas em várias configurações diferentes. Numa configuração, o C-terminal da porção Sp35 é fusionado directamente ao N-Terminal da porção Fc. Numa configuração ligeiramente diferente, um polipeptídeo curto, por exemplo, 2 a 10 aminoácidos, é incorporado na fusão entre o N-Terminal da porção Sp35 e o C-terminal da porção Fc. Tal ligando fornece flexibilidade conformacional, que pode melhorar a actividade biológica em algumas circunstâncias. Se uma porção suficiente da região de dobradiça for conservada na porção Fc, a fusão Sp35-Fc dimerizará, dessa forma formando uma molécula divalente. Uma população homogénea de fusões Fc monoméricas produzirá dímeros monoespecíficos bivalentes. Uma mistura de duas fusões Fc monoméricas cada

uma tendo uma especificidade diferente produzirá dímeros biespecíficos bivalentes.

Qualquer um dos diversos interligandos que contém um grupo reactivo amino e um grupo reactivo tiol correspondentes pode ser utilizado para ligar Sp35 à albumina sérica. Exemplos de ligandos adequados incluem interligandos reactivos de amina que inserem um reactivador-maleimide de tiol, por exemplo, SMCC, AMAS, BNIPS, MB, EMUS, SMPB, SMPH, KMUS e GMBS. Outros ligandos adequados inserem um grupo haloacetato tiol reactivo, por exemplo, SBAP, SIA, SIAB. Os ligandos que fornecem um tiol protegido ou não protegido para reacção com grupos sulfidrilas para produzir uma ligação redutível incluem SPDP, SMPT, SATA e SATP. Tais reagentes estão comercialmente disponíveis (por exemplo, Pierce Chemicals).

A conjugação não tem que envolver o N-Terminal de um polipeptídeo Sp35 ou a porção tiol na albumina sérica. Por exemplo, fusões de Sp35-albumina podem ser obtidas usando técnicas de engenharia genética, em que a porção Sp35 é fusionada ao gene de albumina sérica no seu N-Terminal, C-terminal, ou ambos.

Polipeptídeos Sp35 podem ser fusionados a peptídeos heterólogos para facilitar purificação ou identificação da porção Sp35. Por exemplo, uma marcação de histidina pode ser fusionada a um polipeptídeo Sp35 para facilitar a purificação usando meios de cromatografia comercialmente disponíveis.

Em alguns exemplos da revelação, tal como em algumas modalidades da invenção, um constituinte de fusão Sp35 é utilizado para aumentar a produção de uma porção Sp35 em bactérias. Em tais constituintes, uma proteína

bacteriana normalmente expressa e/ou secretada a um alto nível é empregada como o parceiro de fusão N-Terminal de um polipeptídeo Sp35. Ver, por exemplo, Smith et al., 1988 Gene 67:31; Hopp et al., 1988, Biotechnology 6:1204; LaVallie et al., 1993, Biotechnology 11:187.

Em alguns exemplos da revelação, tal como em algumas modalidades da invenção, um constituinte de fusão inclui uma porção Sp35 e uma segunda porção de ligação a NgR1 humano, por exemplo, uma porção glicoproteína oligodendroцитomieline (OMgp), uma porção de glicoproteína associada à mielina (MAG), ou porção Nogo66. As vantagens de tais constituintes incluem afinidade de ligação a NgR1 aumentada.

A sequência de aminoácidos de OMgp completa é conhecida natécnica (no. de acesso no Genbank P23515). Exemplos específicos de fusões Sp35-OMgp incluem os seguintes:

Sp35 (aa 34 a 532) + Fc de IgG1 + OMgp (resíduos de aminoácido 25 a 400); e

Sp35 (aa 34 a 532) + HSA + OMgp (resíduos de aminoácido 25 a 400).

A sequência de aminoácidos de MAG completa é conhecida natécnica (no. de acesso no Genbank A61084). Exemplos específicos de fusões de Sp35-MAG incluem os seguintes:

Sp35 (aa 34 a 532) + Fc de IgG1 + MAG (resíduos de aminoácido 12 a 500); e

Sp35 (aa 34 a 532) + USA + MAG (resíduos de aminoácido 12 a 500).

A sequência de aminoácidos de Nogo completa é conhecida na técnica (no. de acesso no Genbank de NogoA AY102279). Exemplos específicos de fusões de Sp35-Nogo incluem os seguintes:

Sp35 (aa 34 a 532) + Fc de IgG1 + Nogo66 (resíduos de aminoácido de NogoA 1056 a 1122);

Sp35 (aa 34 a 532) + HSA + Nogo66 (resíduos de aminoácido de NogoA 1056 a 1122);

Sp35 (aa 34 a 532) + Fc de IgG1 + amino de Nogo (resíduos de aminoácido de NogoA 1 a 949) ; e

Sp35 (aa 34 a 532) + HSA + amino de Nogo (resíduos de aminoácido de NogoA 1 a 949).

Pela fusão de uma porção Sp35 nos terminais amino e carboxi do parceiro de fusão adequado, formas bivalentes ou tetravalentes de um polipeptídeo Sp35 podem ser obtidas. Por exemplo, uma porção Sp35 pode ser fusionada aos terminais amino e carboxi da porção Ig para produzir um polipeptídeo monomérico bivalente contendo duas porções Sp35. Após a dimerização de dois destes monómeros, em virtude da porção Ig, uma forma tetravalente de uma proteína Sp35 é obtida. Tais formas multivalentes podem ser usadas para alcançar afinidade de ligação aumentada pelo alvo. Formas multivalentes de Sp35 também podem ser obtidas pela colocação de porções Sp35 em tandem para formar concatêmeros, que podem ser empregados sozinhos ou fusionados a um parceiro de fusão, tal como Ig ou HSA.

Polímeros Conjugados (além de polipeptídeos)

Alguns exemplos da revelação, tal como algumas modalidades da invenção, envolvem um polipeptídeo Sp35 em que um ou mais polímeros são conjugados (covalentemente ligados) ao polipeptídeo Sp35. Exemplos de polímeros adequados para tal conjugação incluem polipeptídeos (discutido acima), polímeros de açúcar e cadeias de polialquilenoglicol. Tipicamente, mas não necessariamente, um polímero é conjugado ao polipeptídeo Sp35 com o objectivo de melhorar um ou mais do seguinte: solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade.

Uma classe preferencial do polímero para conjugação a um polipeptídeo Sp35 é o polialquilenoglicol. O polietilenoglicol (PEG) é particularmente preferencial. Porções PEG, por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5 polímeros PEG, podem ser conjugadas a cada polipeptídeo Sp35 para aumentar a meia-vida sérica, quando comparado com o polipeptídeo Sp35 sozinho. Porções PEG são não antigénicas e essencialmente biologicamente inertes. Porções PEG usadas na prática da revelação, incluindo a invenção, podem ser ramificadas ou não ramificadas.

O número de porções PEG ligadas ao polipeptídeo Sp35 e o peso molecular das cadeias PEG individuais podem variar. Em geral, quanto maior o peso molecular do polímero, menos cadeias de polímero ligadas ao polipeptídeo. Preferencialmente, a massa de polímero total ligada ao polipeptídeo Sp35 é de 20 kDa a 40 kDa. Dessa forma, se uma cadeia polimérica é ligada, o peso molecular preferencial da cadeia é 20 a 40 kDa. Se duas cadeias são ligadas, o peso molecular preferencial de cada cadeia é 10 a 20 kDa. Se três cadeias forem ligadas, o peso molecular preferencial é 7 a 14 kDa.

O polímero, por exemplo, PEG, pode ser ligado ao polipeptídeo Sp35 através de qualquer grupo reactivo adequado exposto do polipeptídeo. O(s) grupo(s) reactivo(s) exposto(s) pode ser, por exemplo, um grupo amino N-Terminal ou um grupo amino epsilon de um resíduo de lisina interno, ou ambos. Um polímero activado pode reagir e covalentemente ligar-se a qualquer grupo amino livre no polipeptídeo Sp35. Grupos carboxílicos livres, grupos carbonila apropriadamente activados, hidroxilas, guanidila, imidazol, porções de carboidrato oxidado e grupos mercapto de Sp35 (se disponíveis) também podem ser usados como grupos reactivos para ligação do polímero.

Preferencialmente, em uma reacção de conjugação, são empregados desde aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10 mols do polímero activado por mol de polipeptídeo, dependendo da concentração de polipeptídeo. Normalmente, a proporção escolhida representa um equilíbrio entre maximizar a reacção minimizando reacções laterais (muitas vezes não específicas) que podem prejudicar a actividade farmacológica desejada da porção Sp35. Preferencialmente, pelo menos 50% da actividade biológica (como demonstrado, por exemplo, em algum dos ensaios descrito neste pedido ou conhecido na técnica) do polipeptídeo Sp35 é conservada, e ainda mais preferencialmente quase 100% é conservada.

O polímero pode ser conjugado ao polipeptídeo Sp35 usando química convencional. Por exemplo, uma porção polialquilenoglicol pode ser ligada a um grupo amino epsilon da lisina do polipeptídeo Sp35. Ligação à cadeia lateral de lisina pode ser realizada com um éster activo N-hidroxilsuccinimida (NHS), tal como o PEG succinimidilsuccinato (SS-PEG) e succinimidil propionato (SPA-PEG). Porções de polialquilenoglicol adequadas

incluem, por exemplo, carboximetil-NHS, norleucina-NHS, SC-PEG, tresilato, aldeído, epóxido, carbonildiimidazol e carbonato PNP. Estes reagentes estão comercialmente disponíveis. Ligandos de PEG reactivos de amina adicionais podem ser substituídos pela porção succinimidila. Estes incluem, por exemplo, isotiocianatos, nitrofenilcarbonatos, epóxidos e benzotriazol carbonatos. Condições preferencialmente são escolhidas para maximizar a selectividade e extensão da reacção. Tal optimização de condições de reacção está dentro da habilidade habitual da técnica.

A PEGuilação pode ser realizada através de quaisquer das reacções de PEGuilação conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Focus on Growth Factors, 3: 4-10, 1992; pedidos de patente europeia publicados EP 0 154 316 e EP 0 401 384. A PEGuilação pode ser realizada usando uma reacção de acilação ou uma reacção de alquilação com uma molécula de polietilenoglicol reactiva (ou um polímero solúvel em água reactivo análogo).

A PEGuilação através de acilação em termos gerais envolve a reacção de um derivado de éster activo do polietilenoglicol. Qualquer molécula de PEG reactiva pode ser empregada na PEGuilação. Um éster de PEG activado preferencial é o PEG esterificado à N-hidroxisuccinimida (NHS) . Como utilizado neste pedido, "acilação" inclui sem limitação os seguintes tipos de ligações entre a proteína terapêutica e um polímero solúvel em água, tal como PEG: amida, carbamato, uretana e similares. Ver, Bioconjugate Chem. 5: 133-140, 1994. Parâmetros de reacção devem ser escolhidos para evitar condições de temperatura, de solvente, e de pH que danificariam ou inativariam o polipeptídeo Sp35.

Preferencialmente, a ligação de conexão é uma amida. Preferencialmente, pelo menos 95% do produto resultante é mono-, di- ou tri-PEGilado. No entanto, algumas espécies com graus mais altos de PEGuilação podem ser formadas em quantidades dependendo das condições de reacção específicas usadas. Opcionalmente, as espécies PEGiladas purificadas são separadas da mistura, particularmente espécies não reagidas, através de métodos convencionais de purificação, incluindo, por exemplo, diálise, precipitação através de sais, ultrafiltração, cromatografia de troca iónica, cromatografia através de filtração em gel e electroforese.

A PEGuilação através de alquilação em termos gerais envolve a reacção de um derivado de aldeído terminal de PEG com Sp35 na presença de um agente redutor. Além disso, pode-se manipular as condições de reacção para favorecer a PEGuilação substancialmente somente no grupo amino N-Terminal Sp35 (isto é, uma proteína mono-PEGilada). No caso de mono-PEGuilação ou de poli-PEGuilação, os grupos PEG são preferencialmente ligados à proteína através de um grupo -CH₂-NH-. Com referência particular ao grupo -CH₂-, este tipo da ligação é conhecido como uma ligação "alquila".

Derivatização através de alquilação redutiva para produzir um produto mono-PEGilado explora a reactividade diferencial de tipos diferentes de grupos amino primários (lisina versus N-Terminal) disponível para a derivatização. A reacção é realizada num pH que permite tirar partido das diferenças de pKa entre os grupos amino epsilon dos resíduos de lisina e os do grupo N-Terminal amino da proteína. Através de tal derivatização selectiva, a ligação de um polímero solúvel em água que contém um grupo reactivo, tal como um aldeído, a uma proteína é controlada:

a conjugação com o polímero realiza-se predominantemente no N-Terminal da proteína e nenhuma modificação significativa de outros grupos reactivos, tais como os grupos amino da cadeia lateral de lisina, ocorre.

As moléculas de polímeros usadas nas abordagens tanto de acilação como de alquilação são seleccionadas entre polímeros solúveis na água. O polímero seleccionado deve ser modificado para ter um grupo reactivo único, tal como um éster activo para acilação ou um aldeído para alquilação, preferencialmente, para que o grau de polimerização possa ser controlado como fornecido nos presentes métodos. Um aldeído de PEG reactivo exemplar é o polietilenoglicol propionaldeído, que é estável em água, ou derivados alcoxi ou ariloxi mono C1-C10 do mesmo (ver, Patente Americana 5.252.714). O polímero pode ser ramificado ou não ramificado. Para as reacções de acilação, o(s) polímero(s) seleccionado(s) deve(m) ter um grupo éster reactivo único. Para alquilação reductiva, o(s) polímero(s) seleccionado(s) deve(m) ter um grupo aldeído reactivo único. Em termos gerais, o polímero solúvel na água não será seleccionado de resíduos glicosilados de ocorrência natural uma vez que estes são normalmente produzidos mais convenientemente através de sistemas de expressão recombinantes mamíferos.

Métodos para preparação de um Sp35 PEGilado em termos gerais incluem as etapas de (a) reacção de uma proteína Sp35 ou polipeptídeo com polietilenoglicol (tais como um éster reactivo ou derivado de aldeído de PEG) sob condições através das quais a molécula fica ligada a um ou mais grupos PEG, e (b) obtenção do(s) produto(s) de reacção. Em geral, as condições óptimas de reacção para as reacções de acilação serão determinadas caso a caso com base em

parâmetros conhecidos e o resultado desejado. Por exemplo, quanto maior a razão de PEG: proteína, maior a percentagem de produto poli-PEGilado.

Alquilação redutiva para produzir uma população substancialmente homogénea de monopolímero/Sp35 em termos gerais inclui as etapas de: (a) reacção de uma proteína ou polipeptídeo Sp35 com uma molécula de PEG reactiva sob condições de alquilação redutiva, num pH adequado para permitir a modificação selectiva do grupo amino N-Terminal de Sp35; e (b) obtenção do(s) produto (s) de reacção.

Para uma população substancialmente homogénea de monopolímero Sp35, as condições de reacção de alquilação redutiva são aquelas que permitem a ligação selectiva da porção de polímero solúvel em água ao N-Terminal de Sp35. Tais condições de reacção em termos gerais fornecem diferenças de pKa entre os grupos amino da cadeia lateral de lisina e o grupo amino N-Terminal. Para os fins da presente revelação, incluindo a invenção, o pH preferencial está na faixa de 3 a 9, preferencialmente 3 a 6.

Os polipeptídeos Sp35 podem incluir uma marcação, por exemplo, uma porção que pode ser posteriormente liberada através de proteólise. Dessa forma, a porção lisina pode ser selectivamente modificada pela primeira reacção de uma marcação His modificada com um ligando de baixo peso molecular, tal como o reagente de Traut (Pierce) que reagirá tanto com a lisina como com o N-Terminal, e então liberando a marcação His. O polipeptídeo então conterá um grupo SH livre que pode ser selectivamente modificado com um PEG contendo um grupo cabeça tiol reactivo, tal como um grupo maleimido, um grupo vinilsulfona, um grupohaloacetato, ou um SH livre ou protegido.

O reagente de Traut pode ser substituído por qualquer ligando que configurará um sitio específico para ligação de PEG. Por exemplo, o reagente de Traut pode ser substituído através de SPDP, SMPT, SATA, ou SATP (Pierce). Similarmente pode-se reagir a proteína com um ligando reactivo amina que insere um maleimido (por exemplo, SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS ou GMBS), um grupo haloacetato (SBAP, SIA, SIAB), ou um grupo vinilsulfona e reagir o produto resultante com um PEG que contém um SH livre.

Em alguns exemplos, tal como em algumas modalidades, a porção polialquilenoglicol é ligada a um grupo cisteína do polipeptídeo Sp35. O acoplamento pode ser efectuado usando, por exemplo, um grupo maleimido, um grupo vinilsulfona, um grupo haloacetato ou um grupo tiol.

Opcionalmente, o polipeptídeo Sp35 é conjugado à porção polietilenoglicol através de ligação lábil. A ligação lábil pode ser clivada em, por exemplo, hidrólise bioquímica, proteólise ou clivagem em sulfidrila. Por exemplo, a ligação pode ser clivada sob condições in vivo (fisiológicas).

As reacções podem realizar-se através de qualquer método adequado utilizado para reacção de materiais biologicamente activos com polimeros inertes, preferencialmente em aproximadamente pH 5 a 8, por exemplo, pH 5, 6, 7 ou 8, se os grupos reactivos estiverem no grupo alfa amino no N-Terminal. Em termos gerais o processo envolve a preparação de um polimero activado e após isso reacção da proteína com o polimero activado para produzir a proteína solúvel adequada para formulação.

Vectores

A presente revelação, incluindo a invenção, fornece vectores compreendendo ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos Sp35. A escolha de vector e sequências de controlo de expressão às quais os ácidos nucleicos desta revelação, por exemplo, ácidos nucleicos desta invenção, são operacionalmente ligados depende das propriedades funcionais desejadas, por exemplo, expressão proteica, e da célula hospedeira a ser transformada.

Elementos de controlo de expressão úteis para regular a expressão de uma sequência de codificação operacionalmente ligada são conhecidos na técnica. Exemplos incluem, mas não são limitados a, promotores induzíveis, promotores constitutivos, sinais de secreção e outros elementos regulatórios. Quando um promotor induzível é usado, este pode ser controlado, por exemplo, através de uma modificação no status nutricional, ou de uma modificação na temperatura, no meio da célula hospedeira.

