



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

(11) PI 0806340-0 B1



(22) Data do Depósito: 09/01/2008

(45) Data de Concessão: 02/06/2020

(54) Título: ANTICORPO ISOLADO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE A SP35, SEU USO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: A61K 31/70; A61K 39/395; A61K 38/16; C07K 14/00; C07K 16/00; (...).

(30) Prioridade Unionista: 09/01/2007 US 60/879,324.

(73) Titular(es): BIOGEN MA INC..

(72) Inventor(es): SHA MI; BLAKE R. PEPINSKY; ZHAOHUI SHAO; ELLEN A. GARBER; STEVEN D. MIKLASZ.

(86) Pedido PCT: PCT US2008000316 de 09/01/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/086006 de 17/07/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 08/07/2009

(57) Resumo: ANTICORPOS DE 5P35 E USOS DOS MESMOS. A presente invenção redere-se a Sp35 endógeno, que é um regulador negativo para sobrevivência neuronal, regeneração dos axônios, diferenciação e mielinização dos oligodendrócitos. Moléculas que bloqueiam a função de Sp35 endógeno, tais anticorpos de antiSp35 podem ser usados como terapêuticas para o tratamento de disfunção dos neurônios e dos oligodendrócitos. A presente invenção provê anticorpos específicos para Sp35, e métodos de usar tais anticorpos como antagonistas da função de Sp35 endógeno. A invenção também provê anticorpos monoclonais derivados de hibridomas específicos e de biblioteca de fago, ácidos nucleicos codificando estes anticorpos, e vetores e células hospedeiras compreendendo estes anticorpos. A invenção também provê métodos de promover sobrevivência e mielinização dos oligodendrócitos em um vertebrado, compreendendo administrar a um vertebrado em necessidade de tal tratamento uma quantidade eficaz de um anticorpo de antiSp35.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"ANTICORPO ISOLADO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE A SP35,
SEU USO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA".**

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se à neurologia, neurobiologia e biologia molecular. Mais particularmente, esta invenção refere-se a moléculas e métodos para tratamento de doenças, distúrbios e lesões neurológicas tais como lesão da espinha dorsal.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] Axônios e dendritos estendem-se dos neurônios. A ponta distal de um axônio extensor ou neurite inclui uma região especializada, conhecida como o cone de crescimento. Cones de crescimento sentem o ambiente local e guiam o crescimento axonal para a célula-alvo de um neurônio. Cones de crescimento respondem às sugestões ambientais, por exemplo, adesividade da superfície, fatores de crescimento, neurotransmissores e campos elétricos. Os cones de crescimento em geral avançam para uma taxa de um a dois milímetros por dia. O cone de crescimento explora a área à frente dele e em ambos os lados, por meio de alongamentos classificados como lamelipódios e filopódios. Quando um alongamento contata uma superfície desfavorável, recolhe-se. Quando um alongamento contata uma superfície de crescimento favorável, ele continua estendendo-se e guiando o cone de crescimento naquela direção. Quando o cone de crescimento alcança uma célula-alvo apropriada uma conexão sináptica é criada.

[003] Função das células nervosas é influenciada pelo contato entre os neurônios e outras células em seu ambiente imediato (Rutishauser, et al., 1988, Physiol. Rev. 68:819). Estas células incluem células gliais especializadas, oligodendrócitos no sistema nervoso central (SNC), e células de Schwann no sistema nervoso periférico

(PNS), que embainham o axônio neuronal com mielina (Lemke, 1992, em *An Introduction to Molecular Neurobiology*, Z. Hall, Ed., p. 281, Sinauer).

[004] Neurônios do SNC têm o potencial inerente para regenerar-se após lesão, mas eles são inibidos de fazê-lo através das proteínas inibidoras 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).

[005] Várias proteínas inibidoras de mielina encontradas nos oligodendrócitos foram caracterizadas. Exemplos conhecidos de proteínas inibidoras 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 oligodendrócitos (OM-gp), Mikol *et al.*, 1988, *J. Cell. Biol.* 106:1273-1279). Cada uma destas proteínas foram separadamente mostradas ser um ligante para o receptor-1 neuronal Nogo (NgR1) (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).

[006] Receptor-1 Nogo (NgR1) é uma proteína de membrana ancorada a GPI contendo 8 repetições ricas em leucina (Fournier *et al.*, 2001, *Nature* 409:341-346). Sob interação com as proteínas inibidoras (por exemplo, NogoA, MAG e OM-gp), o complexo de NgR1 transduz sinais que levam ao colapso do cone de crescimento e inibição do desenvolvimento de neurite.

[007] Há uma necessidade não satisfeita por moléculas e métodos para inibir colapso do cone de crescimento mediado por NgR1 e a inibição resultante de desenvolvimento de neurite. Adicionalmente, há

uma necessidade por moléculas que aumentem a sobrevivência neuronal e regeneração axonal. Particularmente para tratamento de doença, distúrbios ou lesões que envolvem lesão axonal, neuronal ou morte de células de oligodendrócitos, desmielinização ou dismielinização ou em geral refere-se ao sistema nervoso.

[008] Tais doenças, distúrbios ou lesões incluem, mas não são limitadas a, esclerose múltipla (MS), leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), encefalomielite (EPL), mielólise pontina central (CPM), adrenoleucodistrofia, doença de Alexander, doença de Pelizaeus Merzbacher (PMZ), Leucodistrofia de Célula Globoide (doença de Krabbe) e Degeneração Walleriana, neurite ótica, mielite transversal, esclerose lateral amiotrófica (ALS), doença de Huntington, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, lesão da espinha dorsal, lesão traumática do cérebro, lesão pós-radiação, complicações neurológicas de quimioterapia, acidente vascular cerebral, neuropatia ótica isquêmica aguda, deficiência de vitamina E, síndrome da deficiência de vitamina E isolada, AR, síndrome de Bassen-Kornzweig, síndrome de Marchiafava-Bignami, leucodistrofia metacromática, neuralgia trigeminal, e paralisia de Bell. Entre estas doenças, MS é a mais difundida, afetando aproximadamente 2,5 milhões de pessoas mundialmente.

[009] MS em geral começa com um padrão recidivo-remitente de envolvimento neurológico, que depois progride para uma fase crônica com dano neurológico crescente. MS é associada à destruição da mielina, oligodendrócitos e axônios localizados nas lesões crônicas. A desmielinização observada em MS nem sempre é permanente e remielinação foi documentada em estágios prematuros da doença. Remielinação dos neurônios requer oligodendrócitos.

[0010] Vários tratamentos modificadores de doença estão disponíveis para MS, incluindo o uso de corticosteroides e

imunomoduladores tais como interferona beta e Tysabri®. Além disso, por causa do papel central dos oligodendrócitos e mielinização em MS, houve esforços para desenvolver terapias para aumentar os números dos oligodendrócitos ou intensificar a mielinização. Vide, por exemplo, Cohen et al., Patente U.S. Nº 5.574.009; Chang et al., N. Engl. J. Med. 346:165-73 (2002). Porém, resta uma necessidade urgente para inventar terapias adicionais para MS e outros distúrbios de desmielinização e dismielinização.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0011] A presente invenção é com base na descoberta que Sp35 (Sp35 é também designado na literatura como LINGO-1 e LRRN6) é expressado em oligodendrócitos e células neuronais e negativamente regula a diferenciação, sobrevivência dos oligodendrócitos/neurônios, e mielinização dos axônios. Além disso, certos antagonistas de Sp35 promovem sobrevivência, proliferação e diferenciação de oligodendrócitos e células neuronais, como também mielinização dos neurônios. Com base nestas descobertas, a invenção refere-se em geral a anticorpos, fragmento de ligação de antígeno ou derivados dos mesmos que podem ser usados como antagonista de Sp35. Adicionalmente, a invenção em geral refere-se aos métodos para tratar várias doenças, distúrbios ou lesões associados à desmielinização, dismielinização, morte de oligodendrócitos/células neuronais ou lesão axonal mediante a administração de um anticorpo de antagonista de Sp35 ou fragmento de ligação de antígeno.

[0012] Em certas modalidades, a invenção inclui um anticorpo isolado ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo que especificamente liga ao mesmo epitopo de Sp35 como um anticorpo monoclonal de referência selecionado do grupo que consiste em 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2,

3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), 1968 (L1a.13), 7P1D5.1G9, 3B5.2 e Li81.

[0013] Certas modalidades da invenção incluem um polipeptídeo isolado compreendendo uma região variável de cadeia pesada da imunoglobulina (VH) em que as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 são selecionadas das sequências de polipeptídeo mostradas na Tabela 4 ou pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às sequências de polipeptídeo mostradas na Tabela 4 ou pelo menos 80%, 85%, 90, 95% ou 100% idênticas às regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de VH da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8106) ou às regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de VH da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8107).

[0014] Certas modalidades da invenção incluem um polipeptídeo isolado compreendendo uma região variável de cadeia leve da imunoglobulina (VL) em que as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 são selecionadas das sequências de polipeptídeo mostradas na Tabela 5 ou pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às sequências de polipeptídeo mostradas na Tabela 5 ou pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idênticas às regiões VL CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8106) ou às regiões VL CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8107).

[0015] Certas modalidades da invenção incluem um polipeptídeo isolado compreendendo uma região variável de cadeia pesada da imunoglobulina (VH) selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 158 a 172, 372, 376, 380, 384 e 416, como mostradas na Tabela 6, ou pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às ditas SEQ ID NOs: 158 a 172, 372, 376, 380, 384 e 416 como mostradas na Tabela 6 ou pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idênticas à cadeia pesada da imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8106) ou à cadeia pesada da imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8107).

[0016] Certas modalidades da invenção incluem um polipeptídeo isolado compreendendo uma região variável de cadeia leve da imunoglobulina (VL) selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381, 385 e 417, como mostradas na Tabela 8, ou pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às ditas SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381, 385 e 417, como mostradas na Tabela 8 ou pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idênticas à cadeia leve de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8106) ou à cadeia leve de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8107).

[0017] Em modalidades adicionais, a invenção inclui um polinucleotídeo isolado compreendendo um ácido nucleico que codifica uma região variável de cadeia pesada da imunoglobulina (VH) em que as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 são selecionadas do grupo selecionado das sequências de polinucleotídeo mostradas na Tabela 4 ou pelo menos 80%, 85%, 90 ou 95% idênticas às sequências de polinucleotídeo mostradas na Tabela 4.

[0018] Em outras modalidades, a invenção inclui um polinucleotídeo

isolado compreendendo um ácido nucleico que codifica uma região variável de cadeia leve da imunoglobulina (VL) em que as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 são selecionadas das sequências de polinucleotídeo mostradas na Tabela 5 ou pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às sequências de polinucleotídeo mostradas na Tabela 5.

[0019] Outras modalidades da invenção incluem um polinucleotídeo isolado compreendendo um ácido nucleico que codifica uma região variável de cadeia pesada da imunoglobulina (VH) selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 173 a 184, 370, 374, 378, 382 e 422, como mostradas na Tabela 7, ou pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às ditas SEQ ID NOs: 173 a 184, 370, 374, 378, 382 e 422, como mostradas na Tabela 7.

[0020] Outras modalidades da invenção incluem um polinucleotídeo isolado compreendendo um ácido nucleico que codifica uma região variável de cadeia leve da imunoglobulina (VL) selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 185 a 194, 371, 375, 379, 383 e 423, como mostradas na Tabela 9, ou pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às ditas SEQ ID NOs: 185 a 194, 371, 375, 379, 383 e 423, como mostradas na Tabela 9.

[0021] Em certas modalidades, a invenção inclui composições compreendendo os anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno descritos aqui.

[0022] Em modalidades adicionais, a invenção inclui métodos para tratar lesão de SNC, ALS, doença de Huntington, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, neuropatia diabética e acidente vascular compreendendo administrar a um animal em necessidade do dito tratamento uma quantidade efetiva de um agente selecionado do grupo que consiste em um anticorpo de Sp35 isolado ou fragmento do mesmo ou composições compreendendo o dito anticorpo ou fragmento do

mesmo.

[0023] Em outras modalidades, a invenção inclui métodos para tratar doença ou distúrbios associados à inibição do crescimento ou diferenciação dos oligodendrócitos; desmielinação ou dismielinação dos neurônios do SNC incluindo esclerose múltipla (MS), leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), encefalomielite (EPL), mielólise pontina central (CPM), Degeneração Walleriana, adrenoleucodistrofia, doença de Alexander, e Doença de Pelizaeus Merzbacher (PMZ) mediante administração em um animal em necessidade do dito tratamento uma quantidade efetiva de um agente selecionado do grupo que consiste em um anticorpo de Sp35 isolado ou fragmento do mesmo ou composições compreendendo o dito anticorpo ou fragmento do mesmo.

[0024] Outras modalidades da presente invenção incluem um método de inibir transdução de sinal pelo receptor 1 Nogo (NgR1), compreendendo contatar o NgR1 com uma quantidade efetiva de um agente selecionado do grupo que consiste no anticorpo de Sp35 isolado ou fragmento do mesmo ou composições compreendendo o dito anticorpo ou fragmento do mesmo.

[0025] Modalidades adicionais da presente invenção incluem um método de inibição decrescente do crescimento axonal de um neurônio do sistema nervoso central (SNC), compreendendo contatar o neurônio com uma quantidade efetiva de um agente selecionado do grupo que consiste no anticorpo de Sp35 isolado ou fragmento do mesmo ou composições compreendendo o dito anticorpo ou fragmento do mesmo.

[0026] Outras modalidades da presente invenção incluem um método de inibir o colapso do cone de crescimento de um neurônio do SNC, compreendendo contatar o neurônio com uma quantidade efetiva de um agente selecionado do grupo que consiste no anticorpo de Sp35 isolado ou fragmento do mesmo ou composições compreendendo o dito anticorpo ou fragmento do mesmo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS/FIGURAS

[0027] FIGURA 1: Gel de SDS-PAGE mostrando imunoprecipitação de Sp35 por anticorpos monoclonais 1A7 e 2F3.

[0028] FIGURA 2: Resultado de FACS mostrando que MAb 1A7 e 2F3 ligaram-se às células COS-7 ou 293 que expressam Sp35, mas não às células sem expressão de Sp35.

[0029] FIGURA 3: MAb 1A7 e 2F3 protegeram os neurônios de DRG da inibição mediada por mielina do desenvolvimento de neurite.

[0030] FIGURA 4A-G: Manchamento imunohistoquímico ("IHC") das coculturas de neurônios de DRG e oligodendrócitos tratados com anticorpos monoclonais 1A7 e 2F3, ou anticorpo de controle. Painéis D e E são ampliações dos painéis B e C, respectivamente. Manchamento com anticorpo anti- β III-tubulina para identificar axônios, ou anticorpo anti-MBP para identificar oligodendrócitos. F: Quantificação de células mielinizantes de MBP+ no tratamento de coculturas com 1A7 ou 2F3. G: Análise de western blot para quantificar a MBP produzida das coculturas de neurônios de DRG e oligodendrócitos tratados com anticorpos monoclonais 1A7 e 2F3.

[0031] FIGURA 5A-C: A: Manchamento de anticorpo de CC1 de oligodendrócitos de camundongo em modelo de cuprizona. B: Manchamento de anticorpo de proteína anti-MBP ou luxol fast blue de neurônios de camundongo em modelo de cuprizona. C: Quantificação de oligodendrócitos positivos para anticorpo CC1 em quatro semanas e 6 semanas.

[0032] FIGURA 6: RGCs sobreviventes. Tratamento com anticorpo monoclonal 1A7 animais tratados com anticorpo anti-Sp35 1A7 mostraram sobrevivência neuronal significativa (80%) quando comparados aos animais de anticorpo de controle ou tratados com PBS, os quais cada apenas mostraram aproximadamente 50% de sobrevivência neuronal.

[0033] FIGURA 7. Classificações BBB de camundongos que recebem anticorpo anti-Sp35 1A7 após lesão da espinha dorsal como descrito no Exemplo 8.

[0034] FIGURA 8. Western blot de oligodendrócitos e DRGs cocultivados após incubação com anticorpos anti-Sp35 Li05, Li06 e 3, 10 e 30 mg de Sp35-Fc (LINGO-1-Ig) como descrito no Exemplo 9.

[0035] FIGURA 9. Fotografias dos nervos óticos de A) Ratos Normais; B) Ratos com Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) induzida por Glicoproteína de Oligodendrócito de Mielina (MOG); e C) ratos com Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) induzida por Glicoproteína de Oligodendrócito de Mielina (MOG) tratados com o anticorpo de Sp35 1A7. Micrógrafos de elétrons de cada nervo ótico são mostrados abaixo de cada fotografia do nervo ótico.

[0036] FIGURA 10. Gráfico do número de fibras neuronais regenerativas por seção contada em animais que recebem uma injeção intravítrea do anticorpo de Sp35 1A7 após esmagamento do nervo ótico.

[0037] FIGURA 11. Resultado de FACS mostrando que MAbs 3B5.2 (3B5) e 7P1D5.1G9 (1D5) ligaram-se às células CHO estavelmente transfeccionadas com Sp35 (LINGO-1).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. DEFINIÇÕES

[0038] É para ser observado que o termo "um" ou "uma" refere-se a uma entidade ou mais daquela entidade; por exemplo, "um anticorpo de Sp35" é entendido representar um ou mais anticorpos de Sp35. Como tais, os termos "um" (ou "uma"), "um ou mais", e "pelo menos um" podem ser usados alternadamente aqui.

[0039] Como aqui usado, o termo "polipeptídeo" é intencionado abranger um "polipeptídeo" singular como também vários "polipeptídeos", e refere-se a uma molécula composta de monômeros (aminoácidos) linearmente ligados por ligações de amida (também

conhecidas como ligações peptídicas). O termo "polipeptídeo" refere-se a qualquer cadeia ou cadeias de dois ou mais aminoácidos, e não se refere a um comprimento específico do produto. Desse modo, peptídeos, dipeptídeos, tripeptídeos, oligopeptídeos, "proteína", "cadeia de aminoácido", ou qualquer outro termo usado para se referir a uma cadeia ou cadeias de dois ou mais aminoácidos, são incluídos dentro da definição de "polipeptídeo", e o termo "polipeptídeo" pode ser usado em vez de, ou alternadamente, com quaisquer destes termos. O termo "polipeptídeo" é também intencionado a se referir aos produtos de modificações de pós-expressão do polipeptídeo, incluindo sem limitação, glicosilação, acetilação, fosforilação, amidação, derivatização por grupos de proteção/bloqueio conhecidos, clivagem proteolítica, ou modificação através de aminoácidos de ocorrência não-natural. Um polipeptídeo pode ser derivado de uma fonte biológica natural ou pode ser produzido através de tecnologia recombinante, mas não necessariamente é translado de uma sequência de ácido nucleico designada. Ele pode ser gerado de qualquer maneira, incluindo através de síntese química.

[0040] Um polipeptídeo da invenção pode ser de um tamanho de cerca de 3 ou mais, 5 ou mais, 10 ou mais, 20 ou mais, 25 ou mais, 50 ou mais, 75 ou mais, 100 ou mais, 200 ou mais, 500 ou mais, 1.000 ou mais, ou 2.000 ou mais aminoácidos. Polipeptídeos podem ter uma estrutura tridimensional definida, embora eles não necessariamente tenham tal estrutura. Polipeptídeos com uma estrutura tridimensional definida são referidos como dobrados, e polipeptídeos não possuindo uma estrutura tridimensional definida, mas do contrário, podem adotar um número grande de conformações diferentes, e são referidos como desdobrados. Como aqui usado, o termo glicoproteína refere-se a uma proteína acoplada a pelo menos uma porção de carboidrato que é ligada à proteína por meio de uma cadeia lateral contendo oxigênio ou

contendo nitrogênio de um resíduo de aminoácido, por exemplo, um resíduo de serina ou um resíduo de asparagina.

[0041] Por um polipeptídeo "isolado" ou um fragmento, variante, ou derivado do mesmo, é intencionado um polipeptídeo que não esteja em seu ambiente natural. Nenhum nível particular de purificação é requerido. Por exemplo, um polipeptídeo isolado pode ser removido de seu ambiente nativo ou natural. Polipeptídeos e proteínas recombinantemente produzidos expressos em células hospedeiras são considerados isolados para propósitos da invenção, como também polipeptídeos nativos ou recombinantes que foram separados, fracionados, ou parcial ou substancialmente purificados por qualquer técnica adequada.