O vector pode incluir uma replicação procariótica, isto é, uma sequência de ADN tendo a capacidade de dirigir a replicação autónoma e a manutenção da molécula de ADN recombinante extracromossomicamente numa célula hospedeira bacteriana. Esses replicões são bem conhecidos na técnica. Além disso, vectores que incluem uma replicação procariótica também podem incluir um gene cuja expressão confere um marcador detectável, tal como uma resistência a fármaco. Exemplos de genes de resistência a fármaco bacterianos são aqueles que conferem a resistência à ampicilina ou à tetraciclina.

Vectores que incluem uma replicação procariótica também podem incluir um promotor procariótico ou bacteriofágico para dirigir a expressão das sequências genéticas de codificação numa célula hospedeira bacteriana. Sequências promotoras compatíveis com hospedeiros bacterianos são tipicamente

fornecidos em vectores plasmidiais contendo sítios de restrição adequados para inserção de um segmento de ADN a ser expresso. Exemplos de tais vectores plasmidiais são pUC8, pUC9, pBR322 e pBR329 (BioRad), pPL e pKK223 (Pharmacia). Qualquer hospedeiro procariótico adequado pode ser utilizado para expressar uma molécula de ADN recombinante que codifica uma proteína da revelação, por exemplo, uma proteína da invenção.

Vectores de expressão celular eucarióticos são conhecidos na técnica e estão comercialmente disponíveis. Tipicamente, tais vectores contêm sítios de restrição adequados para inserção do segmento de ADN desejado. Vectores exemplares incluem pSVL e pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1, pML2d (International Biotechnologies), pTDT1 (ATCC 31255), vector de expressão retroviral pMIG, vector tipo ponte adenoviral pDC3115 e vectores AAV.

Vectores de expressão de célula eucariótica podem incluir um marcador seleccionável, por exemplo, um gene de resistência a fármaco. O gene da neomicina-fosfotransferase (neo) (Southern et al., 1982, J. Mol. Anal. Genet. 1:327-341) é um exemplo desse gene.

Para expressar os anticorpos ou fragmentos de anticorpo, ADNs que codificam cadeias leves e pesadas parciais ou completas são inseridos em vectores de expressão, tais como plasmídeos, retrovírus, cosmídeos, YACs, episomas derivados de EBV e similares. O vector de expressão e as sequências controlo de expressão são escolhidos para serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. O gene de cadeia leve de anticorpo e o gene de cadeia pesada de anticorpo podem ser inseridos em vectores separados. Em alguns casos, ambos os genes são inseridos no mesmo vector de expressão.

Um vector adequado é aquele que codifica uma sequência de imunoglobulina C_H ou C_L humana funcionalmente completa. Preferencialmente, os sitios de restrição engendrados de forma que qualquer sequência V_H ou V_L possam ser facilmente inseridas e expressas. Em tais vectores, splicing normalmente ocorre entre o sitio doador de junção na região

J inserida e o sitio acceptor de junção que precede a região C humana, e também nas regiões de junção que ocorrem dentro dos éxons de C_H humanos. A poliadenilação e a terminação da transcrição ocorrem em sitios cromossómicos nativos adjacente das regiões de codificação. O vector de expressão recombinante também pode codificar um peptideo sinal que facilita a secreção da cadeia de anticorpo de uma célula hospedeira.

As sequências regulatórias preferenciais para expressão de célula hospedeira mamífera incluem elementos virais que direccionam altos níveis de expressão proteica em células mamíferas, tais como promotores e potencializadores derivados de LTRs retrovirais, citomegalovírus (CMV) (tal como o promotor/potencializador de CMV), Vírus Símio 40 (SV40) (tal como o promotor/potencializador de SV40), adenovírus, (por exemplo, promotor tardio principal de adenovírus (AdMLP)), poliovírus e promotores fortes de mamíferos tal como promotores de imunoglobulina nativa e actina. Para descrição adicional de elementos regulatórios virais e sequências dos mesmos, ver, por exemplo, Stinski Patente U.S. N° 5.168.062; Bell Patente U.S. N° 4.510.245; e Schaffner Patente U.S. N° 4,968,615.

Os vectores de expressão recombinantes podem transportar sequências que regulam a replicação do vector em células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes

marcadores seleccionáveis. O gene marcador seleccionável facilita a selecção de células hospedeiras nas quais o vector foi introduzido (ver, por exemplo, Axel Patentes U.S. N°s 4.399.216; 4.634.665 e 5.179.017). Por exemplo; tipicamente o gene marcador seleccionável confere resistência a fármacos, tais como G418, higromicina ou metotrexato, numa célula hospedeira na qual o vector foi introduzido. Genes marcadores seleccionáveis preferenciais incluem o gene dihidrofolato redutase (DHFR) (para uso em células hospedeiras dhfr" com selecção/amplificação através de metotrexato) e o gene neo (para selecção através de G418).

Moléculas de ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos Sp35 e anticorpos anti-Sp35, e vectores compreendendo estas moléculas de ácidos nucleicos, podem ser usadas para transformação de uma célula hospedeira adequada. A transformação pode ser através de qualquer método adequado. Métodos para introdução de ADN exógeno em células mamíferas são bem conhecidos na técnica e incluem transfecção mediada por dextrana, precipitação através de fosfato de cálcio, transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplasto, electroporação, encapsulamento de polinucleotídeo(s) em lipossomas e microinjecção directa de ADN em núcleos. Além disso, as moléculas de ácidos nucleicos podem ser introduzidas em células mamíferas através de vectores virais.

A transformação de células hospedeiras pode ser realizada através de métodos convencionais ajustados ao vector e à célula hospedeira empregada. Para transformação de células hospedeiras procarióticas, electroporação e métodos de tratamento com sal podem ser empregados (Cohen et al., 1972, Proc. Natl. Acad. Sei. EUA 69:2110-2114). Paratransformação

de células de vertebrados, métodos de electroporação, lipídio catiónico ou tratamento com sal podem ser empregados. Ver, por exemplo, Graham et al., 1973, *Virology* 52:456-467; Wigler et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sei. EUA* 76:1373-1376f.

Linhagens celulares mamíferas disponíveis como hospedeiras para expressão são conhecidas na técnica e incluem muitas linhagens celulares imortalizadas disponíveis no American Type Culture Collection (ATCC). Estas incluem, entre outras, células de ovário de hamster chinês (CHO), NSO, células SP2, células HeLa, células de rim de filhote de hamster (BHK), células de rim de macaco (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por exemplo, Hep G2), células A549, e diversas outras linhagens celulares.

A expressão de polipeptídeos a partir de produção de linhagens celulares pode ser aumentada usando técnicas conhecidas. Por exemplo, o sistema de glutamina sintetase (GS) é comumente utilizado para aumentar a expressão sob certas condições. Ver, por exemplo, Patentes Europeias N°s 0216846, 0256055, e 0323997 e Pedido de Patente Europeia N° 89303964.4.0338841

Células hospedeiras

As células hospedeiras podem ser procarióticas ou eucarióticas. As células hospedeiras eucarióticas preferenciais incluem, mas não são limitadas a, levedura e células mamíferas, por exemplo, células de ovário de hamster chinês (CHO) (No. de Acesso ATCC CCL61), células de embrião de rato NIH Swiss NIH-3T3 (No. de Acesso ATCC CRL1658), e células de rim de filhote de hamster (BHK). Outras células hospedeiras eucarióticas úteis incluem

células de insecto e células vegetais. Células hospedeiras procarióticas exemplares são E. coli e Streptomyces.

Formulações

As composições contendo polipeptídeos Sp35, anticorpos anti-Sp35 ou fragmentos de ligação a antígeno de anticorpos anti-Sp35 podem conter carreadores adequados farmacologicamente aceitáveis. Por exemplo, podem conter excipientes e/ou auxiliares que facilitam o processamento dos compostos activos em preparações concebidas para entrega ao sítio da acção. As formulações adequadas para administração parenteral incluem soluções aquosas dos compostos activos em forma solúvel na água, por exemplo, sais solúveis na água. Além disso, podem ser administradas suspensões dos compostos activos como suspensões de injeção oleosas apropriadas. Solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos gordurosos, por exemplo, óleo de sésamo, ou ésteres de ácido gordo sintéticos, por exemplo, oleato de etila ou triglicerídeos. Suspensões de injeção aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão incluindo, por exemplo, carboximetilcelulose de sódio, sorbitol e dextrana. Opcionalmente, a suspensão também pode conter estabilizadores. Também podem ser usados lipossomas para encapsular as moléculas da revelação, por exemplo, as moléculas da invenção, para administração em células ou espaços intersticiais. Carreadores exemplares farmacologicamente aceitáveis são solventes fisiologicamente compatíveis, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, isotónicos e agentes de retardo da absorção, água, salina, salina tamponada em fosfato, dextrose, glicerol, etanol e similares. Em alguns exemplos, tal como em algumas

modalidades, a composição compreende agentes isotónicos, como açúcares, poliálcoois, tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio. Em alguns exemplos, tal como em algumas modalidades, as composições compreendem substâncias farmacologicamente aceitáveis tais como humidificantes ou quantidades menores de substâncias auxiliares, tais como agentes humidificantes ou emulsificantes, conservantes ou tampões, que aumentam o prazo de validade ou a eficácia dos ingredientes activos.

Composições da revelação, por exemplo, composições da invenção, podem estar numa variedade de formas, incluindo, por exemplo, líquida (por exemplo, soluções injectáveis eufusíveis), dispersões, suspensões, formas de dosagem semissólidas e sólidas. A forma preferencial depende do modo de administração e aplicação terapêutica.

A composição pode ser formulada como uma solução, micro-emulsão, dispersão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada adequada à alta concentração de fármaco. Soluções injectáveis estéreis podem ser preparadas pela incorporação do ingrediente activo em quantidade necessária num solvente apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes listados acima, como necessário, seguido de esterilização através de filtração. Em termos gerais, as dispersões são preparadas pela incorporação do ingrediente activo num veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e outros ingredientes necessários daqueles listados acima. Em caso de pós estéreis para preparação de soluções injectáveis estéreis, os métodos preferenciais de preparação são a secagem a vácuo e a liofilização que produz um pó do ingrediente activo mais qualquer ingrediente desejado adicional a partir de uma solução anteriormente filtrada de modo estéril. A fluidez adequada de uma solução pode ser

mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, tal como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso da dispersão e pelo uso de tensioactivos. A absorção prolongada de composições injectáveis pode ser ocasionada pela inclusão na composição de um agente de retardo de absorção, por exemplo, sais monoestearato e gelatina.

O ingrediente activo pode ser formulado com uma formulação ou dispositivo de liberação controlada. Exemplos de tais formulações e dispositivos incluem implantes, adesivos transdérmicos e sistemas de entrega microencapsulados. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados, como por exemplo, acetato de vinil-etileno, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido poliláctico. Métodos para preparação de tais formulações e dispositivos são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Formulações de liberação lenta injectáveis podem ser feitas pela formação de matrizes microencapsuladas do fármaco em polímeros biodegradáveis, tais como polilactídeo-poliglicolídeo. Dependendo da razão de fármaco para polímero, e a natureza do polímero empregado, a taxa de liberação de fármaco pode ser controlada. Outros polímeros biodegradáveis exemplares são poliortoésteres e polianidridos. Formulações de liberação lenta injectáveis também podem ser preparadas pela captura do fármaco em lipossomas ou microemulsões.

Compostos activos suplementares podem ser incorporados nas composições. Em alguns casos, um polipeptídeo Sp35, anticorpo anti-Sp35 ou fragmento do mesmo é co-administrado com um anticorpo anti-NgR1, ou um fragmento de ligação a

antígeno do mesmo, ou polipeptídeos NgR1 solúveis ou proteína de fusão NgR1.

Os regimes de dosagem podem ser ajustados para fornecer a resposta óptima desejada. Por exemplo, pode ser administrado um bólus único, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo, ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado através das exigências da situação terapêutica. É vantajoso formular composições parenterais na forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. Ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, PA 1980).

Além do composto activo, a forma de dosagem líquida pode conter ingredientes inertes, tais como água, álcool etílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, álcool benzílico, benzoato de benzila, propilenoglicol, 1,3-butilenoglicol, dimetilformamida, óleos, glicerol, álcool tetrahidrofurfurílico, polietilenoglicol e ésteres de ácido gordo de sorbitano.

Terapia Génica

Um polipeptídeo Sp35 pode ser produzido in vivo num mamífero, por exemplo, um paciente humano, usando uma abordagem de terapia génica para o tratamento de uma doença, perturbação ou lesão do SNC em que a redução da inibição da extensão axonal seria terapêuticamente benéfica. Isto envolve a administração de um ácido nucleico Sp35 adequado que codifica o polipeptídeo operacionalmente ligado a sequências de controlo de expressão adequada. Preferencialmente, estas sequências são incorporadas num vector viral. Vectores virais adequados para tal terapia génica incluem vectores adenovirais,

vectores lentivirais, vectores baculovirais, vectores virais de Epstein Barr, vectores papovavirais, vectores virais de vacinia, vectores virais de herpes simplex, e vectores de vírus adenoassociado (AAV). O vector viral pode ser um vector viral de replicação defeituosa. Um vector adenoviral preferencial tem uma deleção no seu gene E1 ou gene E3. Quando um vector adenoviral é usado, preferencialmente o mamífero não é exposto a um ácido nucleico que codifica um gene marcador seleccionável.

Exemplos

A invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos experimentais. Os exemplos são fornecidos apenas para fins ilustrativos e não devem ser interpretados como limitação do âmbito ou do conteúdo da invenção de nenhum modo.

Exemplo 1: Padrão de Expressão de Sp35

A expressão de Sp35 em tecidos humanos foi avaliada pela análise através de Northern blotting. Múltiplos blots de tecido contendo os 12 tecidos principais humanos ou 14 tecidos do SNC humano foram hibridizados durante a noite a 68°C com sonda para Sp35 marcada com P³² (nucleotídeos 150 a 450 da sequência de cADN de Sp35). Os blots foram lavados 3 vezes com SSC 2x, SDS 0,5% e depois 3 vezes com SSC 0,5x, SDS 0,1%. O blot então foi exposto ao filme de raio x e os níveis de mRNA visualizados através de autorradiografia.

O Sp35 foi altamente expresso no cérebro humano mas não no coração, músculo-esquelético, cólon, timo, baço, rim, fígado, intestino delgado, placenta, pulmão e leucócitos de sangue periférico. O Sp35 foi expresso em todos os tecidos cerebrais testados, incluindo tecidos isolados de córtex frontal, córtex posterior, córtex entorrinal, hipocampo,

bulbo olfatório, estriato, tálamo, cerebelo, mesencéfalo, ponte, medula e medula espinhal. Um gradiente de expressão genética ao longo do eixo rostral/medular foi observado para Sp35, com níveis mais altos no córtex cortical e níveis mais baixos na medula espinhal.

A marcação imunohistoquímica (IHC) foi usada para determinar se Sp35 é expresso em células cerebrais específicas. Cérebros de rato, secções de medula espinhal, ou culturas de neurónio granular primário fixados em paraformaldeído a 4% foram incubados com anticorpos primários para Sp35, como indicado, seguido de anticorpos secundários conjugados a Alexa 480 ou 590 (Molecular Probes Inc) . As secções foram depois montadas em Vectashield e visualizadas através de microscopia de fluorescência. Os anticorpos específicos anti-Sp35 usados para IHC foram gerados de uma biblioteca de exposição de fago Fab usando tecnologia de MorPhosys.

O Sp35 é expresso especificamente em neurónios e oligodendrócitos, mas não em astrócitos. Isto foi determinado em ensaios nos quais secções de tecido de cérebro de rato foram marcadas com vários agentes, incluindo o marcador anti-astrócito GFAP, um anticorpo para um marcador (O4) de oligodendrócito e um anticorpo para o marcador de tubulina neuronal (β III, todos contra-marcados com um anticorpo anti-Sp35. Os oligodendrócitos e os neurónios foram intensamente marcados com o anticorpo anti-Sp35. A marcação de astrócitos não foi observada.

Como confirmação independente do padrão de expressão de Sp35, realizamos RT-PCR semi-quantitativa usando mRNA extraído (conjunto Ambion) de culturas celulares primárias de rato de astrócitos, oligodendrócitos, e neurónios

granulares de cerebelo purificados. Um iniciador de sentido directo AAGGCCAGCAGGTGTTTGTGGA (SEQ ID N°: 14) e um iniciador de sentido inverso TACTCGATCTCGATGTTGTGCTTT (SEQ ID N°: 15) foram usados. Após 26 ciclos, uma banda forte foi observada em mRNA de neurónios, um sinal distinto, mas mais fraco foi detectado no mRNA de oligodendrócito e nenhuma banda foi observada em astrócitos.

Exemplo 2: Proteína de Fusão de Sp35-Fc

Para estudar a função biológica de Sp35, foi produzido um constituinte fusionando a porção extracelular de Sp35 humano (resíduos 1 a 531) à dobradiça e região Fc de IgG1 humana. Uma sequência de codificação parcial de Sp35 humano foi obtida através de PCR do clone 227.2 (Incyte) usando o iniciador de sentido directo

5' CAGCAGGTCGACGCGGCCGCATGCTGGCGGGGGCGT3' (SEQ ID N°: 16)

e o iniciador de sentido inverso

5'CAGCAGGTCGACCTCGCCCGGCTGGTTGG3' (SEQ ID N°: 17).

A extremidade cega do produto de PCR foi subclonada no sítio SrfI do vector de PCR SCRIPT AMP (Stratagene) para criar PCR SCRIPT AMP-sp35. Um fragmento Sall foi isolado do PCR SCRIPT AMP-sp35 e subclonado no vector PCRCAMP Ig (derivado do vector PCR SCRIPT AMP de Stratagene em que a sequência Fc gama é subclonada como um fragmento Sall(5') para NotI(3'))r fusionando a sequência sinal Sp35 e a sequência de ectodominio em estrutura (códon 1 a 531) com sequências que codificam a dobradiça e a região Fc de Ig humana. Isolados correctos foram identificados e um fragmento NotI englobando o fragmento Fc de Sp35 foi subclonado no sítio de clonagem NotI único do vector de expressão 293E, CH274, um derivado do vector de

expressão comercial REP4 (Invitrogen). A fusão Sp35-Fc codificada pelo novo vector, CH274/sp35-Fc, foi confirmada pelo sequenciamento de ADN como plasmídeo GT123.

Linhagens celulares estáveis expressando proteína de fusão Sp35-Fc foram geradas através de electroporação de células hospedeiras CHO DG44 com plasmídeo GT123. Células CHO transfectadas foram cultivadas em MEM alfa menos na presença de soro dialisado a 10% e glutamina 4 mM para selecção de crescimento independente do nucleosídeo. Quatorze dias pós-transfecção, as células foram alimentados com meios frescos. Para rastreamento de células expressando Sp35-Fc, células CHO foram marcadas com anti-IgG humana de cabra marcada com Ficoeritrina (PE) (Jackson Labs) e submetidas ao sorteamento de citometria de fluxo de alta velocidade em FACS Mo-Flo (Cytomation). As células que expressaram os níveis mais altos de Sp35-Ig foram seleccionadas. Estas células foram expandidas na cultura através de 7 dias e depois remarcadas e reclassificadas. As células expressando os níveis mais altos de Sp35-Ig foram isoladas como clones individuais em placas de 96 poços. Estes clones foram cultivados durante duas semanas e depois alimentados com meios frescos um dia antes da análise através de FACS para verificar níveis de expressão. Os clones que expressaram os níveis mais altos de Sp35-Fc foram expandidos e foram estabelecidos bancos de células congeladas. As linhagens celulares foram adaptadas para crescerem em cultura de suspensão em meios livres de soro BCM16. O título de Sp35-Fc produzido através destes clones foi determinado pela cultura de linhagens celulares a 37°C através de 4 a 5 passagens e depois a cultura das células à densidade celular máxima de 50% e cultura durante 10 a 15 dias a 28°C até que a densidade celular viável caísse a 75%. Nesta altura, os meios de cultura foram

colectados, clarificados de células e fragmentos através de centrifugação e os sobrenadantes de cultura titulados para níveis de Sp35-Fc pela análise através de Western blot usando um anticorpo anti-Ig humana (Jackson Lab) como a sonda.

A proteína de fusão Sp35-Fc foi purificada do meio de cultura clarificado como se segue: 9 ml de HEPES 1M pH 7,5 foram adicionados a 900 ml de meio condicionado. O meio foi carregado em lotes durante 3 horas a 4°C em 3ml de Sefarose Proteína A (Pharmacia) . A resina foi colectada numa coluna de 1,5 cm (I.D.), e lavada quatro vezes com 3 ml de PBS, duas vezes com 4 ml de PBS contendo NaCl 800 mM, e depois novamente com 3 mL de PBS. A Sp35-Fc foi eluída da coluna com NaH_2PO_4 25 mM pH 2,8, NaCl 100 mM em fracções de 1,5 mL e neutralizada pela adição de 75 μL de NaH_2PO_4 0,5 M pH 8,6. Fracções contendo pico de proteína foram identificadas através de absorvância em 280 nm, agrupadas e submetidas à purificação adicional numa coluna de 1 mL de Proteína A. Antes do carregamento, NaCl foi adicionado a 600 mM e HEPES pH 7,5 a 50 mM. A coluna foi lavada duas vezes com 600 μL de HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 1 M, e então com 1 mL de PBS. A Sp35-Fc foi eluída da coluna com NaH_2PO_4 25 mM pH 2,8, NaCl 100 mM, colectando fracções de 0,5 mL, e neutralizada pela adição de 25 μL de NaH_2PO_4 0,5 M pH 8,6. Fracções contendo pico de proteína foram identificadas pela absorvância em 280 nm e agrupadas. Pelo SDS-PAGE redutor, a Sp35-Ig migrou como uma banda única (pureza >95%) com uma massa aparente de 90 kDa. Sob condições não redutoras, a proteína correu como um dímero com uma massa aproximada de 180 kDa. A Sp35-Fc purificada foi aliquoteada e armazenada a -70°C. O fragmento NotI de GT123, que contém aminoácidos 1 a 531 de Sp35 e Fc de IgG1 humana, foi subclonado no sítio de NotI do vector PV90 para criar DB002.

Exemplo 3: Proteína de Fusão His-AP-Sp35

Para estudar e isolar o receptor para Sp35, a proteína foi expressa em células COS7 e CHO como proteína de fusão fosfatase alcalina marcada com His (His-AP). O plasmídeo foi construído como se segue: O domínio extracelular de Sp35 (a.a. 34 a 532) foi amplificado através de PCR usando iniciadores (sentido directo) 5'-

AATTAAGAATTCACGGGCTGCCCCGCCCGCTGCGAGT-3' (SEQ ID N°: 18),

contendo um sítio de clivagem de Eco RI (sublinhado), e (sentido inverso) 5'-TATATTTCTAGATCACTCGCCCG-GCTGGTTGGAGATGAAAGCGA-3' (SEQ ID N°: 19), contendo um sítio de clivagem de Xba I (sublinhado). O produto de PCR foi clivado com Xba I, a extremidade coesiva resultante substituída com ADN T4 polimerase, então digerido com Eco RI e purificado em gel. O produto digerido foi ligado num fragmento Hind III-substituído/EcoRI His-AP a partir do vector His-AP-pcADN 1.1 (Invitrogen). O fragmento His-AP-Sp35 foi digerido com Hind III e Eco RI, substituído e, depois ligado em sítio Not I substituído no vector pV90. A sequência de ADN da inserção foi confirmada pelo sequenciamento de ADN.

Células COS7 foram divididas no dia anterior à transfecção. Utilizou-se ADN de vector His-AP-Sp35 (8 µg) para transfectar 5×10^6 células usando lipofectamina (Invitrogen). O meio condicionado foi colectado 48 h pós-transfecção.

Desenvolvemos uma linhagem de células CHO que expressa a proteína de fusão His-AP-Sp35 usando o plasmídeo pV90. Células hospedeiras CHO DG44 (2×10^6 células) foram transfectadas com 100 µg do plasmídeo através de

electroporação. As células foram cultivadas em MEM alfa menos na presença de soro dialisado a 10% e glutamina 4 mM para selecção do crescimento independente do nucleosídeo. Células de quatorze dias pós-transfecção foram alimentadas com meios frescos com antecipação do rastreamento através de sorteamento de FACS Mo-Flo (Cytomation). Células CHO transfectadas foram marcadas com anticorpo monoclonal 8B6 de rato dirigido contra fosfatase alcalina placentária humana (Sigma). Utilizou-se um anticorpo secundário, anti-IgG de rato de cabra marcada com PE, para produzir um sinal específico para células transfectadas. Após marcação com PE, as células foram submetidas ao sorteamento através de citometria de fluxo em alta velocidade e as 5 % superiores foram seleccionadas.

Para produzir meio condicionado com His-AP-Sp35, as células que expressaram os níveis mais altos de His-APSp35 foram seleccionadas. As linhagens celulares foram adaptadas para cultivo na cultura em suspensão em meios livres de soro (BCM16). O título de His-AP-Sp35 que foi produzido através destes clones foi determinado pela cultura de linhagens celulares a 37°C através de 4 a 5 passagens e depois pela cultura das células a 50% da densidade celular máxima e cultivando-as durante 10 a 15 dias a 28°C até que a densidade celular viável caísse para 75%. Os meios de culturas foram colectados, clarificados de células e fragmentos através de centrifugação, e os sobrenadantes de cultura titulados para níveis de His-AP-Sp35 pela análise através de Western blotting usando anticorpo anti-AP humano (Jackson Labs) como a sonda.

His-AP-Sp35 foi purificado do meio condicionado como se segue: 400 mL de meio condicionado de células CHO que expressam His-AP-Sp35 foram diluídos com 400 mL de água.

Trietanolamina pH 8,5 foi adicionada a 25 mM de um estoque 0,5 M e a amostra foi carregada em lote durante 2 horas a 4°C sobre 6 ml de resina de troca aniônica Fractogel TMAE (EM Industries). A resina foi colectada em coluna de 1,5 cm (I.D.), e lavada duas vezes com 6 mL de HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 50 mM. O AP-Sp35 foi eluído da coluna com HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 200 mM em fracções de 2 mL. Fracções de pico foram identificadas pelo monitoramento de actividade de AP e através de SDS-PAGE. A fracção eluída da coluna TMAE foi diluída ainda com 300 ml de água e carregada em lote durante a noite a 4°C sobre 6 ml de resina TMAE. A resina foi colectada e lavada como descrito acima e eluída com HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM. Fracções de pico foram identificadas novamente pelo monitoramento de actividade de AP e através de SDS-PAGE. His-AP-Sp35 da primeira coluna era 50% pura e AP-Sp35 da segunda coluna era 90% pura. Sob condições redutoras, a His-AP-Sp35 migrou em géis de SDS-PAGE com uma massa aparente de 130 kDa. Embora o material puro de 90% fosse apropriado para a maioria das investigações, para alguns estudos a His-AP-Sp35 foi ainda purificada em resina de agarose Ni-NTA (Qiagen). NaCl foi adicionado às fracções de eluição da coluna TMAE a 800 mM e trietanolamina 0,5 M pH 8,5 e imidazol 1M pH 7,0 foi adicionado a 25 mM e 15 mM, respectivamente. 4,5 ml da amostra foram carregados para uma coluna NiNTA de 400 µL. A coluna foi lavada três vezes com Trietanolamina 25 mM pH 8,5 NaCl 800 mM, imidazol 15 mM, e a His-AP-Sp35 foi eluída da coluna com imidazol 200 mM pH 7,0, NaCl 350 mM, colectando fracções de 200 µL. Fracções de pico contendo AP foram agrupadas e dialisadas durante a noite contra 250 volumes de HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 200 mM. MgCl₂ e ZnCl₂ foram adicionados ao retentor a 2 e 0,25 mM, respectivamente. O produto final teve pureza maior que 95%

através de SDS-PAGE, e correu como uma banda única com massa de aproximadamente 140 kDa sob condições redutoras.

Os constituintes de Sp35 também foram engendrados como fusões de Fc. Um constituinte Sp-35 LRR-Fc foi gerado através de PCR usando iniciadores (sentido directo) 5'CTTGACACGGGATCCGCGGCCGCATGCTGGCGGGGGGCGTGAGG3' (SEQ IDN°: 20) e (sentido inverso) 5'GCAGCGGGGCGGGCAGCCCCGTGGCCGAGCCTGACAGCACTGAGCC3' (SEQ ID N°: 21). O produto de PCR foi inserido no sitio NotI do vector PV90. O constituinte Sp35 IG-Fc foi gerado através de PCR usando iniciadores (sentido directo) 5'CTTGACACGGGATCCGCGGCCGCATGCTGGCGGGGGGCGTGAGG3' (SEQ IDN° : 22) e (sentido inverso) 5'GTCCCGGATGCGGGCGCGGGCCGAGCCTGACAGCACTGAGCCCAG3' (SEQ ID N° : 23). O produto de PCR foi inserido no sitio NotI do vector PV90. As proteínas foram expressas em células CHO e purificadas usando uma coluna de sefarose proteína A.

Exemplo 4: Ligação de Sp35 a Células Expressando NgR1

Quatro métodos diferentes foram usados para mostrar a ligação de Sp35 a NgR1. Primeiro detectámos a interação num ensaio de ligação directo no qual o conjugado fosfatase alcalina-Sp35 (AP-Sp35) foi incubado com células expressando NgR1 e ligação avaliada usando um reagente de detecção AP cromogénico. Células COS7 90% confluentes foram cultivadas em placas de cultura de tecido de 100 mm e transfectadas com plasmídeos para expressão de NgR1 usando reagentes Fugene 6 (Roche). Após 48 horas, as células transfectadas foram lavadas uma vez com HBH (tampão salinobalanceado com Hank, BSA 1 mg/ml, HEPES 20 mM, pH 7,0), edepois incubadas através de 1,5 h a 23°C com 4 µg/ml daproteína de fusão AP-Sp35 em HBH. As células foram lavadas com tampão HBH gelado 3 vezes durante 3 minutos

cada e dois fixadas com formaldeído 3,7% em HEPES 20 mM, pH 7,0, NaCl 150 mM durante 15 min, e transferidas de volta para otampão HBH. A AP termolábil endógena foi inactivada pelo calor durante 2 horas a 67°C. A AP-Sp35 ligada foi detectada pela incubação com azul de nitrotetrazólio NBT (Roche). A Ap-Sp35 ligada a células COS7 expressando receptor de NgR1 humano, mas não para controlar células COS7 transfectadas com o vector sozinho. O padrão demarcação pontilhado de NgR1 foi observado, reflectindo que somente uma fracção, provavelmente de 50% das células, foi transfectada com o NgR1.

Para quantificar melhor a ligação, realizámos o mesmo experimento, mas amostras celulares paralelas foram tratadas com 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,125, 0,06 µg/ml de AP-Sp35. A AP ligada foi incubada com 4-nitrofenil fosfato e a actividade de AP avaliada num leitor de placa de 96 poços (Molecular Devices). A partir destes dados, estimamos que a EC50 da ligação de Ap-Sp35 a NgR1 humano foi aproximadamente 6 nM.

Em segundo lugar, detectamos a ligação de Sp35 a NgR1 numa abordagem através de ELISA. Placas ELISA (Costar) foram recobertas com receptores de NgR1-Fc solúveis 10 µg/ml (sNgR310-Fc contendo peptídeo NgR1 35-310 de ratazana fusionado à dobradiça e Fc da IgG1 de ratazana e sNgR344-Fc contendo peptídeo NgR1 35-344 de ratazana fusionado a IgG1 de rato) em NaHCO₃ 0,1M, pH 9,0 durante 1ha 37°C. As placas foram bloqueadas e lavadas com Hepes 25 mM, pH 7,0, BSA 0,1%, ovoalbumina a 0,1%, leite em pó desnatado a 0,1% e NaN₃ 0,001%. A proteína AP-Sp35, 4 µg/ml, foi adicionada à placa e incubada durante a noite a 4°C. As placas então foram lavadas com Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM e AP ligada detectada usando 10 µg/ml do substrato cromogénico

4-nitrofenil fosfato diluído em glicina 0,1 M, $MgCl_2$ 1 mM, $ZnCl_2$ 1 mM pH 10,5. A DO_{410} foi determinada num leitor de ELISA (Molecular Devices) equipado com programa Softmax. A AP-Sp35 ligou-se a sNgR-344-Fc imobilizado mas não a proteína sNgR-310-Fc, indicando que a versão mais longa de NgR1 foi necessária para ligação de Sp35. Fomos capazes de competir a ligação de AP-Sp35 a sNgR344-Fc NgR1 em 80% pela pré-incubação de AP Sp35 com excesso de 100 vezes de sNgR344-Fc. Nenhuma competição de ligação foi vista usando uma proteína de fusão de Igl hedgehog de ratazana como uma proteína controlo de fusão de Ig de rato.

Em terceiro lugar, detectámos a ligação de Sp35 a NgR1 através de co-immunoprecipitação de Sp35 com NgR1. Para este estudo, células COS7 a 80% confluentes, cultivadas em placas de cultura de tecido de 100 mm, foram transfectadas com plasmídeos que codificam sp35-hemaglutinina (SP35-HA) e NGR-FLAG usando reagentes Eugene 6 (Roche) 48 horas após a transfecção, as células foram colectadas e lisadas em 1ml de tampão de lise (HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 a 1% e glicerol a10%) a 4°C durante 30 minutos. O lisado foi depois centrifugado a14.000x g durante 15 min, e os sobrenadantes colectados e incubados a 4°C durante a noite com agitação, usando matriz de afinidade anti-HA (Roche). As amostras foram lavadas 3 vezes com 1 ml de tampão de lise e depois fervidas durante 3 minutos no tampão de amostra Laemmli, submetidas a SDS-PAGE de 4 a 15%, e analisadas através de imunomarcação com anticorpo Anti-FLAG M2 (Sigma). A resina de afinidade de marcação anti-HA colectou um complexo contendo tanto Sp35-HA como FLAG-NGR, como é evidente pela presença de FLAG. Este complexo não foi visto em lisados de transfecçõescontrolo nos quais as células foram tratadas com plasmídeo Sp35-HA ou plasmídeo FLAG-NgR1 sozinho, ou

células que foram co-transfectadas com Flag-NgR1 e uma proteína controlo marcada com HA que não se liga a NgR1.

Sp35-HA foi feito como se segue. A sequência sinal de Sp35 e o domínio extracelular (aminoácidos 1 a 531) foram amplificados através de PCR usando iniciadores 5'ATATTCTAGAAATGCTGGCGGGGGCGTGAG3' (SEQ ID N°: 24) e 5'ATATACTAGTGTCGTTGCCGCCCGCGTTGG3' (SEQ ID N°: 25) contendo sítios de XbaI e SpeI (sublinhados). O produto de PCR foi digerido através de XbaI e SpeI e inserido no vector pCGCHA entre os sítios de Xba I e Spe I. A sequência da inserção foi confirmada pelo sequenciamento de ADN. Constituinte FLAG NgR1 foi presente de doutor Zhigang He (Nature, Vol 4 20, Nov 7, 2002).

Em quarto lugar, mostrámos que AP-Sp35 se ligou aos neurónios granulares cerebelo de ratazana (CGN) que expressam NgR1. Para este experimento, células CGN 90% confluentes no dia 8 pós-natal foram cultivadas em placas de cultura de tecido de 100 mm. Após 48 horas, as células foram lavadas uma vez com o tampão HBH, e depois incubadas com 4 µg/ml de AP-Sp35 em tampão HBH durante 1,5 horas a 23°C. As células foram depois lavadas com HBH gelado 3 vezes durante 3 minutos cada e depois fixadas com formaldeído 3,7% em HEPES 20 mM, pH 7,0, e NaCl 150 mM durante 15 min, e transferidas de novo para HBH. A AP termolábil endógena foi inactivada através de calor durante 2 horas a 67°C. A AP-Sp35 ligada foi detectada pela incubação com azul de nitrotetrazólio NBT (Roche). AP-Sp35 ligou-se a neurónios granulares cerebelares do dia 8 pós-natal, que expressam NgR1. A ligação de AP-Sp35 aos neurónios foi inibida pelo tratamento de CGN com PIPLC (5 unidades/ml) que cliva a maioria das proteínas ancoradas

através de GPI nas superfícies da membrana. Uma vez que NgR1 é uma proteína ligada a GPI, este resultado suporta ainda a noção que Sp35 está ligada a NgR1 em células CGN.

Exemplo 5: Co-localização de Sp35 com NgR1

Para determinar se Sp35 e NgR1 estão expressas nos mesmos neurónios, realizámos um estudo de co-localização. Culturas de neurónio granular primário p8 de ratazana fixadas em paraformaldeído a 4% foram incubadas com anticorpos contra Sp35 e NgR1 (Santa Cruz), e depois com os anticorpos secundários marcados com Alexa apropriados (Molecular Probes Inc). As células foram visualizadas pela microscopia de fluorescência confocal. Os neurónios foram intensamente marcados pelos anticorpos para Sp35 e NgR1. Ambas as proteínas foram expressas nos corpos celulares e axónios dos neurónios. Para ajudar na análise de co-localização, diferentes sondas coloridas foram usadas para 2 tipos de anticorpos. Quando as marcações (vermelho para células positivas NgR e verde para células positivas Sp35) foram sobrepostas, vimos uma cor amarela em todas as partes da célula que indica que as duas proteínas foram co-localizadas dentro dos neurónios.