[0042] Também inclusos como polipeptídeos da presente invenção estão fragmentos, derivados, análogos, ou variantes dos polipeptídeos anteriores, e qualquer combinação dos mesmos. Os termos "fragmento", "variante", "derivado" e "análogo" quando referindo aos anticorpos de Sp35 ou polipeptídeos de anticorpo da presente invenção incluem qualquer polipeptídeo que retém pelo menos algumas das propriedades de ligação de antígeno do anticorpo ou polipeptídeo nativo correspondente. Fragmentos de polipeptídeos da presente invenção incluem fragmentos proteolíticos, como também fragmentos de deleção, além dos fragmentos de anticorpo específicos debatidos em outro lugar aqui. Variantes de anticorpos de Sp35 e polipeptídeos de anticorpo da presente invenção incluem fragmentos como descritos acima, e também polipeptídeos com sequências de aminoácido alteradas devido a substituições, deleções, ou inserções de aminoácidos. Variantes podem ocorrer naturalmente ou ser de ocorrência não-natural. Variantes de ocorrência não-natural podem ser produzidas usando técnicas de mutagênese conhecidas na técnica. Polipeptídeos variantes podem compreender substituições, deleções ou adições de aminoácido

conservadoras ou não-conservadoras. Derivados dos anticorpos de Sp35 e polipeptídeos do anticorpo da presente invenção são polipeptídeos que foram alterados para exibir características adicionais não encontradas no polipeptídeo nativo. Exemplos incluem proteínas de fusão. Polipeptídeos variantes podem ser também referidos aqui como "análogos de polipeptídeo". Como aqui usado, um "derivado" de um anticorpo de Sp35 ou polipeptídeo de anticorpo refere-se a um polipeptídeo em questão tendo um ou mais resíduos quimicamente derivatizados por reação de um grupo lateral funcional. Também inclusos como "derivados" são aqueles peptídeos que contêm um ou mais derivados de aminoácido de ocorrência natural dos vinte aminoácidos padrões. Por exemplo, 4-hidroxiprolina pode ser substituída por prolina; 5-hidroxilisina pode ser substituída por lisina; 3-metil-histidina pode ser substituída por histidina; homoserina pode ser substituída por serina; e ornitina pode ser substituída por lisina.

[0043] O termo "polinucleotídeo" é intencionado abranger um ácido nucleico singular como também ácidos nucleicos plurais, e refere-se a uma molécula ou construção de ácido nucleico isolada, por exemplo, RNA mensageiro (mRNA) ou DNA de plasmídeo (pDNA). Um polinucleotídeo pode compreender uma ligação de fosfodiéster convencional ou uma ligação não-convencional (por exemplo, uma ligação de amida, tal como encontrada em ácidos nucleicos de peptídeo (PNA)). O termo "ácido nucleico" refere-se a qualquer um ou mais segmentos de ácido nucleico, por exemplo, fragmentos de DNA ou RNA, presentes em um polinucleotídeo. Por ácido nucleico ou polinucleotídeo "isolado" é intencionado uma molécula de ácido nucleico, DNA ou RNA, que foi removida de seu ambiente nativo. Por exemplo, um polinucleotídeo recombinante que codifica um anticorpo de Sp35 contido em um vetor é considerado isolado para o propósito da presente invenção. Outros exemplos de um polinucleotídeo isolado

incluem polinucleotídeos recombinantes mantidos em células hospedeiras heterólogas ou polinucleotídeos purificados (parcial ou substancialmente) em solução. Moléculas de RNA isoladas incluem transcrições de RNA in vivo ou in vitro dos polinucleotídeos da presente invenção. Polinucleotídeos ou ácidos nucleicos isolados de acordo com a presente invenção também incluem tais moléculas sinteticamente produzidas. Além disso, polinucleotídeo ou um ácido nucleico pode ser ou incluir um elemento regulador tal como um promotor, sítio de ligação de ribossoma, ou um terminador de transcrição.

[0044] Como aqui usado, uma "região de codificação" é uma porção de ácido nucleico que consiste em códons translados em aminoácidos. Embora um "códon de parada" (TAG, TGA, ou TAA) não seja translado em um aminoácido, ele pode ser considerado fazer parte de uma região de codificação, mas quaisquer sequências de flaqueamento, por exemplo, promotores, sítios de ligação de ribossoma, terminadores transcricionais, íntrons, e similares, não faz parte de uma região de codificação. Duas ou mais regiões de codificação da presente invenção podem estar presentes em uma construção de polinucleotídeo simples, por exemplo, em um vetor simples, ou em construções de polinucleotídeo separadas, por exemplo, em vetores separados (diferentes). Além disso, qualquer vetor pode conter uma região de codificação simples, ou pode compreender duas ou mais regiões de codificação, por exemplo, um vetor simples pode separadamente codificar uma região variável de cadeia pesada da imunoglobulina e uma região variável de cadeia leve da imunoglobulina. Além disso, um vetor, polinucleotídeo, ou ácido nucleico da invenção pode codificar regiões de codificação heterólogas, fundidas ou não-fundidas em um ácido nucleico que codifica um anticorpo de Sp35 ou fragmento, variante, ou derivado do mesmo. Regiões de codificação heterólogas incluem sem limitação elementos ou motivos

especializados, tais como um peptídeo sinal secretório ou um domínio funcional heterólogo.

[0045] Em certas modalidades, o polinucleotídeo ou ácido nucleico é DNA. No caso de DNA, um polinucleotídeo compreendendo um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo normalmente pode incluir um promotor e/ou outros elementos de controle de transcrição ou tradução operavelmente associados a uma ou mais regiões de codificação. Uma associação operável é quando uma região de codificação para um produto de gene, por exemplo, um polipeptídeo, é associada a uma ou mais sequências reguladoras em um tal modo a colocar a expressão do produto de gene sob a influência ou controle da(s) sequência(s) reguladora(s). Dois fragmentos de DNA (tais como uma região de codificação de polipeptídeo e um promotor associado a ela) são "operavelmente associados" se indução de função do promotor resultar na transcrição de mRNA que codifica o produto de gene desejado e se a natureza da ligação entre os dois fragmentos de DNA não interferirem com a habilidade das sequências reguladoras de expressão para direcionar a expressão do produto de gene ou interferir com a habilidade do modelo de DNA a ser transcrito. Desse modo, uma região de promotor seria operavelmente associado a um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo se o promotor fosse capaz de realizar transcrição daquele ácido nucleico. O promotor pode ser um promotor célula-específico que direciona transcrição substancial do DNA apenas em células predeterminadas. Outros elementos de controle de transcrição, além de um promotor, por exemplo, intensificadores, operadores, repressores, e sinais de terminação de transcrição, podem ser operavelmente associados ao polinucleotídeo para direcionar transcrição célula-específica. Promotores adequados e outras regiões de controle de transcrição são descritos aqui.

[0046] Uma variedade de regiões de controle de transcrição é

conhecida àqueles versados na técnica. Estas incluem, sem limitação, regiões de controle de transcrição que funcionam em células vertebradas, tais como, mas não-limitadas a, segmentos de promotor e de intensificador de citomegalovírus (promotor prematuro imediato, junto com íntron-A), símio vírus 40 (promotor prematuro), e retrovírus (tal como vírus do sarcoma de Rous). Outras regiões de controle de transcrição incluem aquelas derivadas de genes vertebrados tais como actina, proteína de choque térmico, hormônio de crescimento bovino e β -globina de coelho, como também outras sequências capazes de controlar expressão de gene em células eucarióticas. Regiões de controle de transcrição adequadas adicionais incluem promotores e intensificadores tecido-específicos como também os promotores induzíveis por linfocina (por exemplo, promotores induzíveis por interferonas ou interleucinas).

[0047] Similarmente, uma variedade de elementos de controle de tradução é conhecida por aqueles versados na técnica. Estes incluem, mas não são limitados a, sítios de ligação de ribossoma, códons de iniciação e terminação de tradução, e elementos derivados de picornavírus (particularmente um sítio de entrada de ribossoma interno, ou IRES, também referido como uma sequência CITE).

[0048] Em outras modalidades, um polinucleotídeo da presente invenção é RNA, por exemplo, na forma de RNA mensageiro (mRNA).

[0049] Regiões de codificação de polinucleotídeo e de ácido nucleico da presente invenção podem ser regiões de codificação adicionais associadas às que codificam peptídeos secretórios ou sinais que direcionam a secreção de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo da presente invenção. De acordo com a hipótese de sinal, as proteínas secretadas por células mamíferas têm uma sequência de peptídeo sinal ou de líder secretório que é clivada da proteína madura uma vez que a exportação da cadeia de proteína

crescente ao longo do retículo endoplasmático bruto foi iniciada. Aqueles versados na técnica estão cientes que polipeptídeos segregados por células vertebradas em geral têm um peptídeo sinal fundido ao término N do polipeptídeo, o qual é clivado do polipeptídeo completo ou de "comprimento total" para produzir uma forma secretada ou "madura" do polipeptídeo. Em certas modalidades, o peptídeo sinal nativo, por exemplo, um peptídeo sinal de cadeia pesada ou cadeia leve da imunoglobulina, é usado, ou um derivado funcional daquela sequência que retém a habilidade para direcionar a secreção do polipeptídeo que é operavelmente associado a ele. Alternativamente, um peptídeo sinal mamífero heterólogo, ou um derivado funcional do mesmo, pode ser usado. Por exemplo, a sequência líder do tipo selvagem pode ser substituída com a sequência líder de ativador de plasminogênio de tecido humano (TPA) ou β -glucuronidase de camundongo.

[0050] A presente invenção é direcionada a certos anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos. A menos que especificamente referindo a anticorpos de tamanho total tal como anticorpos de ocorrência natural, o termo "anticorpos de Sp35" abrange anticorpos de tamanho total como também fragmentos de ligação de antígeno, variantes, análogos, ou derivados de tais anticorpos, por exemplo, anticorpo de ocorrência natural ou moléculas de imunoglobulina ou moléculas de anticorpo engenheirado ou fragmentos que ligam antígeno de uma maneira similar às moléculas de anticorpo.

[0051] Os termos "anticorpo" e "imunoglobulina" são usados alternadamente aqui. Um anticorpo ou imunoglobulina compreende pelo menos o domínio variável de uma cadeia pesada, e normalmente compreende pelo menos os domínios variáveis de uma cadeia pesada e uma cadeia leve. Estruturas de imunoglobulina básicas em sistemas vertebrados são relativamente bem-entendidas. Vide, por exemplo,

Harlow et al., Anticorpos: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988).

[0052] Como será debatido em mais detalhe abaixo, o termo "imunoglobulina" compreende várias classes vastas de polipeptídeos que podem ser distinguidos bioquimicamente. Aqueles versados na técnica apreciarão que cadeias pesadas são classificadas como gama, mu, alfa, delta, ou epsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ) com algumas subclasses entre elas (por exemplo, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). É a natureza desta cadeia que determina a "classe" do anticorpo como IgG, IgM, IgA IgG, ou IgE, respectivamente. As subclasses de imunoglobulina (isótipos) por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc. são bem caracterizadas e são conhecidas conferir especialização funcional. Versões modificadas de cada uma destas classes e isótipos são facilmente discerníveis ao artesão versado em vista da descrição imediata e, conseqüentemente, estão dentro do escopo da invenção imediata. Todas as classes de imunoglobulina estão claramente dentro do escopo da presente invenção, o debate a seguir será em geral direcionado à classe de IgG das moléculas de imunoglobulina. Com respeito à IgG, uma molécula de imunoglobulina padrão compreende dois polipeptídeos de cadeia leve idênticos de peso molecular de aproximadamente 23.000 Daltons, e dois polipeptídeos de cadeia pesada idênticos de peso molecular de 53.000-70.000. As quatro cadeias são tipicamente unidas através de ligações de dissulfeto em uma configuração "Y", em que as cadeias leves que agrupam-se com as cadeias pesadas iniciam na boca do "Y" e continuam através da região variável.

[0053] Cadeias leves são classificadas como kappa ou lambda (κ , λ). Cada classe de cadeia pesada pode estar ligada com uma cadeia leve kappa ou lambda. Em geral, as cadeias leves e pesadas são covalentemente ligadas entre si, e as porções da "cauda" das duas cadeias pesadas estão ligadas umas às outras por ligações de

dissulfeto covalentes ou ligações não-covalentes quando as imunoglobulinas forem geradas por hibridomas, células B ou células hospedeiras geneticamente engenheiradas. Na cadeia pesada, as sequências de aminoácido correm de um término N nas extremidades bifurcadas da configuração de Y para o término C ao fundo de cada cadeia.

[0054] As cadeias leves e pesadas são divididas em regiões de homologia estrutural e funcional. Os termos "constante" e "variável" são funcionalmente usados. Nesta consideração, será apreciado que os domínios variáveis das porções de cadeia tanto leve (VL) como pesada (VH) determinam o reconhecimento e especificidade do antígeno. Inversamente, os domínios constantes da cadeia leve (CL) e da cadeia pesada (CH1, CH2 ou CH3) conferem propriedades biológicas importantes tais como secreção, mobilidade transplacentar, ligação de receptor Fc, ligação de complemento, e similares. Por convenção, a numeração dos domínios de região constante aumenta à medida que eles ficam mais distais do sítio de ligação de antígeno ou término amino do anticorpo. A porção N-terminal é uma região variável e a porção C-terminal é uma região constante; os domínios CH3 e CL na verdade compreendem o término carbóxi da cadeia pesada e leve, respectivamente.

[0055] Como indicado acima, a região variável permite o anticorpo seletivamente reconhecer e especificamente ligar os epitopos nos antígenos. Ou seja, o domínio VL e domínio VH, ou subconjunto das regiões de determinação de complementaridade (CDRs), de um anticorpo se combinam para formar a região variável que define um sítio de ligação de antígeno tridimensional. Esta estrutura de anticorpo quaternária forma o sítio de ligação de antígeno presente no término de cada braço do Y. Mais especificamente, o sítio de ligação de antígeno é definido por três CDRs em cada uma das cadeias VH e VL. Em algumas

circunstâncias, por exemplo, certas moléculas de imunoglobulina derivadas das espécies de camelídeo ou engenheiradas com base nas imunoglobulinas de camelídeo, uma molécula de imunoglobulina completa pode consistir em cadeias pesadas apenas, sem cadeias leves. Vide, por exemplo, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993).

[0056] Em anticorpos de ocorrência natural, as seis "regiões de determinação de complementaridade" ou "CDRs" presentes em cada domínio de ligação de antígeno são sequências curtas não-contíguas de aminoácidos que especificamente estão posicionados para formar o domínio de ligação de antígeno quando o anticorpo assumir sua configuração tridimensional em um ambiente aquoso. O restante dos aminoácidos no domínio de ligação de antígenos, referidos como regiões de "estrutura", mostram menos variabilidade intermolecular. As regiões de estrutura adotam uma conformação de folha β em grande parte e as CDRs formam alças que conectam, e em alguns casos fazem parte da estrutura de folha β . Desse modo, as regiões de estrutura agem para formar um andaime que provê posicionamento das CDRs em orientação correta através de interações intercadeia, não-covalentes. O domínio de ligação de antígeno formado pelas CDRs posicionadas define uma superfície complementar para o epitopo no antígeno imunorreativo. Esta superfície complementar promove a ligação não-covalente do anticorpo a seu epitopo cognato. Os aminoácidos que compreendem as CDRs e as regiões de estrutura, respectivamente, podem ser facilmente identificados para qualquer região variável de cadeia pesada ou leve dada por alguém versado na técnica, uma vez eles tenham sido precisamente definidos (vide, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); e Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987) que é incorporado aqui por referência em suas totalidades).

[0057] No caso onde houver duas ou mais definições de um termo que é usado e/ou acordado dentro da técnica, a definição do termo como aqui usado é intencionada a incluir todos tais significados a menos que explicitamente declarado o contrário. Um exemplo específico é o uso do termo "região de determinação de complementaridade" ("CDR") para descrever o antígeno não-contíguo que combina os sítios encontrados dentro da região variável de ambos polipeptídeos de cadeia pesada e leve. Esta região particular foi descrita por Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) e por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), que são incorporadas aqui por referência, onde as definições incluem sobreposição ou subconjuntos de resíduos de aminoácido quando comparados um ao outro. Não obstante, aplicação de qualquer definição para referir a uma CDR de um anticorpo ou variantes do mesmo é intencionada estar dentro do escopo do termo como definido e usado aqui. Os resíduos de aminoácido apropriados, os quais abrangem as CDRs definidas por cada uma das referências acima citadas estão expostos abaixo na Tabela I como uma comparação. Os números dos resíduos exatos que abrangem uma CDR particular variarão, dependendo da sequência e tamanho da CDR. Aqueles versados na técnica podem habitualmente determinar que resíduos compreendem uma CDR particular dada a sequência de aminoácido de região variável do anticorpo.

TABELA 1. Definições de CDR¹

	Kabat	Chothia
CDR1 de V _H	31-35	26-32
CDR2 de V _H	50-65	52-58
CDR3 de V _H	95-102	95-102
CDR1 de V _L	24-34	26-32
CDR2 de V _L	50-56	50-52
CDR3 de V _L	89-97	91-96

¹Numeração de todas as definições de CDR na Tabela 1 são de acordo

com as convenções de numeração expostas por Kabat *et al.* (vide abaixo).

[0058] Kabat *et al.* também definiu um sistema de numeração para sequências de domínio variável que são aplicáveis a qualquer anticorpo. Alguém versado na técnica pode de forma não-ambígua atribuir este sistema de "numeração de Kabat" para qualquer sequência de domínio variável, sem contar com quaisquer dados experimentais além da própria sequência. Como aqui usado, a "numeração de Kabat" refere-se ao sistema de numeração exposto por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que do contrário especificado, as referências à numeração das posições específicas do resíduo de aminoácido em um anticorpo de Sp35 ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo da presente invenção são de acordo com o sistema de numeração de Kabat.

[0059] Em espécies de camélideo, a região variável de cadeia pesada, referida como VHH, forma o domínio de ligação de antígeno inteiro. As diferenças principais entre as regiões variáveis VHH de camélideo e aquelas derivadas de anticorpos convencionais (VH) incluem (a) aminoácidos mais hidrofóbicos na superfície de contato de cadeia leve de VH quando comparado à região correspondente em VHH, (b) uma CDR3 mais longa em VHH, e (c) a ocorrência frequente de uma ligação de dissulfeto entre CDR1 e CDR3 em VHH.

[0060] Anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção incluem, mas não são limitados a, anticorpos policlonais, monoclonais, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados, ou quiméricos, de cadeia simples, fragmentos de ligação de epitopo, por exemplo, Fab, Fab' e F(ab')₂, Fd, Fvs, Fvs de cadeia simples (scFv), anticorpos de cadeia simples, Fvs ligado a dissulfeto (sdFv), fragmentos compreendendo um domínio VL

ou VH, fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab, e anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluindo, por exemplo, anticorpos anti-Id para anticorpos de Sp35 descritos aqui). Moléculas de ScFv são conhecidas na técnica e são descritas, por exemplo, na patente US 5.892.019. Moléculas de imunoglobulina ou de anticorpo da invenção podem ser de qualquer tipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, e IgY), classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse de molécula de imunoglobulina.

[0061] Fragmentos de anticorpo, incluindo anticorpos de cadeia simples, podem compreender a(s) região(ões) variável(is) sozinha(s) ou em combinação com a totalidade ou uma porção das seguintes: região de dobradiça, domínios CH1, CH2, e CH3. Também inclusos na invenção estão fragmentos de ligação de antígeno também compreendendo qualquer combinação de região(ões) variável(is) com uma região de dobradiça, domínios CH1, CH2, e CH3. Anticorpos ou fragmentos imuno-específicos dos mesmos para o uso nos métodos de diagnósticos e terapêuticos descritos aqui podem ser de qualquer origem animal incluindo pássaros e mamíferos. Preferivelmente, os anticorpos são anticorpos humanos, murinos, de burro, coelho, cabra, porquinho-da-índia, camelo, lhama, cavalo, ou de galinha. Em outra modalidade, a região variável pode ser condrictoide em origem (por exemplo, de tubarões). Como aqui usado, anticorpos "humanos" incluem anticorpos tendo a sequência de aminoácido de uma imunoglobulina humana e incluem anticorpos isolados de bibliotecas de imunoglobulina humanas ou de animais transgênicos para uma ou mais imunoglobulinas humanas e que não expressam imunoglobulinas endógenas, como infra descrito e, por exemplo, na Patente U.S. 5.939.598 por Kucherlapati et al.

[0062] Como aqui usado, o termo "porção de cadeia pesada" inclui sequências de aminoácido derivadas de uma cadeia pesada da

imunoglobulina. Um polipeptídeo compreendendo uma porção de cadeia pesada compreende pelo menos um de: um domínio CH1, um domínio de dobradiça (por exemplo, região de dobradiça superior, intermediária, e/ou inferior), um domínio CH2, um domínio CH3, ou uma variante ou fragmento dos mesmos. Por exemplo, um polipeptídeo de ligação para o uso na invenção pode compreender uma cadeia de polipeptídeo compreendendo um domínio CH1; uma cadeia de polipeptídeo compreendendo um domínio CH1, pelo menos uma porção de um domínio de dobradiça, e um domínio CH2; uma cadeia de polipeptídeo compreendendo um domínio CH1 e um domínio CH3; uma cadeia de polipeptídeo compreendendo um domínio CH1, pelo menos uma porção de um domínio de dobradiça, e um domínio CH3, ou uma cadeia de polipeptídeo compreendendo um domínio CH1, pelo menos uma porção de um domínio de dobradiça, um domínio CH2, e um domínio CH3. Em outra modalidade, um polipeptídeo da invenção compreende uma cadeia de polipeptídeo compreendendo um domínio CH3. Também, um polipeptídeo de ligação para o uso na invenção pode desprover pelo menos uma porção de um domínio CH2 (por exemplo, todo ou parte de um domínio CH2). Como exposto acima, será entendido por alguém versado na técnica que estes domínios (por exemplo, as porções de cadeia pesada) podem ser modificados de modo que eles variem em sequência de aminoácido da molécula de imunoglobulina de ocorrência natural.