Exemplo 6: Sítios de Ligação a NgR1 dentro de Sp35

Usámos mapeamento de deleção para definir os domínios específicos de Sp35 envolvidos em interações de NgR1. Os seguintes constituintes de deleção foram produzidos usando o conjunto de Stratagene Quikchange Mutagenesis. Verificámos todos os constituintes de vector através de sequenciamento de ADN das inserções modificadas.

His-AP-Sp35b que contém o domínio de repetição rico em leucina de Sp35 mais a região básica (a.a 34 a 432) foi

clonado do vector His-AP-Sp35 (a.a. 34 a 532) através de PCR. Os iniciadores usados foram 5'CCCAGCAGGTGTTTGTGGACGAGTGATCTAGGGCCGCGGATCCCTG-3' (SEQ ID N°: 26) e 5'-CAGGGATCCGCGGCCCTAG ATCACTCGTCCACAAACACCTGCTGGG-3' (SEQ ID N°: 27).

His-AP-Sp35d, que codifica o domínio de Ig de Sp35 mais a região básica (a.a 417 a 531), foi clonado do vector His-AP-Sp35a (a.a. 37 a 531) através de PCR. Os iniciadores usados foram 5'CGCCGCGCACCCGGGTGAATCCGCGCCCGC ATCCGGGACCGC-3' (SEQ ID N°: 28) e 5'-GCGGTCCCGGATGCGGGCGC GGAATTCACCCGGGTGCGGGCG-3' (SEQ ID N°: 29).

His-AP-Sp35e, que codifica somente o domínio de Ig (a.a 425 a 531), foi clonado do vector His-AP-Sp35 (aa 34 a 532) através de PCR. Os iniciadores usados foram 5'-CGCCGCGCACCCGGGTGAATTCGCCAGCAGGTGTTTGTGGAC-3' (SEQ ID N° : 30) e 5'-GTCCACAAACACCTGCTGGCGAATTCACCCG GGTGCGGGCG-3' (SEQ ID N°: 31).

Um conjunto e protocolo de mutagênese comercial (Stratagene Quikchange) foram usados para mutar o aminoácido 456 (de arginina para ácido glutâmico) e o aminoácido 458 (de histidina para valina) de Sp35 no vector His-AP-Sp35 (34-532).

Os iniciadores usados foram 5'-CATCCTCTGGCTCTCACCCGAA.AAGGTACTGG TCTCAGCCAAGAGC-3' (SEQ ID N° : 32) e 5'-GCTCTTGGCTGAGACCAGTACCTTTTCGGGTGAGAGCCAGAGGATG-3' (SEQ ID N°: 33).

Os constituintes da deleção His-AP-Sp35 (FIG. 3) foram engendrados em vectores de expressão pV90 e expressos

em células 293. O meio condicionado foi colectado e os aductos de AP purificados através de etapas de cromatografia sequenciais em resina TMAE Fractogel e agarose NiNTA. As proteínas purificadas foram testadas para ligação a NgR1 expesso em células COS7. Os três constituintes ligaram-se todos fracamente a Sp35. Estes resultados indicaram que a repetição de Sp35 LRR 1-14 (aminoácido 34 a 417) e o domínio de Ig de Sp35 (aminoácido 425 a 531) ambos contribuem para a ligação de Sp35 a NgR1. O domínio de Ig mostrou afinidade mais alta do que o domínio LRR.

Um modelo estrutural do domínio de Ig de Sp35 foi gerado usando a estrutura cristalina NCAM como uma estrutura (Rasmussen et al., 2000, Nat. Struct. Biol. 7:389-393). A partir deste modelo, observámos uma alça (números de resíduo 454-458, aminoácidos: SPRKH; SEQ ID N°: 34) que poderia estar envolvida na ligação. Para testar esta hipótese, engendramos um constituinte de Sp35 no qual os resíduos R em 456 e H em 458 foram modificados para E e V, respectivamente. Quando este constituinte foi testado para ligação a NgR1, observamos uma queda > 10 vezes no sinal. Como uma abordagem alternativa para testar a contribuição desta região de alça na ligação, sintetizámos um peptídeo correspondente à sequência LSPRKH (SEQ ID N°: 10) que ciclizámos pela adição de cisteínas no N e C terminal do peptídeo. Sob ligação a NgR1, este peptídeo bloqueia, inibe ou interfere na função de NgR1.

Exemplo 7: Sp35 induz fasciculação de CGN p8

Para determinar a função biológica de Sp35 em neurónios, incubámos Sp35-Fc com neurónios granulares no dia 8 pós-natal para ver se Sp35 pode regular o crescimento

doneurito. Lâminas de cultura de Labtek (8 poços) foram recobertas com poli-D-lisina 0,1 mg/ml (Sigma) antes de colocação da proteína Sp35-Fc (16 µg de proteína/poço). As lâminas foram secas durante a noite e depois enxaguadas e recobertas com laminina 10 µg/ml (Gibco). Neurónios granulares de cerebelo do dia 8 pós-natal foram dissociados e semeados nas lâminas pré-recobertas. As culturas na lâmina foram incubadas a 37°C em CO₂ a 5% durante 24 horas. As lâminas foram depois fixadas em paraformaldeído a 4% contendo sacarose a 20% e marcadas com anti-tubulina (β III (Covance TUJ1)). Após 24 horas, os CGN mostraram morfologia clara de fasciculação como evidente pela agregação dos neurónios. A fasciculação não foi vista nas células não tratadas ou controlos de amostra recobertos com proteína Fc.

Exemplo 8: Efeitos de Sp35 sobre a Activação/Inactivação de RhoA:

Sp35-Fc induziu neurónios granulares pós-natais de cerebelo a sofrer fasciculação. Como a molécula sinalizadora RhoA é conhecida ser envolvida na fasciculação, determinámos se Sp35-Fc pode regular funções de RhoA em neurónios. Realizámos o experimento de activação de RhoA como se segue: células 293 ou células COS7 foram transfectadas com vectores de expressão contendo combinações de RhoA, Sp35 ou NgR1 usando reagentes Fugene 6 (Roche). 48 h pós-transfecção, as células foram privadas de soro durante a noite e depois lisadas a Tris 50 mM, pH 7,5, Triton X-100 1%, desoxicolato de sódio a 0,5%, SDS a 0,1%, NaCl 500 mM, MgCl₂10mM, mais um coquetel de inibidor de protease. Os lisados celulares foram clarificados pela centrifugação a13.000xg a 4°C durante 5 minutos, e 95% dos sobrenadantes foram incubados com 20 µg de uma matriz de afinidade

aodomínio de ligação GST-Rho immobilizado (contas de Rhotekin, Upstate Biotechnology) a 4°C durante 45 minutos. As contas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (Tris 50 mM, pH7,5 Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, MgCl₂10mM, cominibidores de protease). A Rho ligada a GTP foi eluída das contas através de aquecimento a 95°C durante 5 min em tampão de amostra de SDS-PAGE. As proteínas Rho ligadas e totais foram detectadas através de Western blotting usando um anticorpo monoclonal contra RhoA (Santa Cruz). Células COS7 e HEK293 transfectadas com Sp35 induziram activação de RhoA, como evidente através de um aumento na quantidade de RhoA-GTP detectada no blot após transfecção com o gene Sp35. Um aumento adicional em RhoA-GTP foi observado após tratamento com Sp35-Fc. Em contraste com o aumento em RhoA-GTP após transfecção com Sp35 sozinho, quando as células foram transfectadas com Sp35 e NgR1, RhoA foi parcialmente inactivada. O tratamento destas células com Sp35-Fc resultou na inactivação adicional de RhoA.

Confirmámos uma resposta de sinalização através de Sp35 usando um ensaio FLIPR (Molecular Devices) para determinar os efeitos do tratamento com Sp35 sobre o fluxo de Ca⁺⁺. Observamos um significativo fluxo de Ca⁺⁺ em células expressando Sp35 com tratamento de sp35-Fc, mas não nas células controlo tratadas com Sp35-Fc. O fluxo de Ca⁺⁺ foi reduzido quando as células que tinham sido co-transfectadas com NgR1 e Sp35 foram tratadas com proteína de fusão Sp35- Fc.

Exemplo 9: Interação da Proteína Sp35 com si mesma

Como os domínios de LRR frequentemente estão envolvidos em interações homotípicas, observámos que a adição de Sp35 solúvel a células transfectadas com Sp35 causou um aumento em RhoA-GTP acima do que foi observado com

transfecções com Sp35 somente e testámos a ligação de Sp35 a si mesma. Para realizar este teste, usámos a co-
imunoprecipitação. Células COS7 80% confluentes, cultivadas em placas de cultura de tecido de 100 mm, foram transfectadas com plasmídeos Sp35 HA ou SP35-FLAG, ou ambos, usando reagentes Eugene 6 (Roche). Quarenta e oito horas após a transfecção, as células foram colectadas e lisadas em 1 ml de tampão de lise (HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 a 1% e glicerol a 10%) a 4°C durante 30 minutos. O lisado foi depois centrifugado a 14.000xg durante 15 minutos, e os sobrenadantes colectados e incubados, a 4°C durante a noite com agitação, com uma matriz de afinidade anti-HA (Roche). As amostras foram depois lavadas 3 vezes com 1 ml do tampão de lise, fervidas no tampão de amostra de Laemmli, submetidas a SDS-PAGE 4 a 15%, e analisadas através de imunomarcação com anticorpos anti-FLAG. A resina de anticorpo anti-HA capturou um complexo que continha SP35-FLAG, como determinado através de Western blotting. Isto indicou uma interação directa de Sp35 com si mesma. Também tratámos células transfectadas com HA-Sp35 com Sp35-Fc e usámos uma abordagem de imunoprecipitação similar para mostrar que HA-SP35 se ligou a Sp35-Fc.

Sp35-FLAG foi feito como se segue. O dominio extracelular do gene de Sp35 (a.a. 1 a 531) foi amplificado através de PCR usando iniciadores 5'AATTAAGCGGCCGCATGCTGGCGGGGGCGGT3' (SEQ ID N°: 35) e 5'AATTAAGCGGCCGCTTTGTCATGT' 3 (SEQ ID N°: 36) contendo sitios de NotI (sublinhados). O produto de PCR foi digerido através de NotI e inserido no sitio de NotI do vector pV90. A sequência de ADN da inserção foi confirmada pelo sequenciamento de ADN.

Exemplo 10: Transplante In Vivo de Células Transformadas com Sp35

Para determinar a função biológica de Sp35 na medula espinhal danificada de ratos, infectámos células cultivadas primárias corticais (culturas mistas) com retrovírus expressando a Sp35 completa ou um retrovírus controlo, para entrega no epicentro danificado de medulas espinhais de rato. 2×10^6 células foram introduzidas e os ratos foram sacrificados no dia 10. As medulas espinhais foram fixadas em paraformaldeído 4% durante a noite e depois desidratadas em 70%, seguidas através de ETOH 95%. Amostras de tecido foram bloqueadas em parafina. As secções (10 microns de espessura) foram usadas para marcação imunohistoquímica. Os ratos que receberam células expressando Sp35, em comparação ao controlo, mostram menos retracção de axónio e mais marcação com tubulina- β III perto do epicentro. Foi observada a sobrevivência neuronal aumentada nos ratos danificados que recebem Sp35.

O constituinte de retrovírus de Sp35 foi feito como se segue: O gene Sp35 foi amplificado através de PCR usando iniciadores 5'-GATTACTCGAGATGCTGGCGGGGGCGTGAGG-3' (SEQ ID N°: 37), contendo um sítio de XhoI (sublinhado), e 5' CGCGGGAATTCTCATATCATCTTCATGTTGAACTTG-3' (SEQ ID N°: 38), contendo um sítio de EcoRI (sublinhado). O produto de PCR foi digerido com XhoI e EcoRI, depois ligado no vector de pMIG de Retrovírus (que contém IRES-GFP), que foi anteriormente clivado com XhoI e EcoRI. O novo vector foi denominado pMMC078. Todos os isolados de pMMC078 continham mutações pontuais inadvertidas, portanto dois isolados de pMMC078 foram ligados em conjunto, o pMMC078.6 foi cortado com XhoI e AccI e o pMMC078.7 foi cortado com XhoI e AccI. Estes dois fragmentos foram ligados em conjunto para

construir o plasmídeo correcto final, pMMC089. A sequência de ADN da inserção foi confirmada através de sequenciamento de ADN. O retrovírus de Sp35 foi feito como descrito. As células 293G foram cortadas no dia anterior à transfecção. 8 µg de ADN de retrovírus de Sp35 foram usados para transfectar 5×10^6 células através de lipofectamina (Invitrogen). O meio condicionado foi colectado após pós-transfecção de 92 horas. O meio condicionado foi centrifugado a 5000g durante 10 minutos, e o sobrenadante utilizado como um estoque de retrovírus de Sp35. Este estoque foi armazenado a 4°C durante 1 semana ou -80°C durante 6 meses.

Exemplo 11: Modelo Animal de Lesão de Medula espinhal

Todos os procedimentos cirúrgicos são realizados usando uma técnica asséptica. Dentro de 1 semana antes de qualquer manipulação cirúrgica os animais são tratados. A ampicilina 100 mg/kg SC é administrada profilacticamente antes e após a cirurgia para reduzir a incidência de lesão por infecção urinária.

Os animais são anestesiados usando Midazolam a 2,5 mg/kg IP em conjunto com Isoflurano 2 a 3% em O₂ para anestesia profunda como medida através de beliscão no dedo do pé. Os animais são mantidos numa almofada de aquecimento de água circulante pela duração da cirurgia e recuperação. O lubrificante ocular é utilizado para prevenir a secagem corneana e Atropina 0,05 mg/kg SC é dada para reduzir a salivação excessiva. Uma pequena incisão é feita na pele e o músculo retraído para expor as vértebras. Uma laminectomia dorsal ao nível L6 espinhal (e L7 se a colocação de um cateter intratecal for necessária, verabaixo) é realizada, L6/L7 e os processos espinhais adjacentes rigidamente fixados numa armação espinhal (David

Kopf Instruments). Uma hemissecção dorsal é realizada em L6 com uma tesoura fina de iridectomia interrompendo completamente os componentes dorsomediais principais e do trato corticoespinal dorsolateral menor (CST). Após a cirurgia, o sítio da laminectomia é recoberto com um material protector, tal como Durafilm, e o músculo que recobre suturado com gut cromado 4.0 para proteger a coluna espinalh exposta. A pele é suturada e limpa com uma solução de betadina.

A recuperação funcional dos animais é avaliada usando o método de escore de Basso Beattie e Bresnehan (BBB) comumente utilizado para avaliar ratos após lesão de medula espinalh. Este método quantifica a função de membro posterior de ratos pela análise detalhada de movimento de articulação e capacidade de carregar peso. Os ratos são avaliados no dia após a lesão de medula espinalh e depois semanalmente após isso.

Imediatamente após a transecção de CST, o adenovírus expressando Sp35 ou GFP ou o vírus controlo (10^{10} partículas) são injectados no sítio de transecção e regiões imediatamente caudais e rostrais ao sítio da lesão. Um total de 10 µl de Adv é injectado em 5 sítios diferentes (4ul/sítio). Para administração intratecal de proteína Sp35, um pequeno buraco é feito na dura da medula espinalh em 2 mm caudais à lesão L7 e um cateter intratecal é inserido no espaço subaracnóide em L7. O cateter é lentamente e suavemente deslizado sobre a medula espinalh aproximadamente 1 mm caudal à lesão. A porção do cateter que está fora do espaço intratecal é firmemente suturada no lugar ao tecido circundante. Uma minibomba osmótica preparada (Alza corp.) contendo o material de teste (proteína Sp35 ou proteína controlo) é conectada à

extremidade exposta da cânula guia e inserida no espaço subcutâneo. Após a cirurgia, os sítios de laminectomia são recobertos com um material protector, tal como Durafilm e o músculo que recobre suturado com gut cromado 4.0 para proteger a coluna espinhal exposta. A pele é suturada e limpa com solução de betadina.

Análise Histológica: a cirurgia de investigação de trato ocorre no momento da cirurgia para induzir a lesão de medula espinhal. A pele da cabeça é raspada e limpa com Betadina e álcool a 70%. O animal é colocado numa armação estereotáxica. O escalpo é incisado longitudinalmente e o perióstio é raspado do crânio. Um buraco é furado no crânio aproximadamente de 1 a 2 mm de diâmetro, e uma agulha de vidro de microlitro é inserida verticalmente em 8 posições no córtex motor (as coordenadas são determinadas de acordo com o atlas de cérebro de ratazana de Paxinos e Waston, 1997). Aproximadamente 5 µl de material rastreador de trato (por exemplo, Biotina amina dextrana, 10.000 M.P) é injectado e a agulha é deixada no lugar durante cinco minutos adicionais para permitir a difusão da solução. Após a remoção da agulha, o buraco no topo do crânio é tapado com a espuma em gel e o escalpo grampeado no sítio da lesão. Permite-se que os animais se recuperem e recebam o cuidado pós-operatório (descrito abaixo). Quatro a dez semanas após, os animais são profundamente anestesiados (Inactina 100 a 110 mg/kg ip) e perfundidos para histologia como descrito abaixo. O rastreador de trato é transportado através de mecanismos de transporte anterógrados abaixo do trato espinhal cortical em direcção à extremidade caudal da medula espinhal e fornece um meio de quantificar a conectividade anatómica dentro do trato corticoespinhal.

Para ensaios de imunohistoquímica, os animais são profundamente anestesiados com Inactina (100 a 110 mg/kg IP) 2 a 8 semanas após a cirurgia para induzir a lesão. A cavidade peitoral é aberta e o coração é exposto, para permitir a perfusão. Uma cânula é inserida no ventrículo esquerdo pelo qual 100 cc de PBS gelado são impelidos lentamente (um buraco será cortado no ventrículo direito para permitir a fuga de fluido) . Isto é seguido de um gotejamento lento mas constante de paraformaldeído a 4% (50 a 100ml) até a fixação de olhos/orelhas/dedos do pé ser óbvia. As medulas espinhais são removidas, com cuidado para minimizar a alteração do sítio da lesão, congeladas em OCT, seccionadas, e processadas para imunohistoquímica. Outros tecidos opcionalmente também são coletados para análise posterior. Os animais recebendo Sp35 de adenovírus mostraram brotamento de axônio aumentado como determinado através de marcação com tubulina (β III para axônio de neurônio).