[0063] Em certos anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos descritos aqui, as porções de cadeia pesada de uma cadeia de polipeptídeo de um multímero são idênticas às em uma segunda cadeia de polipeptídeo do multímero. Alternativamente, os monômeros contendo porção de cadeia pesada da invenção não são idênticos. Por exemplo, cada monômero pode compreender um sítio de ligação-alvo diferente, formando, por

exemplo, um anticorpo biespecífico.

[0064] As porções de cadeia pesada de um polipeptídeo de ligação para o uso nos métodos de diagnóstico e de tratamento descritos aqui podem ser derivadas de moléculas de imunoglobulina diferentes. Por exemplo, uma porção de cadeia pesada de um polipeptídeo pode compreender um domínio CH1 derivado de uma molécula de IgG1 e uma região de dobradiça derivada de uma molécula de IgG3. Em outro exemplo, uma porção de cadeia pesada pode compreender uma região de dobradiça derivada, em parte, de uma molécula de IgG1 e, em parte, de uma molécula de IgG3. Em outro exemplo, uma porção de cadeia pesada pode compreender uma dobradiça quimérica derivada, em parte, de uma molécula de IgG1 e, em parte, de uma molécula de IgG4.

[0065] Como aqui usado, o termo "porção de cadeia leve" inclui sequências de aminoácido derivadas de uma cadeia leve de imunoglobulina. Preferivelmente, a porção de cadeia leve compreende pelo menos um de um domínio VL ou CL.

[0066] Anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos descritos aqui podem ser descritos ou especificados em termos do(s) epitopo(s) ou porção(ões) de um antígeno, por exemplo, um polipeptídeo-alvo (Sp35) que eles reconhecem ou especificamente se ligam. A porção de um polipeptídeo-alvo que especificamente interage com o domínio de ligação de antígeno de um anticorpo é um "epitopo", ou um "determinante antigênico". Um polipeptídeo-alvo pode compreender um epitopo simples, mas tipicamente compreende pelo menos dois epitopos, e pode incluir qualquer número de epitopos, dependendo do tamanho, conformação, e tipo do antígeno. Além disso, deveria ser observado que um "epitopo" em um polipeptídeo-alvo pode ser ou incluir elementos de não-polipeptídeo, por exemplo, um epitopo pode incluir uma cadeia lateral de carboidrato.

[0067] O tamanho mínimo de um epítipo de peptídeo ou polipeptídeo para um anticorpo é acreditado ser aproximadamente quatro a cinco aminoácidos. Peptídeo ou epítipos de polipeptídeo preferivelmente contêm pelo menos sete, mais preferivelmente pelo menos nove e o mais preferivelmente entre pelo menos cerca de 15 a cerca de 30 aminoácidos. Considerando que uma CDR pode reconhecer um peptídeo ou polipeptídeo antigênico em sua forma terciária, os aminoácidos compreendendo um epítipo não necessariamente são contíguos, e em alguns casos, podem nem mesmo estar na mesma cadeia de peptídeo. Na presente invenção, epítipo de peptídeo ou polipeptídeo reconhecido por anticorpos de Sp35 da presente invenção contém uma sequência de pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, mais preferivelmente pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 25, ou entre cerca de 15 a cerca de 30 aminoácidos contíguos ou não-contíguos de Sp35.

[0068] Por "especificamente liga", é em geral significado que um anticorpo liga a um epítipo por meio de seu domínio de ligação de antígeno, e que a ligação requer alguma complementaridade entre o domínio de ligação de antígeno e o epítipo. De acordo com esta definição, um anticorpo é dito "especificamente ligar" a um epítipo quando se ligar àquele epítipo, por meio de seu domínio de ligação de antígeno, mais facilmente do que se ligaria a um epítipo aleatório não relacionado. O termo "especificidade" é aqui usado para qualificar a afinidade relativa pela qual um certo anticorpo se liga a um certo epítipo. Por exemplo, anticorpo "A" pode ser julgado ter uma especificidade mais alta para um epítipo dado que o anticorpo "B", ou anticorpo "A" pode ser dito ligar ao epítipo "C" com uma especificidade mais alta que ao epítipo relacionado "D".

[0069] Por "preferencialmente se liga", é significado que o anticorpo

especificamente se liga a um epitopo mais facilmente do que se ligaria a um epitopo relacionado, similar, homólogo, ou análogo. Desse modo, um anticorpo que "preferencialmente se liga" a um epitopo dado mais provavelmente se ligará àquele epitopo do que a um epitopo relacionado, embora um tal anticorpo possa reagir cruzado com o epitopo relacionado.

[0070] Por via de exemplo não-limitativo, pode ser considerado que um anticorpo se liga a um primeiro epitopo preferencialmente se ele se ligar ao dito epitopo primeiro com uma constante de dissociação (KD) que é menor que a KD do anticorpo para o segundo epitopo. Em outro exemplo não-limitativo, pode ser considerado que um anticorpo se ele se liga a um primeiro antígeno preferencialmente se ligar ao primeiro epitopo com uma afinidade que é pelo menos uma ordem de magnitude menor que a KD do anticorpo para o segundo epitopo. Em outro exemplo não-limitativo, pode ser considerado que um anticorpo se ele se liga a um primeiro epitopo preferencialmente se ele se ligar ao primeiro epitopo com uma afinidade que é pelo menos duas ordens de magnitude menor que a KD do anticorpo para o segundo epitopo.

[0071] Em outro exemplo não-limitativo, pode ser considerado que um anticorpo se liga a um primeiro epitopo preferencialmente se ele se ligar ao primeiro epitopo com uma taxa de dissociação ("offrate" ($k(\text{off})$)) que é menor que a $k(\text{off})$ do anticorpo para o segundo epitopo. Em outro exemplo não-limitativo, pode ser considerado que um anticorpo se ele se liga um primeiro epitopo preferencialmente se ligar ao primeiro epitopo com uma afinidade que é pelo menos uma ordem de magnitude menor que a $k(\text{off})$ do anticorpo para o segundo epitopo. Em outro exemplo não-limitativo, pode ser considerado que um anticorpo se liga a um primeiro epitopo preferencialmente se ele se ligar ao primeiro epitopo com uma afinidade que é pelo menos duas ordens de magnitude menor que a $k(\text{off})$ do anticorpo para o segundo epitopo.

[0072] Um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado descritos aqui pode ser dito se ligar a um polipeptídeo-alvo descrito aqui ou um fragmento ou variante do mesmo com uma taxa de dissociação ($k(\text{off})$) menor ou igual a $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ou 10^{-3} s^{-1} . Mais preferivelmente, pode ser dito que um anticorpo da invenção se liga a um polipeptídeo-alvo descrito aqui ou um fragmento ou variante do mesmo com uma taxa de dissociação ($k(\text{off})$) menor ou igual a $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, ou 10^{-5} s^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ou 10^{-7} s^{-1} .

[0073] Um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado descritos aqui pode ser dito se ligar a um polipeptídeo-alvo descrito aqui ou um fragmento ou variante do mesmo com uma taxa associação ("on rate" ($k(\text{on})$)) maior ou igual a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ou $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Mais preferivelmente, pode ser dito que um anticorpo da invenção se liga a um polipeptídeo-alvo descrito aqui ou um fragmento ou variante do mesmo com uma taxa associação ($k(\text{on})$) maior ou igual a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ou $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ou $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

[0074] Um anticorpo é dito competitivamente inibir a ligação de um anticorpo de referência a um epitopo dado se ele se ligar preferencialmente àquele epitopo ao ponto de bloquear, até certo ponto, a ligação do anticorpo de referência ao epitopo. Inibição competitiva pode ser determinada por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, ensaios de ELISA de competição. Um anticorpo pode ser dito competitivamente inibir a ligação do anticorpo de referência a um epitopo dado em pelo menos 90%, pelo menos 80%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, ou pelo menos 50%.

[0075] Como aqui usado, o termo "afinidade" refere-se a uma medida da resistência da ligação de um epitopo individual com a CDR de uma molécula de imunoglobulina. Vide, por exemplo, Harlow et al.,

Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988) nas páginas 27-28. Como aqui usado, o termo "avidez" refere-se à estabilidade geral do complexo entre uma população de imunoglobulinas e um antígeno, ou seja, a resistência de combinação funcional de uma mistura de imunoglobulina com o antígeno. Vide, por exemplo, Harlow nas páginas 29-34. Avidez é relacionada tanto à afinidade das moléculas de imunoglobulina individuais na população com epítopos específicos, e também às valências das imunoglobulinas e do antígeno. Por exemplo, a interação entre um anticorpo monoclonal bivalente e um antígeno com uma estrutura de epítopo altamente repetitiva, tal como um polímero, seria um de avidez alta.

[0076] Anticorpos de Sp35 ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes ou derivados dos mesmos da invenção podem também ser descritos ou especificados em termos de sua reatividade cruzada. Como aqui usado, o termo "reatividade cruzada" refere-se à habilidade de um anticorpo, específico para um antígeno, reagir com um segundo antígeno; uma medida de parentesco entre duas substâncias antigênicas diferentes. Desse modo, um anticorpo é reativo cruzado se ele se ligar a um epítopo diferente daquele que induziu sua formação. O epítopo reativo cruzado em geral contém muitas das mesmas características estruturais complementares que o epítopo indutor, e em alguns casos, pode na verdade adequar-se melhor que o original.

[0077] Por exemplo, certos anticorpos têm algum grau de reatividade cruzada, em que eles ligam epítopos relacionados, mas não-idênticos, por exemplo, epítopos com pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 65%, pelo menos 60%, pelo menos 55%, e pelo menos 50% de identidade (quando calculada usando métodos conhecidos na técnica e descritos aqui) para um epítopo de referência. Pode ser dito que um anticorpo tem pouca ou nenhuma reatividade

cruzada se ele não ligar epitopos com menos que 95%, menos que 90%, menos que 85%, menos que 80%, menos que 75%, menos que 70%, menos que 65%, menos que 60%, menos que 55%, e menos de 50% de identidade (quando calculada usando métodos conhecidos na técnica e descritos aqui) para um epitopo de referência. Um anticorpo pode ser julgado "altamente específico" para um certo epitopo, se ele não ligar qualquer outro análogo, ortólogo, ou homólogo daquele epitopo.

[0078] Anticorpos de Sp35 ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes ou derivados dos mesmos da invenção podem também ser descritos ou especificados em termos de sua afinidade de ligação a um polipeptídeo da invenção. Afinidades de ligação preferidas incluem aquelas com uma constante de dissociação ou K_d menor que 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, ou 10^{-15} M.

[0079] Anticorpos de Sp35 ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes ou derivados dos mesmos da invenção podem ser "multiespecíficos", por exemplo, biespecíficos, triespecíficos ou de maior multiespecificidade, significando que reconhece e liga a dois ou mais epitopos diferentes presentes em um ou mais antígenos diferentes (por exemplo, proteínas) ao mesmo tempo. Desse modo, se um anticorpo de Sp35 é "monoespecífico" ou "multiespecífico", por exemplo, "biespecífico", refere-se ao número de epitopos diferentes com os quais um polipeptídeo de ligação reage. Anticorpos multiespecíficos podem ser específicos para epitopos diferentes de um polipeptídeo-alvo descrito aqui ou podem ser específicos para um polipeptídeo-alvo como também para um epitopo heterólogo, tal como

um polipeptídeo heterólogo ou material de suporte de sólido.

[0080] Como aqui usado, o termo "valência" refere-se ao número de domínios de ligação potenciais, por exemplo, domínio de ligação de antígenos, presentes em um anticorpo de Sp35, polipeptídeo ou anticorpo de ligação. Cada domínio de ligação especificamente se liga a um epitopo. Quando um anticorpo de Sp35, polipeptídeo ou anticorpo de ligação compreender mais de um domínio de ligação, cada domínio de ligação pode especificamente ligar ao mesmo epitopo, a um anticorpo com dois domínios de ligação, denominado "monoespecífico bivalente", ou a epitopos diferentes, para um anticorpo com dois domínios de ligação, denominado "bivalente biespecífico". Um anticorpo pode também ser biespecífico e bivalente para cada especificidade (denominado "anticorpos tetravalentes biespecíficos"). Em outra modalidade, minicorpos tetravalentes ou anticorpos com domínios deletados podem ser feitos.

[0081] Anticorpos bivalentes biespecíficos, e métodos de fazê-los, são descritos, por exemplo, nas patentes U.S. Nº 5.731.168; 5.807.706; 5.821.333; e Publ. do Pedido U.S. 2003/020734 e 2002/0155537, as descrições destes são aqui incorporadas por referência. Anticorpos tetravalentes biespecíficos, e métodos de fazê-los, são descritos por exemplo, em WO 02/096948 e WO 00/44788, as descrições de ambos são incorporadas por referência aqui. Vide em geral, publicações de PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991); Patente U.S. 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819; Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992).

[0082] Como previamente indicou, as estruturas de subunidade e configuração tridimensional das regiões constantes das várias classes de imunoglobulina são bem-conhecidas. Como aqui usado, o termo "domínio de VH" inclui o domínio variável de amino terminal de uma

cadeia pesada da imunoglobulina e o termo "domínio CH1" inclui o primeiro (a maioria amino terminal) domínio de região constante de uma cadeia pesada da imunoglobulina. O domínio CH1 é adjacente ao domínio de VH e é amino terminal para a região de dobradiça de uma imunoglobulina molécula de cadeia pesada.

[0083] Como aqui usado, o termo "domínio CH2" inclui a porção de uma molécula de cadeia pesada que se estende, por exemplo, de cerca de resíduo 244 a resíduo 360 de um anticorpo usando esquemas de numeração convencionais (resíduos 244 a 360, sistema de numeração de Kabat; e resíduos 231-340, sistema de numeração EU; vide Kabat EA et al. op. cit. O domínio CH2 é único em que não é estritamente pareado com outro domínio. Do contrário, duas cadeias de carboidrato ramificadas N-ligadas são interpostas entre os dois domínios CH2 de uma molécula de IgG nativa intacta. Está também bem-documentado que o domínio CH3 se estende do domínio CH2 ao terminal C da molécula de IgG e compreende aproximadamente 108 resíduos.

[0084] Como aqui usado, o termo "região de dobradiça" inclui a porção de uma molécula de cadeia pesada que une o domínio CH1 ao domínio CH2. Esta região de dobradiça compreende aproximadamente 25 resíduos e é flexível, desse modo permitindo que as duas regiões de ligação de antígeno N-terminais movam-se independentemente. As regiões de dobradiça podem ser subdivididas em três domínios distintos: domínios de dobradiça superior, intermediário, e inferior (Roux et al., J. Immunol. 161:4083 (1998)).

[0085] Como aqui usado, o termo "ligação de dissulfeto" inclui a ligação covalente formada entre dois átomos de enxofre. O aminoácido cisteína compreende um grupo tiol que pode formar uma ligação ou ponte de dissulfeto com um segundo grupo tiol. Na maioria das moléculas de IgG de ocorrência natural, as regiões CH1 e CL são ligadas por uma ligação de dissulfeto e as duas cadeias pesadas são

ligadas através de duas ligações de dissulfeto nas posições correspondendo a 239 e 242 usando o sistema de numeração de Kabat (posição 226 ou 229, sistema de numeração EU).

[0086] Como aqui usado, o termo "anticorpo quimérico" será empregado para significar qualquer anticorpo em que a região ou sítio imunorreativo é obtido ou derivado de uma primeira espécie e a região constante (que pode ser intacta, parcial ou modificada de acordo com a invenção imediata) é obtida de uma segunda espécie. Em modalidades preferidas, a região ou sítio de ligação-alvo será de uma fonte não-humana (por exemplo, camundongo ou primata) e a região constante é humana.

[0087] Como aqui usado, o termo "anticorpo engenheirado" refere-se a um anticorpo em que o domínio variável ou na cadeia pesada e leve ou ambas é alterado por pelo menos substituição parcial de uma ou mais CDRs de um anticorpo de especificidade conhecida e, se necessário, substituição da região de estrutura parcial e alteração de sequência. Embora as CDRs possam ser derivadas de um anticorpo da mesma classe ou mesma subclasse como o anticorpo do qual as regiões de estrutura são derivadas, é visado que as CDRs serão derivadas de um anticorpo de classe diferente e preferivelmente de um anticorpo de uma espécie diferente. Um anticorpo engenheirado, em que uma ou mais CDRs "doadoras" de um anticorpo não-humano de especificidade conhecida é enxertado em uma região de estrutura de cadeia pesada ou leve humana, é referido aqui como um "anticorpo humanizado". Pode não ser necessário substituir todas as CDRs com as CDRs completas da região variável doadora para transferir a capacidade de ligação de antígeno de um domínio variável a outro. De preferência, pode ser apenas necessário transferir aqueles resíduos que são necessários para manter a atividade do sítio de ligação-alvo. Dadas as explanações expostas, por exemplo, nas Patentes U.S. Nº

5.585.089, 5.693.761, 5.693.762, e 6.180.370, estará bem dentro da competência daqueles versados na técnica, ou levando a cabo experimentação ou testagem rotineira para se obter por tentativa e erro um anticorpo funcional engenheirado ou humanizado.

[0088] Como aqui usado, o termo "polipeptídeo corretamente dobrado" inclui polipeptídeos (por exemplo, anticorpos de Sp35) em que todos os domínios funcionais que compreendem o polipeptídeo são distintamente ativos. Como aqui usado, o termo "polipeptídeo impropriamente dobrado" inclui polipeptídeos em que pelo menos um dos domínios funcionais do polipeptídeo não é ativo. Em uma modalidade, um polipeptídeo corretamente dobrado compreende cadeias de polipeptídeo ligadas por pelo menos uma ligação de dissulfeto e, inversamente, um polipeptídeo impropriamente dobrado compreende cadeias de polipeptídeo não ligadas por pelo menos uma ligação de dissulfeto.

[0089] Como aqui usado o termo "engenheirado" inclui manipulação de moléculas de ácido nucleico ou de polipeptídeo através de meios sintéticos (por exemplo, através de técnicas recombinantes, síntese de peptídeo in vitro, por acoplamento enzimático ou químico dos peptídeos ou um pouco da combinação destas técnicas).

[0090] Como aqui usado, os termos "ligado", "fundido" ou "fusão" são usados alternadamente. Estes termos referem-se à união de dois elementos ou mais componentes, por quaisquer meios incluindo conjugação química ou meios recombinantes. Uma "fusão dentro da estrutura" refere-se à ligação de duas ou mais estruturas de leitura aberta de polinucleotídeo (ORFs) para formar uma ORF mais longa contínua, de uma maneira que mantém a estrutura de leitura translacional correta das ORFs originais. Desse modo, uma proteína de fusão recombinante é uma proteína simples que contém dois ou mais segmentos que correspondem aos polipeptídeos codificados pelas

ORFs originais (cujos segmentos não são normalmente assim unidos na natureza). Embora a estrutura de leitura é, desse modo, feita contínua ao longo dos segmentos fundidos, os segmentos podem ser física ou espacialmente separados por, por exemplo, sequência de ligante dentro da estrutura. Por exemplo, polinucleotídeos que codificam as CDRs de uma região variável da imunoglobulina podem ser fundidos, dentro da estrutura, mas separados por um polinucleotídeo que codifica pelo menos uma região de estrutura da imunoglobulina ou regiões de CDR adicionais, contanto que as CDRs "fundidas" sejam cotransladadas como parte de um polipeptídeo contínuo.

[0091] No contexto de polipeptídeos, uma "sequência linear" ou uma "sequência" é uma ordem de aminoácidos em um polipeptídeo em uma direção terminal amino para carboxila em que os resíduos que se avizinham na sequência são contíguos na estrutura primária do polipeptídeo.