Exemplo 12: Constituintes de Vector Viral de Sp-35

Um vector viral de Sp-35 derivado de pMIG foi feito como se segue. A sequência de codificação de Sp35 completa foi amplificada através de PCR usando iniciadores 5'-GATTACTCGAGATGCTGGCGGGGGCGTGAGG-3' (SEQ ID N°: 37), contendo um sítio de XhoI, e 5'CGCGGAATTCTCATATCATCTTCATGTTGAACTTG-3' (SEQ ID N°: 38), contendo um sítio de EcoRI. O produto de PCR foi cortado com XhoI e EcoRI, depois ligado ao vector Retroviral pMIG (Cheng et al, 1996, Nat. Biotechnol. 145:576) que foi cortado com XhoI e EcoRI. Este vector foi denominado pMMC078. Todos os isolados de pMMC078 contendo mutações pontuais, e por conseguinte dois isolados de pMMC078 foram ligados em conjunto. O vector pMMC078.6 foi

cortado com XhoI e o AccI pMMC078.7 foi cortado com XhoI e AccI. Estes dois fragmentos foram ligados para construir o plasmídeo, pMMC089.

Um vector viral de Sp35-HA derivado de pMIG foi feito como se segue. Um fragmento que codifica aminoácidos 326 a 614 de Sp35 em estrutura com a sequência de HA foi obtido usando PCR com iniciadores 5'-GCCTTCCGCGGCCTCAACTACCT-GCGCGTGCTC-3' (SEQ ID N°: 39), contendo um sítio de SacII, e 5'-CCGGAATTCTCAAGCGTAATCAGGAACGrCGrAAGGGrATATCATCTTCATGTTGAACTTGCGGGGCGCGT CGGC-3' (SEQ ID N°:40), com pMMC089 servindo como um molde. O iniciador mais longo inclui a sequência de HA decodificação (itálico) após códon de Sp35 614 e antes do sítio EcoRI. O produto de PCR foi depois cortado com o SacII e EcoRI, e utilizado para substituir o fragmento SacII-EcoRI contendo códons Sp35 selvagens 326 a 614 no vector retroviral derivado de pMIG.

Um vector baculoviral Sp35-HA foi feito como se segue. A sequência de Sp35-HA de codificação de vector retroviral Sp35-HA foi cortada com Xho I e EcoR I, terminado de maneira cega, e clonado em Bgl2-substituído do sítio do vector em ponte baculoviral pBV-CZPG (Patentes U.S. N°s 6,190,887; e 6,338,953), substituindo o gene LacZ sob promotor de CMV.

Um vector adenoviral Sp35 foi feito como se segue. A sequência de codificação de Sp35-IRES-GFP a partir de Sp35 retroviral foi cortada com Xho I-substituído e Nhe I e depois clonada nos sítios EcoRI-substituído/Nhe I do vector em ponte Adenoviral pDC315, sob promotor de CMV mínimo.

Exemplo 13: Modelo Animal de Remielinização

Ratos fêmeas Long Evans são usados em todos os estudos. Os ratos são anestesiados usando Isoflurano e o T3/4 exposto e uma hemi-laminectomia dorsal realizada. O agente de desmielinização química, lisolecitina (3µl de lisolecitina 1% em salina 0,9%), é depois injectado no lado direito das colunas dorsais da medula espinhal 0,5 a 1 mm abaixo da superfície da medula). Tratamento analgésico apropriado é administrado antes e após a cirurgia.

Três dias depois, o sítio da injeção é re-exposto (sob anestesia com isoflurano, com tratamento analgésico apropriado) e as seguintes terapias injectadas na medula espinhal danificada e uma proteína de codificação de vector de adenovírus de Sp35/proteína controlo é injectada no sítio de lesão. 10^{10} partículas de adenovírus que codifica Sp35 ou controlo GFP num volume de 10 µl serão injectadas na medula espinhal danificada de ratazana em até 5 sítios diferentes no e em torno do sítio de desmielinização induzido através de lisolecitina. Um volume de não mais que 2 µl é injectado em cada um dos 5 sítios de injeção. Para análise histológica de desmielinização/remielinização da medula espinhal 2, 3, 4 ou 6 semanas após a cirurgia, os animais são profundamente anestesiados com inactina (100 a 110 mg/kg ip) e perfundidos com fixador através do coração. A medula espinhal é depois removida e processada para análise. O animal recebendo tratamento com Sp35 mostrou mielinização de axónio aumentada como determinado através de IHC usando anticorpo antiproteína MBP ou luxol fast blue.

Exemplo 14: RNAi de Sp35

Para abordar o papel de Sp35 na função cerebral, introduzimos o RNAi de Sp35 de lentivírus em células CGN pós-natal 8. As células infectadas com RNAi de Sp35 tinham

neuritos mais curtos e taxas mais altas de proliferação do que as células controle. Estes resultados indicam um papel de Sp35 na regulação da activação de RhoA.

Sequências de ADN de Sp35 murino e de ratazana foram comparadas para encontrar regiões homólogas para usar em candidatos ARNsh. OCH324 foi construído pelo anelamento de oligonucleotídeos LV1-035 e LV1-036 e a ligação a HpaI e XhoI digeriou pLL3.7. Os oligonucleotídeos foram adquiridos de MWG. As sequências são:

LV1-035 (oligo sentido)

5'TGATCGTCATCCTGCTAGACTTCAAGAGAGTCTAGCAGGATGACGATCTTTTTTC

(SEQ ID N°: 41)

LV1-036 (oligo antissentido)

5'TCGAGAAAAAAGATCGTCATCCTGCTAGACTCTCTTGAAGTCTAGCAGGATGACGAT
CA(SEQ ID N°: 42)

Antes da produção de vírus, ADN de pLL3.7 ou candidato ARNsh em pLL3.7 foram co-transfectados com plasmídeo marcado com sp35-HA murino em uma razão de 5 para 1 em células CHO em formato de 6 poços. O silenciamento foi analisado pela detecção através de Western blotting de marcação com Sp35-HA de lisados de célula CHO transfectados assim como através de Northern blotting de ARN total preparado de poços em duplicata. O blot foi marcado com um fragmento de 0,7 kb de mSP35. Ensaios foram realizados 48 horas pós-transfecção (dados não mostrados). Vírus foram produzidos a partir do melhor candidato para uso em culturas neuronais de rato. O vector, metodologia adicional e produção de vírus foram como descritos em Rubinson et al. "A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference" Nat. Genet. 33, 401-6 (2003).

Exemplo 15: Activação de RhoA

As células COS7 co-expressando NgR1 e SP35 não mostraram modificação em níveis de RhoA/GTP em resposta a OMgp. Isto sugeriu que o complexo SP35/NgR1 não seja suficiente para mediação de transdução de sinal através de um inibidor de mielina.

Explorámos a possibilidade que um complexo ternário de SP35/NgR1/p75 medeie a sinalização. Duas abordagens foram usadas para avaliar interações entre SP35, NgR1 e p75. Em primeiro lugar, a ligação foi avaliada num ensaio de ligação directa usando um conjugado AP-SP35. O conjugado AP-SP35 ligou-se fracamente a células expressando p75. AP-P75 ligou-se a células expressando NgR1. A ligação de AP-SP35 a NgR1 e p75 foi medida através de ELISA (FIG. 4). Em segundo lugar, a ligação de SP35 a NgR1 e p75 foi avaliada através de co-immunoprecipitação de células COS7 que co-expressam SP35, NgR1 e p75. Um anticorpo anti-NgR1 imunoprecipitou um complexo contendo SP35 e p75. Um anticorpo anti-SP35 também imunoprecipitou um complexo contendo p75. Os dados de interação e co-immunoprecipitação forneceram evidência de uma interação directa entre SP35, NgR1 e p75. Usámos microscopia confocal e anticorpos contra SP35, p75 e NgR1 para mostrar que SP35, NgR1 e p75 se co-localizam em corpos celulares e axónios de neurónios CG p7 de rato.

A seguir mostrámos que a combinação de SP35, NgR1 e p75 é suficiente para as actividades do inibidor de mielina. As células COS7 não neuronais foram engendradas para expressar os três componentes na totalidade. Usando estas células, mostrámos que níveis de RhoA/GTP foram regulados para cima através de OMgp. O tratamento com OMgp-Fc aumentou níveis de RhoA/GTP em células co-expressando SP35/p75/NgR1,

comparando com outras combinações destes três componentes. Confirmámos a expressão das proteínas através de Western blotting de lisados de células C)S7. A afinidade de ligação de inibidores de mielina a NgR1 não foi afectada pela presença de p75 ou p75 e SP35. Os resultados combinados suportam um modelo pelo qual um complexo ternário de NgR1, SP35 e p75 é necessário para a regulação de RhoA na presença de ligandos de NgR1 (FIG. 5).

SP35 contém um domínio citoplasmático que tem envolvimento directo ou indirecto potencial na sinalização. Para determinar o papel do domínio citoplasmático, produzimos um truncamento de domínio citoplasmático de SP35 (aminoácidos 34 a 576 da SEQ ID N°: 2), para funcionar de uma maneira negativa dominante pela formação de um complexo ternário improdutivo, incapaz de sinalização. Denominámos esta molécula com o truncamento de domínio citoplasmático "DN-SP35" (de dominante negativo SP35). Transfectamos neurónios CG no dia 7 pós-natal (p7) com SP35 completo ou DN-SP35, e depois analisámos para a resposta aos componentes inibitórios de mielina (Omgp, mielina e Nogo66). Como mostrado na FIG. 6, as células transfectadas com DN-SP35 falharam em responder aos componentes inibitórios de mielina e mostraram neuritos mais longos que os controlos. Ao contrário, as células transfectadas com constituinte de SP35 completo mostraram resposta aumentada aos substratos inibitórios, e tinham neuritos mais curtos quando comparadas com controlos. Isto demonstrou que DN-SP35 actua como um competidor para atenuar a inibição do crescimento de neurito causada através de componentes de mielina. Esperámos que SP35-Fc exógena solúvel também ligaria NgR1 e bloquearia a acção de substratos inibitórios. Como mostrado na FIG. 7, o SP35-Fc reduziu a inibição do crescimento de neurito através de Omgp, Nogo66 e MAG.

Exemplo 16: Actividade Neuroprotectora

Números iguais de neurónios granulares cerebelares p6 de ratazana foram plaqueados em cada poço de uma placa de cultura celular de 12 poços na presença ou ausência de 50 nM da proteína sp35-Fc. Estas placas de poli-D-lisina foram pré-recobertas [secas para baixo] com 10 µg de mielina do SNC, ou 200 ng de Nogo66, MAG e OMgp ou Fc controlo. As culturas neuronais foram mantidas durante 1 a 7 dias a 37°C e CO₂ 5%. Os neurónios estavam saudáveis e cresceram bem nos poços controlo com PBS independentes do tratamento com sp35-Fc com extensão de neurito completa [determinada pelo marcador específico neuronal, tubulina β III] como examinado após 3 dias. Na ausência de sp35-Fc, os neurónios não cresceram bem nos poços recobertos com mielina, Nogo66, MAG e OMgp. Houve brotamento mínimo de neurito [pequeno e distorcido] e os neurónios não pareceram ser saudáveis, com o corpo celular arredondado e materiais nucleares condensados. Marcação com DAPI demonstrou que o número de neurónios detectados nestes poços foi menor que aqueles nos poços controlo de PBS, sugerindo perda neuronal. Na presença de sp35-Fc, neuritos longos estiveram presentes e os neurónios pareceram saudáveis. Marcação com DAPI demonstrou um número neuronal mais alto nestes poços do que aqueles que não receberam a sp35-Fc. Os dados estão resumidos na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2

Na ausência de Sp35-Fc

Substrato seco para baixo:	Omgp/Nogo/MAG/Mielina	Controlo Fc
Extensão de neurite	Curta	longa

Morfologia de corpo celular	distorcida arredondada	estendida espalhada
Materiais nucleares	condensada	claros
Número de neurónios no final da expt	reduzida	o mesmo que controlo Fc

Na presença de sp35-Fc

Substrato seco para baixo:	Omgp/Nogo/MAG/Mielina	Controlo Fc
Extensão de neurite	Curta	longa
Morfologia de corpo celular	distorcida arredondada	estendida espalhada
Materiais nucleares	condensada	claros
Número de neurónios no final da expt	menos reduzida que o controlo de FC	o mesmo que controlo Fc

Estes dados indicaram que uma forma solúvel de Sp35, por exemplo, Sp35-Fc, possui actividade neuroprotectora.

Em ratos com medula espinhal hemitranseccionada (T9, SCT) marcação de tubulina β -III das secções de medulas espinhais mostraram uma perda substancial de neurónios no sítio de lesão. Utilizou-se um vírus recombinante expressando sp35 para infectar os animais SCT no sítio da lesão. Marcação histológica destas medulas espinhais mostrou um número aumentado de neurónios em torno do sítio da lesão comparado com o grupo controlo que foi infectado com o vector viral. Isto é compatível com os achados experimentais in vitro descritos acima, e indica ainda propriedades neuroprotectoras associadas com Sp35.

Exemplo 17: Sp35 em Modelo Animal de Lesão de Medula Espinhal

Uma vez que Sp35-Fc reduziu a inibição do crescimento de neurito causada através de OMgp, Nogo 66 e MAG in vitro, esperámos que a molécula promovesse a recuperação funcional de lesões do SNC in vivo. Para confirmar isto, administrámos Sp35-Fc a ratos com medula espinhal hemiseccionada, isto é, um modelo animal de trauma agudo do SNC. Como mostrado na FIG. 8 e FIG. 9, ratos tratados com Sp35-Fc demonstraram significativamente a recuperação funcional melhorada, comparados com ratos controlo tratados com IgG.

A lesão da medula espinhal e a análise comportamental foram realizadas como se segue. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados conforme as referências do Comité de Cuidado e Uso Animal de Biogen Institucional. Ratos fêmeas Long Evans (190 a 210g, Charles River, Wilmington, MA) foram anestesiados usando Midazolam 2,5mg/kg, I.P. e Fluotano 2 a 3% em O₂. Uma laminectomia dorsal foi realizada no nível espinhal T6 e T7. Uma hemissecção dorsal foi realizada, interrompendo completamente os componentes de trato corticoespinhal dorsomedial principal e dorsolateral menor (CST). Imediatamente após transecção de CST, um cateter intratecal foi inserido no espaço subaracnóide em T7 e ligado a uma minibomba osmótica preparada (modelo 2004 Alzet) inserida no espaço subcutâneo. Minibombas osmóticas entregaram proteína controlo isotípico IgG Hu (5mg/ml, n=5, Pharmingen), PBS (n=3) proteína de fusão Sp35-Ig Hu solúvel (4,3 mg/ml, n=8) numa taxa de 0,25 µl/h. Após a cirurgia, o sítio da laminectomia foi suturado e o ferimento cutâneo foi grampeado. Cuidado pós-operatório incluiu analgesia

(Buprenorfina 0,05 mg/kg s.c.) durante 3 dias e tratamento com antibiótico (Ampicilina 100 mg/kg s.c. duas vezes diariamente) durante 7 dias após a cirurgia. Bexigas foram expressas manualmente duas vezes durante o dia pela duração do estudo (28 dias) ou até ao retorno da função (o período durante o qual foi observado). Todos os animais foram classificados de forma cega usando o sistema de escore de campo aberto BBB (Basso et al., 1995, J. Neurotrauma 12:1-21; Ono et al., 2003, J. Neurosci.23:5887-5896). Os ratos foram avaliados no dia após a transecção de CST (dia 2) e semanalmente após isso durante 4 semanas usando a escala de avaliação locomotora Basso- Beattie-Bresnahan (BBB). Os investigadores eram cegos para os grupos de tratamento pela duração do estudo.

Exemplo 18: Sobrevivência Neuronal e Regeneração axonal no Modelo de Lesão de Hemissecção do Trato Rubro-espinhal (RST):

Também investigámos os efeitos do tratamento com Sp35 sobre a regeneração de neurónios no trato rubro-espinhal que directamente contribuem para a locomoção.

Ratos Sprague-Dawley adultos de 9 semanas (200 a 250 g) foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg). Sob um microscópio operacional, uma laminectomia dorsal foi realizada e a sétima vértebra espinhal torácica (C7) identificada. Após abrir a dura-máter, uma hemissecção direita foi realizada no nível C7 da medula espinhal usando um par de tesouras de mola. Após hemissecção da medula espinhal, os animais receberam uma peça de espuma em gel embebida com 10 µl de uma solução 2 µg/ml de Sp35-Fc, ou com 10 µl de uma solução 2 µg/ml de Ig humana, ou 10 µl de PBS, colocadas sobre o sítio da lesão.

Após as operações, os animais em cada grupo foram subdivididos para investigação axonal e análise comportamental. Permitiu-se que animais para rastreio axonal (n = 5 para cada grupo) e análise comportamental (n = 7 para cada grupo) sobrevivessem durante 1 mês.

Utilizou-se Fluoro-Gold (FG, 6% p/v, Fluorocromo) para marcar os neurónios RST que tinham regenerado os seus axónios através da cicatriz da lesão e se tinham reintroduzido na medula espinhal caudal. Dois dias antes do fim do período de sobrevivência pós-lesão (1 mês), os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg). Uma laminectomia dorsal foi realizada e o segmento espinhal T2 foi identificado. FG num volume de 0,5 ml foi manualmente injectado na medula espinhal T2 direita usando uma seringa Hamilton. Dois dias depois, os animais foram anestesiados e sacrificados com uma dose letal de quetamina (150 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) e foram perfundidos intracardinalmente com solução salina normal, seguidos através de 400 ml de fixador contendo paraformaldeído 4% em PBS 0,1 x. Os cérebros e as medulas espinhais foram removidos, pós-fixados com paraformaldeído durante a noite, e depois colocados em sacarose tamponada através de fosfato 30%. O tecido cerebral e da medula espinhal foram cortados em secções de 30 µm num criostato e montados em lâminas recobertas com gelatina. O número de neurónios RST marcados com FG no lado da lesão foi expresso como uma percentagem do número total de neurónios marcados com FG no lado intacto contralateral. Esta percentagem entre grupos foi comparada estatisticamente usando ANOVA unidireccional seguido através dum teste de comparações múltiplas Tukey-Kramer. Como mostrado na Tabela 3, Sp35-Fc em 2 µg/ml

promoveu a sobrevivência de neurónios do trato rubro-espinhal (RST).