[0092] O termo "expressão", como aqui usado, refere-se a um processo pelo qual um gene produz um bioquímico, por exemplo, um RNA ou polipeptídeo. O processo inclui qualquer manifestação da presença funcional do gene dentro da célula incluindo, sem limitação, knockdown do gene como também expressão transitória e expressão estável. Este inclui sem limitação transcrição do gene em RNA mensageiro (mRNA), RNA de transferência (tRNA), pequeno RNA em forma de grampo (shRNA), pequeno RNA de interferência (siRNA) ou qualquer outro produto de RNA, e a tradução de tal mRNA em polipeptídeo(s). Se o produto desejado final for um bioquímico, a expressão inclui a criação daquele bioquímico e qualquer precursor. Expressão de um gene produz um "produto de gene". Como aqui usado, um produto de gene ou pode ser um ácido nucleico, por exemplo, um RNA mensageiro produzido por transcrição de um gene, ou um polipeptídeo que é transladado de uma transcrição. Produtos de gene

descritos aqui também incluem ácidos nucleicos com modificações pós-transcricionais, por exemplo, poliadenilação, ou polipeptídeos com modificações pós-translacionais, por exemplo, metilação, glicosilação, a adição de lipídios, associação com outras subunidades de proteína, clivagem proteolítica, e similares.

[0093] Como aqui usado, os termos "tratar" ou "tratamento" referem-se a tratamento terapêutico e medidas profiláticas ou preventivas, em que o objetivo é impedir ou desacelerar (diminuir) uma alteração fisiológica indesejada ou distúrbio, tal como a progressão de esclerose múltipla. Resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não são limitados a, alívio dos sintomas, diminuição da extensão da doença, estado de doença estabilizado (isto é, não piorando), demora ou redução da progressão da doença, melhora ou palição do estado de doença, e remissão (quer parcial quer total), detectável ou indetectável. "Tratamento" pode também significar prolongar a sobrevivência quando comparado à sobrevivência esperada se não receber o tratamento. Aqueles em necessidade de tratamento incluem aqueles já com a condição ou distúrbio como também aqueles propensos a ter a condição ou distúrbio ou aqueles em que a condição ou distúrbio é para ser impedido.

[0094] Por "sujeito" ou "indivíduo" ou "animal" ou "paciente" ou "mamífero" são significado qualquer sujeito, particularmente um sujeito mamífero, a quem diagnose, prognose, ou terapia é desejada. Sujeitos mamíferos incluem seres humanos, animais domésticos, animais de fazenda, e jardim zoológico, de jogos esportivos, ou animais de estimação tais como cachorros, gatos, porquinhos-da-índia, coelhos, ratos, camundongos, cavalos, bois, vacas, e assim por diante.

[0095] Como aqui usado, frases tais como "um sujeito que se beneficiaria da administração de um anticorpo de Sp35" e "um animal em necessidade de tratamento" incluem sujeitos, tais como sujeitos

mamíferos que se beneficiariam da administração de um anticorpo de Sp35 usada, por exemplo, para detecção de um polipeptídeo de Sp35 (por exemplo, para um procedimento diagnóstico) e/ou de tratamento, isto é, palição ou prevenção de uma doença tal como MS, com um anticorpo de Sp35. Como descrito em mais detalhe aqui, o anticorpo de Sp35 pode ser usado na forma não-conjugada ou conjugada, por exemplo, com um fármaco, profármaco, ou um isótopo.

II. Sp35

[0096] Sp35 humano de ocorrência natural (Sp35) é uma proteína glicosilada específica para o sistema nervoso central que é prognosticada ter 614 aminoácidos (SEQ ID NO: 2), incluindo uma sequência sinal de 33 aminoácidos. Sp 35 é também conhecido na técnica pelos nomes LINGO-1, LRRN6, LRRN6A, FLJ14594, LERN1, MGC17422 e UNQ201. O polipeptídeo de Sp35 do tipo selvagem de comprimento total humano contém um domínio de LRR que consiste em 14 repetições ricas em leucina (incluindo tampas N e C terminais), um domínio de Ig, uma região de transmembrana, e um domínio citoplásmico. O domínio citoplásmico contém um sítio de fosforilação de tirosina canônico. Além disso, a proteína de Sp35 de ocorrência natural contém uma sequência sinal, uma região básica curta entre o domínio de LRRCT e de Ig, e uma região de transmembrana entre o domínio de Ig e o domínio citoplásmico. O gene de Sp35 humano (SEQ ID NO: 1) contém códons de partida de tradução alternativos, de forma que seis aminoácidos adicionais, isto é, MQVSKR (SEQ ID NO: 3) podem ou não estar presentes no término N da Sequência sinal de Sp35. A Tabela 2 lista os domínios de Sp35 e outras regiões, de acordo com o número de resíduo de aminoácido, com base na sequência de aminoácido de Sp35 apresentada aqui como SEQ ID NO: 2. O polipeptídeo de Sp35 é caracterizado em mais detalhes na Publicação de PCT WO Nº 2004/085648 que é incorporada aqui por referência em sua totalidade.

TABELA 2 - Domínios de Sp35

Domínio ou Região	Resíduo de início	Resíduo de término
Sequência sinal	1	33 ou 35
LRRNT	34 ou 36	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	414 ou 416
Básico(a)	415 ou 417	424
Ig	419	493
Sequência de conexão	494	551
Transmembrana	552	576
Citoplásmico(a)	577	614

[0097] Expressão de distribuição e desenvolvimento de tecido de Sp35 foi estudada em seres humanos e ratos. Biologia de Sp35 foi estudada em um modelo de animal experimental (rato). Expressão de Sp35 de rato fica localizada nos neurônios e oligodendrócitos, como determinado por northern blot e mancha imunoistoquímica. Nível de expressão de mRNA de Sp35 de rato é regulado de forma desenvolvendo, com pico logo após o nascimento, isto é, ca. dia um pós-

natal. Em um modelo de lesão de transseção da espinha dorsal de rato, Sp35 é suprarregulado no sítio da lesão, como determinado por RT-PCR. Vide Mi et al. Nature Neurosci. 7:221-228 (2004).

[0098] No contexto dos aminoácidos compreendendo os vários domínios estruturais e funcionais de um polipeptídeo de Sp35, o termo "cerca de" inclui o valor particularmente citado e valores maiores ou menores por vários aminoácidos (por exemplo, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1). Uma vez que a localização destes domínios como listados na Tabela 1 foi prognosticada através de computação gráfica, alguém versado apreciaria que os resíduos de aminoácido que constituem os domínios podem variar ligeiramente (por exemplo, por cerca de 1 a 15 resíduos) dependendo dos critérios usados para definir o domínio.

[0099] Os inventores descobriram que Sp35 de comprimento total, do tipo selvagem liga a NgR1. Vide Publicação de PCT Nº WO 2004/085648. Os inventores também descobriram que Sp35 é expressado em oligodendrócitos e que a proteína de Sp35 está envolvida na regulação de mielinização mediada por oligodendrócito dos axônios. Vide Publicação de Patente U.S. Nº 2006/0009388 A1 que é incorporada aqui por referência em sua totalidade.

[00100] A sequência de nucleotídeo para a molécula de Sp35 de comprimento total é como segue:

```
ATGCTGGCGGGGGGCGTGAGGAGCATGCCCAGCCCCCTCCTGGCCTGCTGGC
AGCCCATCCTCCTGCTGGTGCTGGGCTCAGTGCTGTCAGGCTCGGCCACGGG
CTGCCCCGCCCCGCTGCGAGTGCTCCGCCCAGGACCGCGCTGTGCTGTGCCAC
CGCAAGCGCTTTGTGGCAGTCCCCGAGGGCATCCCCACCGAGACGCGCCTGC
TGGACCTAGGCAAGAACCGCATCAAAACGCTCAACCAGGACGAGTTCGCCAG
CTTCCCGCACCTGGAGGAGCTGGAGCTCAACGAGAACATCGTGAGCGCCGTG
GAGCCCGGCGCCTTCAACAACCTCTTCAACCTCCGGACGCTGGGTCTCCGCA
GCAACCGCCTGAAGCTCATCCCGCTAGGCGTCTTCACTGGCCTCAGCAACCT
GACCAAGCTGGACATCAGCGAGAACAAGATTGTTATCCTGCTGGACTACATG
TTTCAGGACCTGTACAACCTCAAGTCACTGGAGGTTGGCGACAATGACCTCG
```

TCTACATCTCTCACCGCGCCTTCAGCGGCCTCAACAGCCTGGAGCAGCTGAC
 GCTGGAGAAATGCAACCTGACCTCCATCCCCACCGAGGCGCTGTCCCACCTG
 CACGGCCTCATCGTCCTGAGGCTCCGGCACCTCAACATCAATGCCATCCGGG
 ACTACTCCTTCAAGAGGCTCTACCGACTCAAGGTCTTGGAGATCTCCCACTG
 GCCCTACTTGGACACCATGACACCCAACTGCCTCTACGGCCTCAACCTGACG
 TCCCTGTCCATCACACACTGCAATCTGACCGCTGTGCCCTACCTGGCCGTCC
 GCCACCTAGTCTATCTCCGCTTCTCAACCTCTCCTACAACCCCATCAGCAC
 CATTGAGGGCTCCATGTTGCATGAGCTGCTCCGGCTGCAGGAGATCCAGCTG
 GTGGGCGGGCAGCTGGCCGTGGTGGAGCCCTATGCCTTCCGCGGCCTCAACT
 ACCTGCGCGTGCTCAATGTCTCTGGCAACCAGCTGACCACACTGGAGGAATC
 AGTCTTCCACTCGGTGGGCAACCTGGAGACACTCATCCTGGACTCCAACCCG
 CTGGCCTGCGACTGTGCGCTCCTGTGGGTGTTCCGGCGCCGCTGGCGGCTCA
 ACTTCAACCGGCAGCAGCCACGTGCGCCACGCCCCGAGTTTGTCCAGGGCAA
 GGAGTTCAAGGACTTCCCTGATGTGCTACTGCCCAACTACTTCACCTGCCGC
 CGCGCCCGCATCCGGGACCGCAAGGCCAGCAGGTGTTTGTGGACGAGGGCC
 ACACGGTGACGTTTGTGTGCCGGGCGGATGGCGACCCGCGCCCGCCATCCT
 CTGGCTCTCACCCCGAAAGCACCTGGTCTCAGCCAAGAGCAATGGGCGGCTC
 ACAGTCTTCCCTGATGGCACGCTGGAGGTGCGCTACGCCCAGGTACAGGACA
 ACGGCACGTACCTGTGCATCGCGGCCAACGCGGGCGGCAACGACTCCATGCC
 CGCCACCTGCATGTGCGCAGCTACTCGCCCGACTGGCCCCATCAGCCCAAC
 AAGACCTTCGCTTTCATCTCCAACCAGCCGGGCGAGGGAGAGGCCAACAGCA
 CCCGCGCCACTGTGCCTTTCCCCTTCGACATCAAGACCCTCATCATCGCCAC
 CACCATGGGCTTCATCTCTTTCTGGGCGTCGTCCTCTTCTGCCTGGTGCTG
 CTGTTTCTCTGGAGCCGGGGCAAGGGCAACACAAAGCACAAACATCGAGATCG
 AGTATGTGCCCCGAAAGTCGGACGCAGGCATCAGCTCCGCCGACGCGCCCCG
 CAAGTTCAACATGAAGATGATATGA (SEQ ID NO: 1) .