Tabela 3

Tratamento	Percentagem de sobrevivência de Neurónios RST (\pm S.E.M.)
PBS	17,1 \pm 2
Sp35-Fc	31,9 \pm 1,5
Controlo-Fc	14,5 \pm 2,1

Para a análise comportamental, o uso de membros anteriores durante a exploração vertical espontânea foi examinado 1 mês após tratamentos diferentes como descrito (Liu et al., 1999) com modificações menores. Os ratos foram colocados num cilindro de Plexiglas transparente (15 cm de diâmetro e 30 cm de altura) que estimula o uso dos membros anteriores para exploração vertical durante 5 minutos. Os seguintes comportamentos foram classificados: (1) o uso independentedo membro anterior esquerdo (não debilitado) ou direito (debilitado) para contacto da parede do cilindro; e (2) uso simultâneo de ambos os membros anteriores para contacto da parede do cilindro. O comportamento de exploração vertical foi expresso quanto a (1) percentagem de uso do membro anterior esquerdo (não debilitado) em relação ao número total de uso do membro anterior debilitado, não debilitado e ambos; (2) percentagem de uso do membro anterior direito (debilitado) em relação ao número total de uso do membro anterior debilitado, não debilitado e ambos; e (3)percentagem de uso de ambos os membros anteriores em relação ao número total de uso do membro anterior debilitado, não debilitado e ambos. As

diferenças entre grupos foram testadas através de ANOVA unidireccional seguido pela análise post-hoc de Bonferroni. Os animais tratados com Sp35-Fc mostraram movimento do membro dianteiro significativamente melhorado: uso de 30% para ambos os membros anteriores em animais tratados com Sp35-1- Fc versus uso de 10% para ambos os membros anteriores em animais controlo Fc ou tratados com PBS; uso de 55% de membro esquerdo (não debilitado) versus uso de 80% em animais controlo Fc ou tratados com PBS; e uso de 29% do membro direito (debilitado) versus aproximadamente 15% em animais controlo Fc ou tratados com PBS.

Exemplo 19: Sp35-Fc Promove Sobrevivência da Célula de Gânglio Retiniana (RGC) no Modelo de Transecção do Nervó óptico

Confirmámos ainda a actividade de Sp35 usando o modelo de transecção do nervo óptico, que investiga factores que afectam a função neuronal. Ratos fêmeas Sprague Dawley adultos jovens (SD) foram usados neste estudo. O nervo óptico direito de cada animal foi transecionado intraorbitalmente a 1,5 mm do disco óptico. Uma peça de espuma em gel embebida com Fluoro-Gold 6% (FG) foi aplicada ao sítio recentemente transecionado directamente atrás do disco óptico para marcar as células de gânglio retinianas sobreviventes (RGCs). Os animais foram divididos em 6 grupos (n=6 em cada grupo) recebendo Sp35-Fc, IgG1 humana, ou somente PBS, através de injeccção intravitreal. O volume de cada injeccção intravitreal foi de 4 ml enquanto a dosagem de cada injeccção foi de 2 mg. As injeções intravitreais foram realizadas imediatamente após a transecção do nervo óptico.

Permitiu-se que todos os animais sobrevivessem durante 1 semana. Dois dias antes de sacrificar os animais, o nervo

óptico esquerdo de cada animal foi transeccionado e utilizou-se FG a 6% para marcar as RGCs sobreviventes para servir como controlo interno. Os animais foram sacrificados com uma dose excessiva de Nembutal e as retinas dissecadas em paraformaldeído a 4%. Quatro cortes radiais foram feitos para dividir as retinas em quatro quadrantes (superior, inferior, nasal e temporal). As retinas depois foram pós-fixadas no mesmo fixador durante 1 hora antes de serem montadas no plano com meio de montagem (Dako). As lâminas foram examinadas sob um microscópio de fluorescência usando um filtro ultravioleta (comprimento de onda de excitação = 330 a 380 nm). As RGCs marcadas foram contadas ao longo da linha mediana de cada quadrante começando a partir do disco óptico para a borda periférica da retina em intervalos de 500 μ m, sob uma grade ocular de 200 X 200 μ m. A percentagem de sobrevivência de RGCs resultante a partir de cada tratamento foi expressa através de comparação do número de RGCs sobreviventes nos olhos danificados com os seus olhos contralaterais. Todos os dados foram expressos como média \pm SEM. A significância estatística foi avaliada através de ANOVA unidireccional, seguida através de um teste post-hoc Tukey-Kramer. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os animais tratados com Sp35-Fc mostraram sobrevivência neuronal significativa (83%) quando comparados com animais tratados com controlo Fc ou PBS, os quais somente mostraram sobrevivência neuronal de aproximadamente 50%.

Outras Modalidades

Formas de realização preferidas da presente invenção estão descritas a seguir e são referidos como formas de realização E1 a E57.

E1. Um ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido, em que: (a) o polipéptido compreende (i) um domínio LRR de Sp35, (ii) uma região de base Sp35 C-terminal ao domínio LRR, e (iii) um Sp 35 imunoglobulina (Ig) do domínio C-terminal com a região de base; e (b) o polipéptido não tem um domínio transmembranar.

E2. Um ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido, em que o polipéptido compreende um domínio de Ig de Sp35 e carece de um domínio LRR de Sp35, uma região básica de Sp35, um domínio transmembranar, e um domínio citoplasmático.

E3. Um ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido, em que o polipéptido compreende um domínio de LRR de Sp35 e carece de um domínio de Ig de Sp35, uma região básica de Sp35, um domínio transmembranar, e um domínio citoplasmático.

E4. O ácido nucleico de E1, em que o polipéptido de Sp35 falta um domínio citoplasmático.

E5. O ácido nucleico de E1, em que o polipéptido compreende os resíduos de aminoácidos 34-532 da SEQ ED NO: 2.

E6. O ácido nucleico de qualquer uma de E1-3, em que o polipéptido é um polipéptido de fusão que compreende uma porção não-Sp35.

E7. O ácido nucleico de E6, em que a porção não-Sp35 é seleccionado a partir do grupo consistindo de uma unidade de Ig, uma fracção de albumina de soro, uma porção de direccionamento, uma fracção relatora, e uma fracção de facilitar a purificação.

E8. O ácido nucleico de E7, em que o radical não-Sp35 é uma unidade de Ig.

E9. O ácido nucleico de E8, em que a unidade de Ig é uma parte de Fc.

E10. O ácido nucleico de qualquer uma de E1-3, em que a sequência de nucleótidos está operacionalmente ligada a uma sequência de controlo da expressão.

E11. Um vector compreendendo o ácido nucleico de E10.

E12. Uma célula hospedeira compreendendo o vector de E11.

E13. Um polipéptido isolado, caracterizado por: (a) o polipéptido compreende (i) um domínio LRR de Sp35, (ii) uma região de base C-Sp35 tennbal ao domínio LRR, e (iii) uma imunoglobulina (Ig) do domínio C-terminal para a região de base; e (b) o polipéptido não tem um domínio transmembranar.

E14. Um poliptido isolado, em que o polipéptido compreende um domínio de Ig de Sp35 e carece de um domínio LRR, uma região básica de Sp35, um domínio transmembranar, e um domínio citoplasmático.

E15. Um polipeptídeo isolado, em que o polipéptido compreende um domínio de LRR de Sp35 e carece de um domínio de Ig de Sp35, uma região básica de Sp35, um domínio transmembranar, e um domínio citoplasmático.

E16. O polipéptido de E13, em que uma das repetições ricas em leucina é uma repetição rica leucina carboxi-terminal (LRRCT).

E17. O polipéptido de E13, em que uma das repetições ricas em leucina é um repetições ricas em leucina amino-terminal (LRRNT).

E18. O polipéptido de E13, em que o polipéptido de Sp35 carece de um domínio citoplasmático.

E19. O polipéptido de E13, em que o polipéptido compreende os resíduos de aminoácidos 34-532 de SEQ ID NO: 2.

E20. O polipéptido de E13, 14 ou 15, em que o polipéptido é um polipéptido de fusão que compreende uma porção não-Sp35.

E21. O polipéptido de E20, em que a porção não-Sp35, é seleccionado a partir do grupo consistindo de uma unidade de Ig, uma fracção de albumina de soro, uma porção de direccionamento, uma fracção relatora, e uma fracção de facilitar a purificação.

E22. O polipéptido de E21, em que a porção não-Sp35 é uma unidade de Ig.

E23. O polipéptido de E22, em que a unidade de Ig é uma unidade Fc.

E24. O polipéptido de E13, 14 ou 15, em que o polipéptido é conjugado com um polímero.

E25. O polipéptido de E24, em que o polímero é seleccionado de entre o grupo que consiste de um glicol de polialquileno, um polímero de açúcar, e um polipéptido.

E26. O polipéptido de E25, em que o polímero é um polialquileno-glicol.

E27. O polipéptido de E26, em que o polialquileno glicol é polietileno glicol (PEG).

E28. O polipéptido de E 24, em que o polipéptido é conjugado com um 1, 2, 3 ou 4 polímeros.

E29. O polipéptido de E28, em que o peso molecular total dos polímeros é de 20.000 Da a 40.000 Da.

E30. Um método de inibição da transdução de sinal por NgR1, compreendendo o contacto da NgR1 com uma quantidade eficaz de um polipéptido de Sp35.

E31. Um método para diminuir a inibição do crescimento axonal de um sistema nervoso central (SNC) de neurónios, compreendendo o contacto do neurónio, com uma quantidade eficaz de um polipéptido seleccionado a partir do grupo que consiste em um polipéptido de Sp35, um anticorpo anti-Sp35, ou um antigénio de ligação fragmento de um anticorpo anti-Sp35.

E32. Um método de inibir o colapso do cone de crescimento de um neurónio SNC, compreendendo o contacto do neurónio com uma quantidade electiva de um polipéptido seleccionado a partir do grupo que consiste em um polipéptido de Sp35, um anticorpo anti-Sp35, ou um fragmento de ligação ao antigénio de um anticorpo anti-Sp35 anticorpo.

E33. Um método de tratamento de uma doença do SNC, lesão ou distúrbio num mamífero, compreendendo a administração ao mamífero de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um polipéptido seleccionado a partir do grupo que consiste em um polipéptido de Sp35, um anticorpo anti-Sp35, ou um fragmento de ligação ao antigénio de um anticorpo anti-Sp35.

E34. O método de qualquer uma das E30-33, em que o polipéptido de Sp35 é seleccionado do grupo constituído por um polipéptido, em que: (a) o polipéptido compreende (i) um domínio de LRR compreendendo 12-14 Sap35 repetições ricas em leucina, (ii) uma região de base Sap35 C-terminal ao domínio LRR, e (iii) uma imunoglobulina (Ig) domínio C-terminal com a região de base; e (b) o polipéptido não tem um domínio transmembranar; e

um polipéptido, em que o polipéptido compreende um domínio de Ig de Sp35 e carece de um domínio LRR, uma região básica, um domínio transmembranar, e um domínio citoplasmático.

E35. O método de E33, em que o SNC doença, distúrbio ou lesão é uma lesão da espinal medula ou de uma lesão do nervo óptico.

E36. O método de E33, em que o polipéptido é administrado localmente.

E37. O método de E33, em que o polipéptido é inicialmente administrado dentro de 48 horas após a lesão da medula espinal.

E38. O método de E36, em que a quantidade terapêuticamente eficaz do polipéptido é de 10 ug a 10 mg.

E39. Um método de tratamento de uma doença do SNC, lesão ou distúrbio num mamífero, compreendendo: (a) proporcionar uma célula hospedeira cultivada expressando um polipeptídeo Sp35 recombinante; e (b) introduzir na célula hospedeira em que o mamífero no ou próximo do local do SNC doença, distúrbio ou lesão.

E40. O método de E39, em que a doença, distúrbio ou lesão é uma lesão da medula espinal.

E41. O método de E39, em que a célula hospedeira cultivada é derivada do mamífero a ser tratado.

E42. O método de E39, em que o polipéptido recombinante é um SP35-SP35 polipéptido de comprimento total.

E43. Um método de promoção da mielinização no local do SNC doença, distúrbio ou lesão, compreendendo o contacto do local do SNC doença, distúrbio ou lesão, com uma quantidade eficaz de um polipéptido de Sp35.

E44. O método de E43, em que o polipéptido compreende um domínio de Sp35 LRR de Sp35 e carece de um domínio de Ig de Sp35, uma região básica de Sp35, um domínio transmembranar, e um domínio citoplasmático.

E45. Um método de tratamento de uma doença do SNC, lesão ou distúrbio por terapia génica in vivo, compreendendo a administração a um mamífero, em ou perto do local da doença, distúrbio ou lesão, um vector viral compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de modo que Sp35 o polipéptido é expresso a partir de Sp35 a sequência de nucleótidos no mamífero numa quantidade suficiente para reduzir a inibição da extensão axonal de neurónios no ou perto do local da lesão.

E46. O método de E36, em que o vector virai é seleccionado a partir do grupo consistindo de um vector adenoviral, um vector lentiviral, um vector baculoviral, um vector viral de Epstein Barr, um vector papovaviral, um vector viral de vaccinia, e um vector viral de herpes simplex.

E47. O método de E45, em que a doença, distúrbio ou lesão é seleccionado a partir do grupo consistindo de lesão da medula espinal e lesão do nervo óptico.

E48. O método de E45, em que o vector viral é administrado por uma via seleccionada a partir do grupo consistindo de administração tópica, a administração intra-ocular, administração parentérica, administração intratecal, administração subdural e subcutânea.

E49. Um ácido nucleico que codifica um polipéptido que compreende um domínio de LRR de Sp35, região básica, domínio de Ig, sequência de ligação, e o domínio transmembranar; e faltando um domínio citoplasmático funcional.

E50. O ácido nucleico de E49, em que o ácido nucleico codifica um polipéptido que consiste essencialmente de aminoácidos 1-576 de SEQ ID NO: 2.

E51. Um método de promoção da sobrevivência de um neurónio em risco de morrer, compreendendo o contacto do neurónio, com uma quantidade eficaz de um polipéptido de Sp35.

E52. O método de E51, em que o neurónio é, in vitro.

E53. O método de E51, em que o neurónio é em um mamífero com uma doença neurodegenerativa, doença ou lesão.

E54. O método de E53, em que a doença neurodegenerativa, distúrbio ou lesão é seleccionado a partir do grupo que consiste em esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, doença de Huntington, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, neuropatia diabética, acidente

vascular cerebral, lesão cerebral traumática e lesão da medula espinal.

E55. Um método de promoção da sobrevivência de um neurónio em risco de morte de morrer em um mamífero com uma doença neurodegenerativa, distúrbio ou lesão, que compreende (a) proporcionar uma célula hospedeira cultivada expressando um polipeptídeo Sp35 recombinante; e (b) introduzir na célula hospedeira em que o mamífero no local do neurónio.

E56. Um gene método in vivo de terapia de promoção da sobrevivência de um neurónio em risco de morrer, compreendendo a administração a um mamífero, em ou próximo do sítio do neurónio, de um vector viral compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de Sp35 para que o polipéptido é Sp35 expressa a partir da sequência de nucleótidos no mamífero numa quantidade suficiente para promover a sobrevivência do neurónio.

E57. O método de E51, em que o polipéptido Sip35 é solúvel.

Lista de Sequências

<110> BIOGEN IDEC MA INC.

<120> PROTEÍNA DE LIGAÇÃO DO RECEPTOR NOGO

<130> P27914EP-PCT

<140> EP04757823.2

<141> 2004-03-17

<150> 60/455,756

<151> 2003-03-19

<150> 60/480,241

<151> 2003-06-20

<150> 60/492,057

<151> 2003-08-01

<160> 41

<170> PatentIn Ver. 3.2

<210> 1

<211> 2897

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220> base_modificada

<221> (2376)

<223> n = a, t, c or g

<220> base_modificada

<221> (2381)

<223> n = a, t, c or g

<220> base_modificada

<221> (2859)

<223> n = a, t, c or g

<220> base_modificada

<221> (2861)

<223> n = a, t, c or g

<220> base_modificada

<221> (2871)

<223> n = a, t, c or g

<220> base_modificada

<221> (2877)

<223> n = a, t, c or g

<220> base_modificada

<221> (2880)

<223> n = a, t, c or g

<400> 1

ggagagacat	gcgattggtg	accgagccga	gctggaccga	ggcgcgccc	agatgcaggt	60
gagcaagagg	atgctggcgg	ggggcgtgag	gagcatgccc	agccccctcc	tggcctgctg	120
gcagcccatc	ctcctgctgg	tgctgggctc	agtgctgtca	ggctcggcca	cgggctgccc	180
gccccgctgc	gagtgtctcc	cccaggaccg	cgctgtgctg	tgccaccgca	agcgctttgt	240
ggcagtcccc	gagggcatcc	ccaccgagac	gctcctgctg	gacctaggca	agaaccgcat	300
caaaacgctc	aaccaggacg	agttcgccag	cttcccgcac	ctggaggagc	tggagctcaa	360
cgagaacatc	gtgagcgcgg	tgagcccggg	cgcttcaaac	aacctcttca	acctccggac	420

```

gctgggtctc cgcagcaacc gcctgaagct catcccgcta ggcgtettca ctggcctcag 480
caacctgacc aagctggaca tcagcgagaa caagattggt atcctactgg actacatggt 540
tcaggacctg tacaacctca agtcaactgga ggttggcgac aatgacctcg tctacatctc 600
tcaccgcgcc ttcagcggcc tcaacagcct ggagcagctg acgctggaga aatgcaacct 660
gacctccatc cccaccgagg cgctgtccca cctgcacggc ctcatcgtcc tgaggctccg 720
gcacctcaac atcaatgcca tccgggacta ctcttcaag aggctctacc gactcaaggt 780
cttggagatc tcccactggc cctacttggg caccatgaca cccaactgcc tctacggcct 840
caaccctgag tccctgtcca tcacacactg caatctgacc gctgtgccct acctggccgt 900
ccggcaccta gtctatctcc gcttctcaa cctctcctac aaccccatca gcaccattga 960
gggctccatg ttgcatgagc tgctccgget gcaggagatc cagctgggtg gcgggcagct 1020
ggccgtggtg gagccctatg ccttccgagg ctcaactac ctgctgctgc tcaatgtctc 1080
tggcaaccag ctgaccacac tggaggaatc agtcttccac tcggtgggca acctggagac 1140
actcatcctg gactccaacc cgctggcctg cgactgtcgg ctctgttggg tcttccggcg 1200
ccgctggcgg ctcaacttca accggcagca gccacgtgc gccacgcccg agttttgtca 1260
gggcaaggag ttcaaggact tccctgatgt gctactgccc aactacttca cctgctgccc 1320
cgcccacatc cgggacggca aggccagca ggtgtttgtg gacgaggggc acacggtgca 1380
gtttgtgtgc cgggctgatg gcgaccggcc gcccgccatc ctctggctct caccctgaaa 1440
gcacctggtc tcagccaaga gcaatggggc gctcacagtc tccctgatg gcacgctgga 1500
gggtgcgtac gcccaggtag aggacaacgg cacgtacctg tgcatcgcg ccaacgcggg 1560
cggcaacgac tccatgcccg cccacttcca tctctgcccg tactcggcg actggcccca 1620
tcagcccaac aagaccttcg ctctcatctc caaccagccg ggcgaggggg aggccaacag 1680
caccgcgctc actgtgcctt tccccttcca catcaagacc ctcatcatcg ccaccacct 1740
gggttccatc tctttcctgg gcgtcgtcct ctctgtcctg gtgctgctgt tctctggag 1800
ccggggcaag ggcaacacaa agcacaacat cgagatcgag tatgtgcccc gaaagtccga 1860
cgcaggcatc agctccggcg acgcgccccg caagttcaac atgaagatga tatgaggctg 1920
ggccgggggg cagggacccc cgggcggccg ggaggggaa ggggcctggc cgccacctgc 1980
tcacttcca gtccttcca cctctcctt acccttctac acacgttctc tttctcctc 2040
ccgctcctg cccctgctgc ccccggccag cctcaccac ctgcccctct tctaccagga 2100
cctcagaagc ccagacctgg ggaccccacc tacacagggg cattgacaga ctggagtga 2160
aagccgacga accgacacgc ggcagagtca ataattcaat aaaaaagtta cgaactttct 2220
ctgtaacttg ggtttcaata attatggatt ttatgaaaaa cttgaaataa taaaaagaga 2280
aaaaaactat ttctatagc tagtcggaat gcaaaactttt gacgtcctga ttgctccagg 2340
ccctctctc aactcagttt cttgtttttc tctctctctc nctcctcttc tctcctctt 2400
ctctctctc cccccagtgg ggagggatca ctcaggaaaa caggaaagga ggttccagcc 2460
ccaccacctc gcccacccc cccaggcac catcaggagc aggttagggg gcaggcctgg 2520
ggcagctcc gggctggctt ttgcagggc gcaggtggag gggacaggtc tgccgatggg 2580
ggtgggagcc tgtctgctgg gctgcccagg ggcaccactg caaggggtgg gagcctgct 2640
cgggtgtggc tgagactctg gacagaggct ggggtcctc tgggggacag cacagctagt 2700
ggagagagcc aggggctgga ggtggggccc accccagcct ctggtcccag ctctgctgt 2760
cacttctgt gtggccctca agcaggtcca ctggcctctc tggcctcag tctccacatc 2820
tgtacaaatg ggaacattac cccctgccct gcctacctna nagggtgtt ntgaggnatn 2880
gatgatga tgtatgt 2897

```

```

<210> 2
<211> 614
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 2
Met Leu Ala Gly Gly Val Arg Ser Met Pro Ser Pro Leu Leu Ala Cys
 1          5          10
Trp Gln Pro Ile Leu Leu Val Leu Gly Ser Val Leu Ser Gly Ser
          20          25          30
Ala Thr Gly Cys Pro Pro Arg Cys Glu Cys Ser Ala Gln Asp Arg Ala
          35          40          45
Val Leu Cys His Arg Lys Arg Phe Val Ala Val Pro Glu Gly Ile Pro
          50          55          60
Thr Glu Thr Arg Leu Leu Asp Leu Gly Lys Asn Arg Ile Lys Thr Leu
          65          70          75          80
Asn Gln Asp Glu Phe Ala Ser Phe Pro His Leu Glu Glu Leu Glu Leu
          85          90          95
Asn Glu Asn Ile Val Ser Ala Val Glu Pro Gly Ala Phe Asn Asn Leu
          100          105          110
Phe Asn Leu Arg Thr Leu Gly Leu Arg Ser Asn Arg Leu Lys Leu Ile
          115          120          125

```

2

Pro Leu Gly Val Phe Thr Gly Leu Ser Asn Leu Thr Lys Leu Asp Ile
 130 135 140
 Ser Glu Asn Lys Ile Val Ile Leu Leu Asp Tyr Met Phe Gln Asp Leu
 145 150 155 160
 Tyr Asn Leu Lys Ser Leu Glu Val Gly Asp Asn Asp Leu Val Tyr Ile
 165 170 175
 Ser His Arg Ala Phe Ser Gly Leu Asn Ser Leu Glu Gln Leu Thr Leu
 180 185 190
 Glu Lys Cys Asn Leu Thr Ser Ile Pro Thr Glu Ala Leu Ser His Leu
 195 200 205
 His Gly Leu Ile Val Leu Arg Leu Arg His Leu Asn Ile Asn Ala Ile
 210 215 220
 Arg Asp Tyr Ser Phe Lys Arg Leu Tyr Arg Leu Lys Val Leu Glu Ile
 225 230 235 240
 Ser His Trp Pro Tyr Leu Asp Thr Met Thr Pro Asn Cys Leu Tyr Gly
 245 250 255
 Leu Asn Leu Thr Ser Leu Ser Ile Thr His Cys Asn Leu Thr Ala Val
 260 265 270
 Pro Tyr Leu Ala Val Arg His Leu Val Tyr Leu Arg Phe Leu Asn Leu
 275 280 285
 Ser Tyr Asn Pro Ile Ser Thr Ile Glu Gly Ser Met Leu His Glu Leu
 290 295 300
 Leu Arg Leu Gln Glu Ile Gln Leu Val Gly Gly Gln Leu Ala Val Val
 305 310 315 320
 Glu Pro Tyr Ala Phe Arg Gly Leu Asn Tyr Leu Arg Val Leu Asn Val
 325 330 335
 Ser Gly Asn Gln Leu Thr Thr Leu Glu Glu Ser Val Phe His Ser Val
 340 345 350
 Gly Asn Leu Glu Thr Leu Ile Leu Asp Ser Asn Pro Leu Ala Cys Asp
 355 360 365
 Cys Arg Leu Leu Trp Val Phe Arg Arg Arg Trp Arg Leu Asn Phe Asn
 370 375 380
 Arg Gln Gln Pro Thr Cys Ala Thr Pro Glu Phe Val Gln Gly Lys Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Asp Phe Pro Asp Val Leu Leu Pro Asn Tyr Phe Thr Cys Arg
 405 410 415
 Arg Ala Arg Ile Arg Asp Arg Lys Ala Gln Gln Val Phe Val Asp Glu
 420 425 430
 Gly His Thr Val Gln Phe Val Cys Arg Ala Asp Gly Asp Pro Pro Pro
 435 440 445
 Ala Ile Leu Trp Leu Ser Pro Arg Lys His Leu Val Ser Ala Lys Ser
 450 455 460
 Asn Gly Arg Leu Thr Val Phe Pro Asp Gly Thr Leu Glu Val Arg Tyr
 465 470 475 480
 Ala Gln Val Gln Asp Asn Gly Thr Tyr Leu Cys Ile Ala Ala Asn Ala
 485 490 495
 Gly Gly Asn Asp Ser Met Pro Ala His Leu His Val Arg Ser Tyr Ser
 500 505 510

Pro Asp Trp Pro His Gln Pro Asn Lys Thr Phe Ala Phe Ile Ser Asn
 515 520 525
 Gln Pro Gly Glu Gly Glu Ala Asn Ser Thr Arg Ala Thr Val Pro Phe
 530 535 540
 Pro Phe Asp Ile Lys Thr Leu Ile Ile Ala Thr Thr Met Gly Phe Ile
 545 550 555 560
 Ser Phe Leu Gly Val Val Leu Phe Cys Leu Val Leu Leu Phe Leu Trp
 565 570 575
 Ser Arg Gly Lys Gly Asn Thr Lys His Asn Ile Glu Ile Glu Tyr Val
 580 585 590
 Pro Arg Lys Ser Asp Ala Gly Ile Ser Ser Ala Asp Ala Pro Arg Lys
 595 600 605
 Phe Asn Met Lys Met Ile
 610

<210> 3
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador

<400> 3
 tcgagaaaaa agatcgcat cctgctagac tctcttgaag tctagcagga tgacgatca 59

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Arg Arg Ala Arg Ile Arg Asp Arg Lys
 1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Lys Lys Val Lys Val Lys Glu Lys Arg
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Arg Arg Leu Arg Leu Arg Asp Arg Lys
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
Arg Arg Gly Arg Gly Arg Asp Arg Lys
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Arg Arg Ile Arg Ala Arg Asp Arg Lys
1 5

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Met Gln Val Ser Lys Arg
1 5

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Leu Ser Pro Arg Lys His
1 5

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Ile Thr Pro Lys Arg Arg
1 5

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Ala Cys Pro His His Lys
1 5

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Val Ser Pro Arg Lys His
1 5

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador
5

<400> 14
 aaggcccagc aggtgtttgt gga 23

<210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador 1F

<400> 15
 tactcgatct cgatgttgtg cttt 24

<210> 16
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador

<400> 16
 cagcaggtcg acgcgccgc atgctggcgg ggggcgt 37

<210> 17
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 cagcaggtcg acctcgcccg gctggttg 29

<210> 18
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador

<400> 18
 aattaagaat tcacgggctg cccgccccgc tgcgagt 37

<210> 19
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador

<400> 19
 tatatttcta gatcactcg cccgctggtt ggagatgaaa gcga 44

<210> 20
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador

<400> 20
 cttgacacgg gatccgcggc cgcagtctgg cggggggcgt gagg 44

<210> 21
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial :

 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador

 <400> 21
 gcagcggggc gggcagcccg tggccgagcc tgacagcact gagcc 45

 <210> 22
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador :

 <400> 22
 cttgacacgg gatccgcggc cgcattgctgg cggggggcgt gagg 44

 <210> 23
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador

 <400> 23
 gtcccggatg cgggcgcggg ccgagcctga cagcactgag cccag 45

 <210> 24
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador

 <400> 24
 atattctaga atgctggcgg ggggcgtgag 30

 <210> 25
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador

 <400> 25
 atatactagt gtcgttgccg cccgcgttgg 30

 <210> 26
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador

 <400> 26
 cccagcaggt gtttggtggac gagtgatcta gggccgcgga tccttg 46

<210> 27
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador
 <400> 27
 cagggatccg cggccctaga tcactcgtcc acaaacacct gctggg 46

<210> 28
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador
 <400> 28
 cgccgcgcac ccgggtgaat tccgcgccg catccgggac cgc 43

<210> 29
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador
 <400> 29
 gcgggtcccgg atgcgggccc ggaattcacc cgggtgcgcg gcg 43

<210> 30
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador
 <400> 30
 cgccgcgcac ccgggtgaat tcgcccagca ggtgtttgtg gac 43

<210> 31
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador
 <400> 31
 gtccacaaac acctgctggg cgaattcacc cgggtgcgcg gcg 43

<210> 32
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador
 <400> 32
 catcctctgg ctctacccg aaaaggtact ggtctcagcc aagagc 46

<210> 33
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador
 <400> 33
 gctcttggt gagaccagta ccttttcggg tgagagccag aggatg 46

<210> 34
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 34
 Ser Pro Arg Lys His
 1 5

<210> 35
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador
 <400> 35
 aattaagcgg ccgcatgctg gcggggggcg t 31

<210> 36
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador
 <400> 36
 aattaagcgg ccgctttgtc atgt 24

<210> 37
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador
 <400> 37
 gattactcga gatgctggcg gggggcgtga gg 32

<210> 38
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador
 <400> 38
 cgcgggaatt ctcatatcat cttcatgttg aacttg 36

<210> 39
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador

 <400> 39
 gccttccgcg gcctcaacta cctgcgcgtg ctc 33

 <210> 40
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador

 <400> 40
 ccggaattct caagcgtaat caggaacgtc gtaagggat atcatcttca tgmtgaactt 60
 gcggggcgcg tcggc 75

 <210> 41
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Iniciador

 <400> 41
 tgatcgtcat cctgctagac ttcaagagag tctagcagga tgacgatctt ttttc 55

Lisboa, 5 de agosto de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um fragmento de ligação a antígeno ou anticorpo do mesmo que se liga ao polipéptido da SEQ ID N°:2 para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou desordem neurodegenerativa em que a extensão axonal seria benéfica num mamífero, em que o anticorpo ou fragmento é capaz de diminuir a inibição do crescimento axonal de um neurónio do sistema nervoso central (CNS).

2. Uso de um fragmento de ligação a antígeno ou anticorpo do mesmo que se liga ao polipéptido da SEQ ID NO: 2, para uso no tratamento de uma doença ou desordem neurodegenerativa em que a extensão axonal seria benéfica num mamífero, em que o anticorpo ou fragmento é capaz de reduzir a inibição do crescimento axonal de um neurónio do sistema nervoso central (CNS).

3. A utilização da reivindicação 1 ou o anticorpo para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que a doença ou distúrbio neurodegenerativo é a esclerose múltipla.

4. A utilização da reivindicação 1 ou o anticorpo para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que a doença ou distúrbio neurodegenerativo é ALS.

5. A utilização da reivindicação 1 ou o anticorpo para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que a doença ou distúrbio neurodegenerativo é a doença de Huntington.

6. A utilização da reivindicação 1 ou o anticorpo para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que a doença ou distúrbio neurodegenerativo é a doença de Alzheimer.

7. A utilização da reivindicação 1 ou o anticorpo para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que doença ou distúrbio neurodegenerativo é a doença de Parkinson.

8. A utilização da reivindicação 1 ou o anticorpo para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que doença ou desordem neurodegenerativa é neuropatia diabética.

9. A utilização da reivindicação 1 ou o anticorpo para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que doença ou distúrbio neurodegenerativo é o acidente vascular cerebral.

10. A utilização da reivindicação 1 ou o anticorpo para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que doença ou desordem neurodegenerativa é uma lesão cerebral traumática.

11. A utilização da reivindicação 1 ou o anticorpo para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que doença neurodegenerativa ou desordem é uma lesão da medula espinal.

Lisboa, 5 de agosto de 2015

RESUMO

PROTEÍNA DE LIGAÇÃO DO RECEPTOR NOGO

A invenção fornece polipeptídeos Sp35 e suas proteínas de fusão. Os anticorpos Sp354 e seus fragmentos de ligação do antígeno e ácidos nucleicos que os codificam. A invenção fornece, ainda, composições compreendendo, e métodos para fazer e utilizar, tais anticorpos Sp35, e seus fragmentos de ligação do antígeno, polipeptídeos Sp35 e suas proteínas de fusão.

[

FIG. 1

GGAGAGACATGCGATTGGTGACCGAGCCGAGCGGACCGAAGGCGCGCCCGA
GATGCAGGTGAGCAAGAGGATGCTGGCGGGGGCGTGAGGAGCATGCCAG
CCCCCTCCTGGCCTGCTGGCAGCCCATCCTCCTGCTGGTGCTGGGCTCAGTGC
TGTCAGGCTCGGCCACGGGCTGCCCGCCCCGCTGCGAGTGCTCCGCCAGGA
CCGCGCTGTGCTGTGCCACCGCAAGCGCTTTGTGGCAGTCCCCGAGGGCATC
CCCACCGAGACGCGCCTGCTGGACCTAGGCAAGAACCGCATCAAAACGCTCA
ACCAGGACGAGTTCGCCAGCTTCCCGCACCTGGAGGAGCTGGAGCTCAACGA
GAACATCGTGAGCGCCGTGGAGCCCCGGCGCCTTCAACAACCTCTCAACCTC
CGGACGCTGGGTCTCCGCAGCAACCGCCTGAAGCTCATCCCGCTAGGCGTCT
TCACTGGCCTCAGCAACCTGACCAAGCTGGACATCAGCGAGAACAAGATTGT
TATCCTACTGGACTACATGTTTCAGGACCTGTACAACCTCAAGTCACTGGAGG
TTGGCGACAATGACCTCGTCTACATCTCTCACCGCGCCTCAGCGGCCTCAAC
AGCCTGGAGCAGCTGACGCTGGAGAAATGCAACCTGACCTCCATCCCCACCG
AGGCGCTGTCCCACCTGCACGGCCTCATCGTCTGAGGCTCCGGCACCTCAA
CATCAATGCCATCCGGGACTACTCCTTCAAGAGGCTTACCGACTCAAGGTCT
TGGAGATCTCCACTGGCCCTACTTGGACACCATGACACCCAAGTGCCTCTAC
GGCCTCAACCTGACGTCCCTGTCCATCACACACTGCAATCTGACCGCTGTGCC
CTACCTGGCCGTCCGCCACCTAGTCTATCTCCGCTTCCCTCAACCTCTCTACA
ACCCCATCAGCACCAATTGAGGGCTCCATGTTGCATGAGCTGCTCCGGTGA
GGAGATCCAGCTGGTGGGCGGGCAGCTGGCCGTGGTGGAGCCCTATGCCCTC
CGCGGCCTCAACTACCTGCGCGTGCTCAATGTCTCTGGCAACCAGCTGACCA
CACTGGAGGAATCAGTCTTCCACTCGGTGGGCAACCTGGAGACTCATCCT
GGACTCCAACCCGCTGGCCTGCGACTGTCCGCTCCTGTGGGTGTTCCGGCGCC
GCTGGCGGCTCAACTTCAACCGGCAGCAGCCACGTGCGCCACGCCCGAGTT
TGTCCAGGGCAAGGAGTTCAAGGACTTCCCTGATGTGCTACTGCCCAACTACT
TCACCTGCCGCGCGCCCGCATCCGGGACCGCAAGGCCAGCAGGTGTTGT
GGACGAGGGCCACACGGTGCAGTTTGTGTGCCGGGCCGATGGCGACCCGCCG
CCCGCATCCTCTGGCTCTCACCCCGAAAGCACCTGGTCTCAGCCAAGAGCA
ATGGGCGGCTCACAGTCTTCCCTGATGGCACGCTGGAGGTGCGCTACGCCCA
GGTACAGGACAACGGCACGTACCTGTGCATCGCGGCCAACCGGGGCGGCAA
CGACTCCATGCCCGCCACCTGCATGTGCGCAGCTACTCGCCGACTGGCCCC
ATCAGCCCAACAAGACCTTCGCTTTCATCTCCAACCAGCCGGGCGAGGGAGA
GGCCAACAGCACCCCGGCCACTGTGCCTTCCCTTCGACATCAAGACCCCTCA
TCATCGCCACCACCATGGGCTTCATCTCTTCCCTGGGCGTCGTCTCTCTGCC
TGGTGCTGCTGTTTCTCTGGAGCCGGGGCAAGGGCAACACAAAGCACAAAT
CGAGATCGAGTATGTGCCCGAAAGTCGGACGCAGGCATCAGCTCCGCCGAC
GCGCCCCGCAAGTTCAACATGAAGATGATATGAGGCCGGGGCGGGGGCAG
GGACCCCGGGCGGCCGGGCAGGGGAAGGGCCTGGCCGCCACCTGCTCACT
CTCCAGTCTTCCCACCTCTCCCTACCTTCTACACAGTTCTCTTCTCCCT
CCCGCCTCGTCCCCTGCTGCCCCCCGCCAGCCCTCACCACTGCCCTCTTC
TACCAGGACCTCAGAAGCCCAGACCTGGGGACCCACCTACACAGGGGCATT
GACAGACTGGAGTTGAAAGCCGACGAACCGACACGCGGCAGAGTCAATAAT
TCAATAAAAAGTACGAACCTTCTCTGTAACCTGGGTTTCAATAATTATGA
TTTTATGAAAACCTGAAATAATAAAAAGAGAAAAAACTATTTCTATAGC

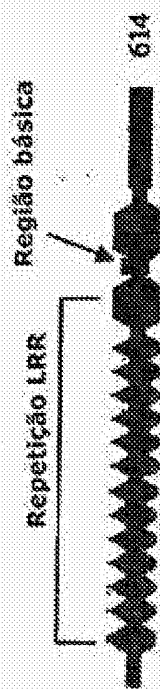
FIG. 1 (continuação)

TAGTCGGAATGCAAACITTTGACGTCCTGATTGCTCCAGGGCCCTCTTCCAAC
TCAGTTTCTTGTTTTTCTTTCNTCCTNCTCCTCTTCTTCTCCTTTCTTCTCT
TCCCCAGTGGGGAGGGATCACTCAGGAAAACAGGAAAGGAGGTTCCAGCC
CCACCCACCTGCCACCCCGCCCCAGGCACCATCAGGAGCAGGCTAGGGGGC
AGGCCTGGGCCCAGCTCCGGGCTGGCTTTTTGCAGGGCGCAGGTGGAGGGGA
CAGGTCTGCCGATGGGGGTGGGAGCCTGTCTGCTGGGCTGCCAGGCGGCACC
ACTGCAAGGGGTGGGAGCCTGGCTCGGGTGTGGCTGAGACTCTGGACAGAGG
CTGGGGTCCTCCTGGGGGACAGCACAGTCAGTGGAGAGAGCCAGGGGCTGG
AGGTGGGGCCCACCCAGCCTCTGGTCCCAGCTCTGCTGCTCACTTGCTGTGT
GGCCCTCAAGCAGGTCCACTGGCCTCTCTGGGCCTCAGTCTCCACATCTGTAC
AAATGGGAACATTACCCCTGCCCTGCCTACCTNANAGGGCTGTINTGAGGN
ATNGATGAGATGATGTATGT

FIG. 2

MLAGGVRSMPSPLLACWQPILLLVLGSVL
SGSATGCPPRCECSAQDRAVLCHRKRFA
VPEGIPTETRLLDLGKNRIKTLNQDEFASF
PHLEEELELNENIVSAVEPGAFFNLFLRTL
GLRSNRLKLIPLGVFTGLSNLTKLDISENKI
VILLDYMFDLYNLKSLEVGDNLDLVYISHR
AFSGLNSLEQLTLEKCNLTSIPTTEALSHLH
GLIVLRLRHLNINAIRDYSFKRLYRLKVLEI
SHWPYLDTMTPNCLYGLNLTSLSTHCHNL
AVPYLAVRHLVYLRFLNLSYNPISTIEGSM
LHELLRLQEIQLVGGQLAVVEPYAFRGLNY
LRVLNVSGNQLTLEESVFHSGNLETLL
DSNPLACDCRLLWVFRWRRLNFRNQPT
CATPEFVQGKEFKDFPDVLLPNYFTCRA
RIRDRKAQQVFVDEGHTVQFVCRADGDP
PAILWLSPRKHLVSAKSNGRRTVFPDGTLE
VRYAQVQDNGTYLCIAANAGGND SMPAHL
HVRSYSPDWP HQPNKTF AFISNQPGEGEA
NSTRATVPFPFDIKTLIIATTMGFISFLGVV
LFCLVLLFLWSRGKGN TKHNIEIEYVPRKS
DAGISSADAPRKFNMKMI

FIG. 3



Deleção Constructo (aminoácidos)	EC 50
(34-532)	6 nm
(34-532) mutado	120 nm
(34-416)	120 nm
(417-532)	60 nm
(425-532)	25 nm

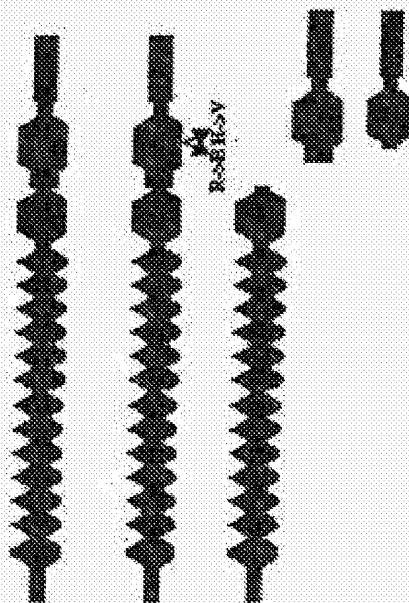


FIG. 4

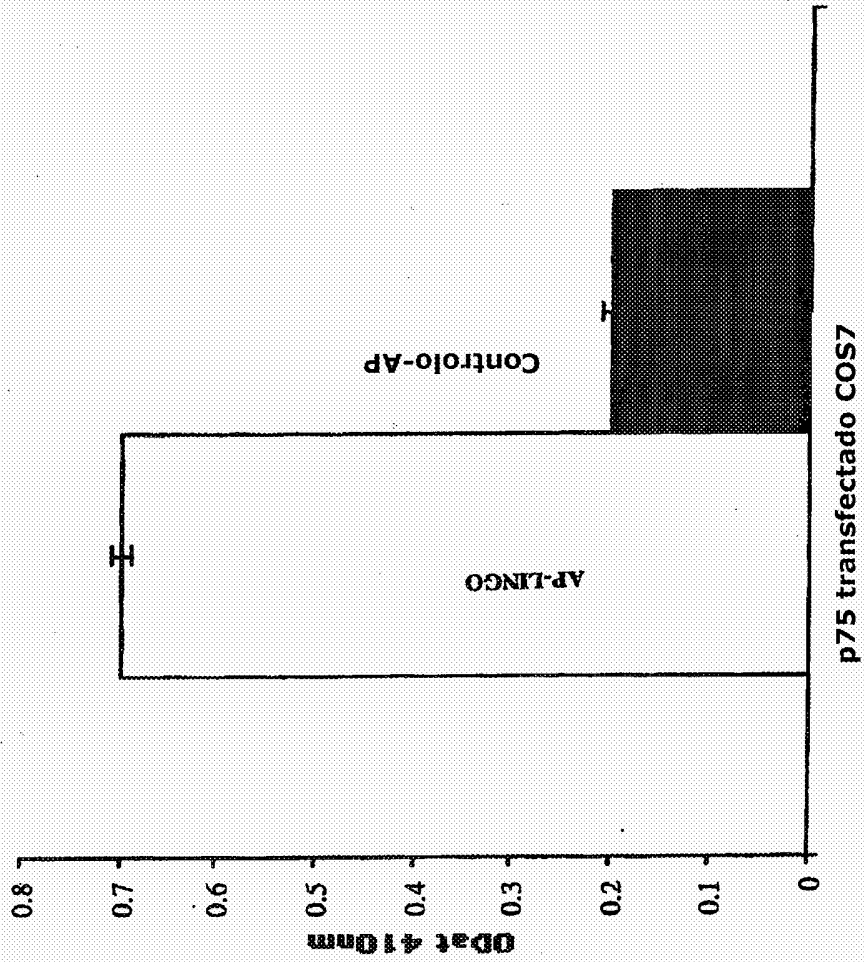


FIG. 5

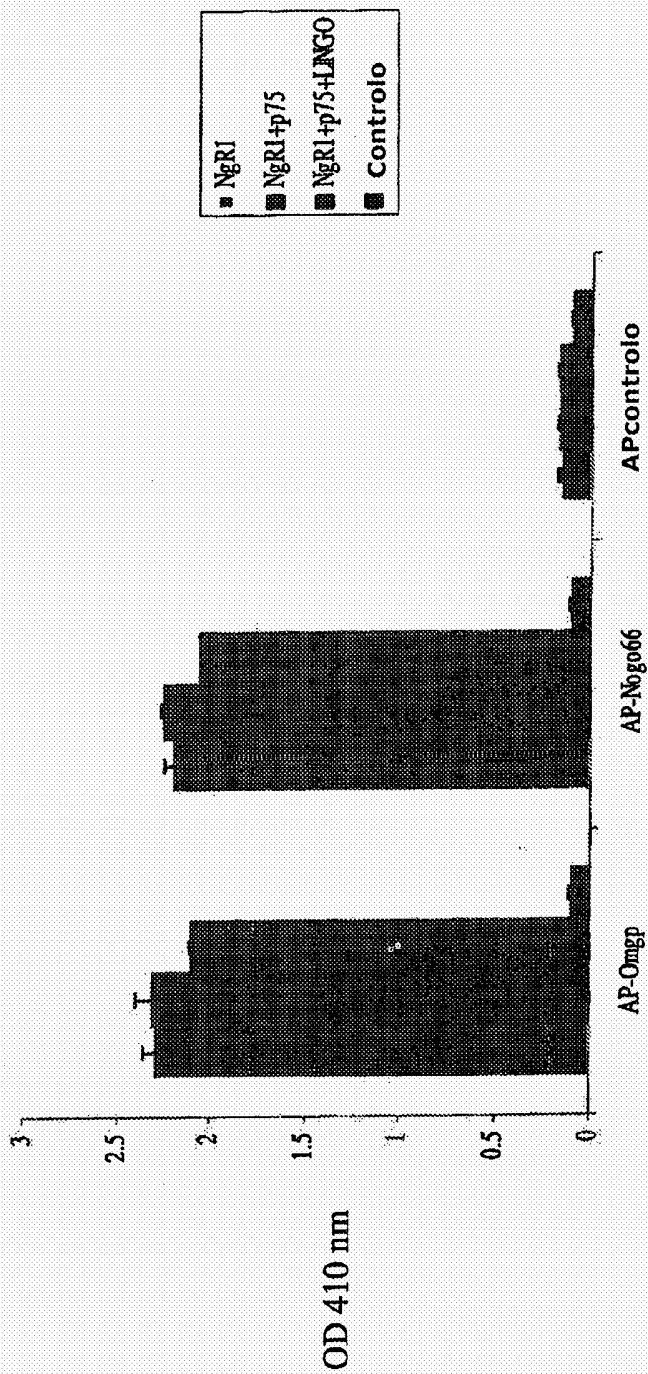


FIG. 6

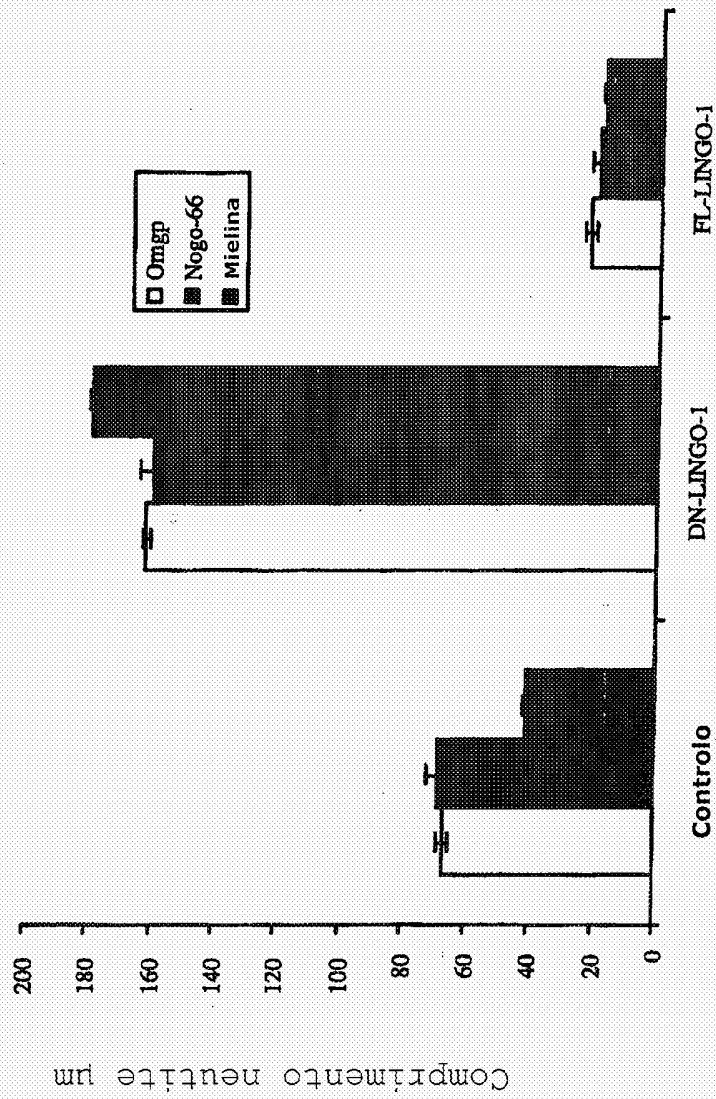


FIG. 7

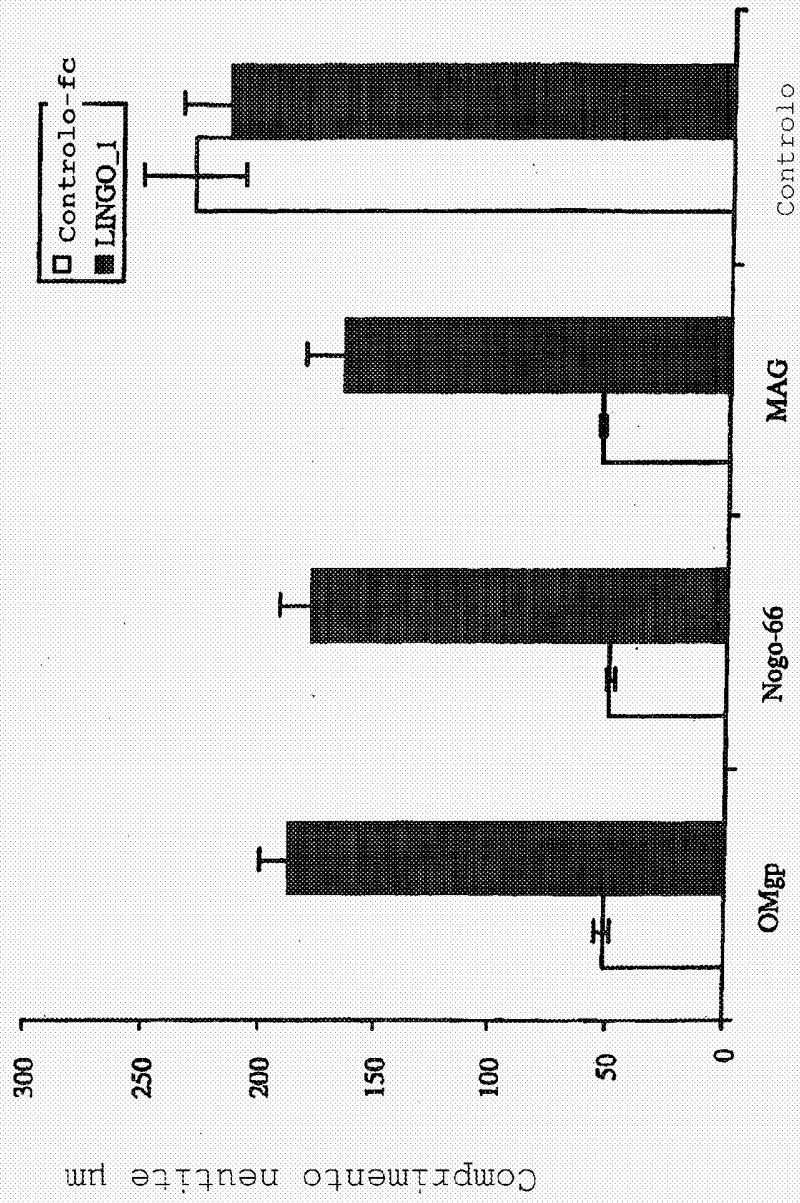


FIG. 8

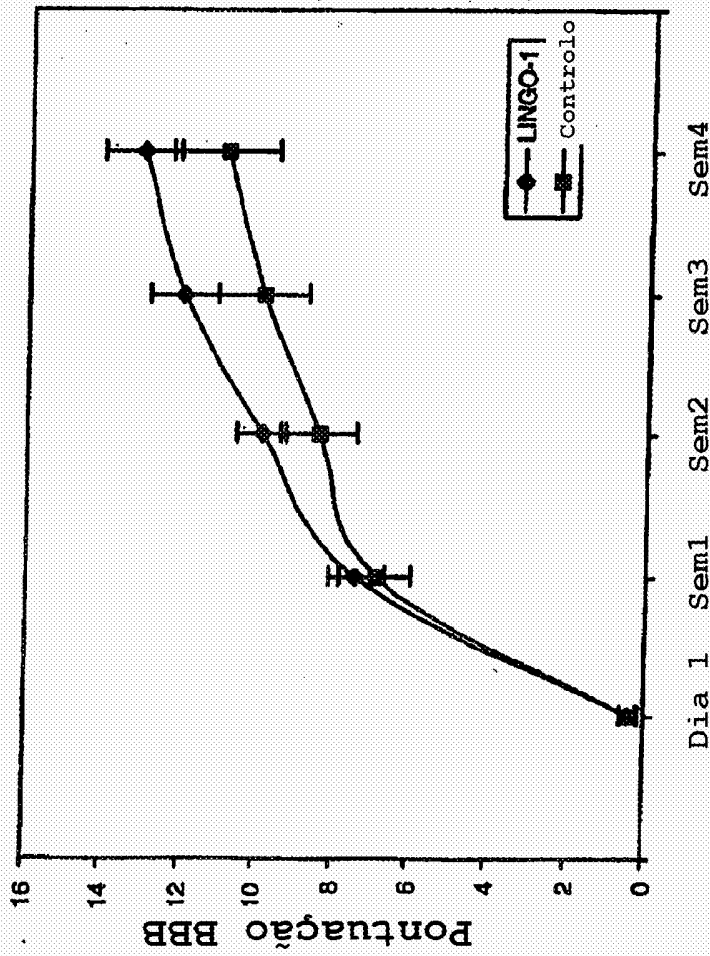


FIG. 9