[00101] A sequência de polipeptídeo para o polipeptídeo de Sp35 de comprimento total é como segue:

MLAGGVRSMPSPLLACWQPILLLLVLGSLVLSGSATGCPPRCECSAQDRAVLCH
 RKRFVAVPEGIPTETRLLDLGKNRIKTLNQDEFASFPHLEEELELNENIVSAV
 EPGAFNNLFNLRTLGLRSNRLKLIPLGVFTGLSNLTKLDISENKIVILLDYM

FQDLYNLKSLEVGDNDLVYISHRAFSGLNSLEQLTLEKCNLTSTIPTREALSHL
HGLIVLRLRHLNINAIIRDYSFKRLYRLKVLEISHWPYLDTMTPNCLYGLNLT
SLSITHCNLTAVPYLAVRHLVYLRFLNLSYNPISTIEGSMHELLRLQEIQ
VGGQLAVVEPYAFRGLNYLRVLNVSGNQLTLEESVFHSGNLETLILDSNP
LACDCRLLWVFRRRWRLNFNRRQQPTCATPEFVQGKEFKDFPDVLLPNYFTCR
RARIRDRKAQQVFVDEGHTVQFVCRADGDPPPAILWLSPRKHLVSAKSNLRL
TVFPDGTLEVRYAQVQDNGTYLCIAANAGGNDSPAHHLHVRSPDWPHQPN
KTFAFISNQPGEGEANSTRATVPFPFDIKTLIIATTMGFISFLGVVLFCLVL
LFLWSRGKGN TKHNIEIEYVPRKSDAGISSADAPRKFNMKMI (SEQ ID
NO: 2) .

III. ANTICORPOS de Sp35

[00102] Em uma modalidade, a presente invenção é direcionada a anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos. Por exemplo, a presente invenção inclui pelo menos os domínios de ligação de antígeno de certos anticorpos monoclonais, e fragmentos, variantes, e derivados dos mesmos mostrados nas Tabelas 3A a 3E.

[00103] A Tabela 3A descreve as regiões do polipeptídeo de Sp35 que estão ligadas através de certos anticorpos derivados da biblioteca de fago de comprimento total. Estes anticorpos têm as mesmas regiões variáveis que os fragmentos de Fab derivados da Biblioteca de Exibição de Fago-1, como indicado na Tabela 3B (por exemplo, D05 na Tabela 3A tem a mesma região variável que Li05 na Tabela 3B, D06 na Tabela 3A tem a mesma região variável que Li06 na Tabela 3B, etc.). Os anticorpos foram testados para ligar fragmentos de Sp35 como definidos na Tabela 3A, usando métodos bem-conhecidos na técnica.

[00104] Tabelas 3B-3E descrevem a habilidade dos anticorpos monoclonais nomeados ou fragmentos de Fab para detectar Sp35 em vários ensaios tais como: Classificação de Célula Ativada Fluorescente (FACS), Imunoprecipitação (IP), Análise de western blot, Imunoistoquímica (IHC) e Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima

(ELISA). Protocolos detalhados para executar estes ensaios são descritos aqui ou são bem-conhecidos e entendidos por aqueles versados na técnica. Anticorpos monoclonais derivados de hibridoma listados nas Tabelas 3B e 3C foram produzidos por injeção de Sp35 solúvel em camundongos e depois isolados usando tecnologia de hibridoma que é bem-conhecida na técnica e descrita aqui. Anticorpos monoclonais e fragmentos de Fab de anticorpo listados na Tabela 3B foram isolados de duas bibliotecas de exibição de fago diferentes usando técnicas conhecidas na técnica.

TABELA 3A

Fragmento de Sp35	D03 (Região Variável de Li03)	D05 (Região Variável de Li05)	D06 (Região Variável de Li06)	D08 (Região Variável de Li08)	D11 (Região Variável de Li03)	D13 (Região Variável de Li13)	D33 (Região Variável de Li33)
1-432 Fc de rato	+	+	+	-	+	-	+
417-493 Fc de rato	-	+/-	+/-	-	-	-	-
AP-Sp35 (1-419)	N/D	+	-/+	-/+	N/D	N/D	N/D
AP-Sp35 (418-498)	N/D	-	-	-	N/D	N/D	N/D
417-498 Fc humano	-	-	-	-	-	-	-
417-503 Fc humano	-	-	-	-	-	-	-
363-498 Fc humano	-	-	-	-	-	-	-
244-498 Fc humano	-	-	-	-	-	-	-

43/278

TABELA 3B - ANTICORPOS MONOCLONAIS DE SP35

ANTICORPOS MONOCLONAIS DERIVADOS DE HIBRIDOMA							
	FACs		Imunoprecipitação			Western	
	huSp35	mSp35	Sp35Fc	huSp35	mSp35	huSp35	Sp35 de camundongo / rato
201'				sim		sim	Não (camundongo e rato)
3A3	-	-	+	-	-	não	Não (camundongo e rato)
3A6	++	+/-	++	+++	-/+	não	Não (camundongo e rato)
1A7	++	-	++	+++	-/+	não	Não (camundongo e rato)
1G7	++	+/-	++	+++	+	não	Não (camundongo e rato)
2B10	++	+/-	+	+++	-/+	não	Não (camundongo e rato)
2C11	-	-	-	-	-	não	Não (camundongo e rato)
2F3	+/-	+/-		+++	+++	sim	sim com mSp35 supraexpresso
3P1B1.1F9				+++	-		
3P1D10.2C3				+++	-		
3P1E11.3B7				+++	-		
3P2C6. 3G10.2H7				+++	-		
3P2C9.2G4				+++	-		
3P4A6.1D9				+++	-		

44/278

Continuação

ANTICORPOS MONOCLONAIS DERIVADOS DE HIBRIDOMA							
	FACs		Imunoprecipitação			Western	
	huSp35	mSp35	Sp35Fc	huSp35	mSp35	huSp35	Sp35 de camundongo / rato
3P4A1.2B9				+++	-		
3P4C2.2D2				+++	+++		
3P4C5.1D8				+++	-		
3P4C8.2G9				+++	+++	sim	Sim (camundongo)
7P1D5.1G9 (ATCC: PTA - 8107)	+	+		+++	+++	não	Não (camundongo)
1B6.4	+++	+++		+++ (banda mais superior)	+++ (banda inferior)	não	Não (camundongo)
2C7.2	+++	+++		+++ (banda mais superior)	+++ (banda inferior)	não	Não (camundongo)
2D6.1	++ (liga a 293 células)	++ (liga 293 células)		-	-	não	Não (camundongo)

45/278

Continuação

ANTICORPOS MONOCLONAIS DERIVADOS DE HIBRIDOMA							
	FACs		Imunoprecipitação			Western	
	huSp35	mSp35	Sp35Fc	huSp35	mSp35	huSp35	Sp35 de camundongo / rato
2F7.3	++	++		+++ (banda inferior)	+++ (banda inferior)	sim	Sim (camundongo)
2H3.2	++	++		+++ (inferior banda)	+++ (inferior banda)	sim	Sim (camundongo)
3C11.1	++	++		+++ (banda inferior)	+++ (banda inferior)	sim	Sim (camundongo)
3E3.1	+++	+++		+++ (banda mais superior)	+++ (banda inferior)	não	Não (camundongo)
3H11.2	++	++		+++ (banda inferior)	+++ (banda inferior)	sim	Sim (camundongo)

46/278

Continuação

ANTICORPOS MONOCLONAIS DERIVADOS DE HIBRIDOMA							
	FACs		Imunoprecipitação			Western	
	huSp35	mSp35	Sp35Fc	huSp35	mSp35	huSp35	Sp35 de camundongo / rato
3G8.1	+	+		+++ (banda mais superior)	+++	não	Não (camundongo)
2B8.1	++	++		+++ (banda mais superior)	+ (banda inferior)	não	Não (camundongo)
3B5.2 (ATCC: PTA - 8106)	+++	+++		+++ (banda mais superior)	+++	não	Não (camundongo)

47/278

TABELA 3B - Anticorpos Monoclonais de Sp35 (continuação)

ANTICORPOS MONOCLONAIS DERIVADOS DE HIBRIDOMA									
	IHC em Células transfectadas		IHC em Tecidos		ELISA				
	huSp35	mSp35	WT (parafina)	KO (parafina)	34- 417	417- 493	419- 495	1-532	34- 532
201'	N/A	N/A	sim	sim					
3A3	não	não			sim			sim	
3A6	sim c/ base	não							
1A7	sim c/ base	não					+/-	sim	sim
1G7	sim c/ base	não							
2B10	sim c/ base	não			sim			sim	
2C11	não	não							
2F3	sim	sim	sim	sim	sim			sim	
3P1B1.1F9									
3P1D10.2C3							+/-	sim	sim
3P1E11.3B7							+/-	sim	sim
3P2C6. 3G10.2H7							+/-	sim	sim
3P2C9.2G4							+/-	sim	sim
3P4A6.1D9							+/-	sim	sim

Continuação

ANTICORPOS MONOCLONAIS DERIVADOS DE HIBRIDOMA									
	IHC em Células transfectadas		IHC em Tecidos		ELISA				
	huSp35	mSp35	WT (parafina)	KO (parafina)	34- 417	417- 493	419- 495	1-532	34- 532
3P4A1.2B9									
3P4C2.2D2					sim			sim	
3P4C5.1D8							+/-	sim	sim
3P4C8.2G9					sim			sim	
7P1D5.1G9 (ATCC: PTA-8107)									
1B6.4									
2C7.2									
2D6.1									
2F7.3									
2H3.2									
3C11.1									
3E3.1									
3H11.2									
3G8.1									
2B8.1									

Continuação

ANTICORPOS MONOCLONAIS DERIVADOS DE HIBRIDOMA									
	IHC em Células transfectadas		IHC em Tecidos		ELISA				
	huSp35	mSp35	WT (parafina)	KO (parafina)	34- 417	417- 493	419- 495	1-532	34- 532
3B5.2 (ATCC: PTA-8106)									

TABELA 3B - Anticorpos Monoclonais de Sp35 (continuação)

FRAGMENTOS DE Fab MONOCLONAIIS DERIVADOS DA BIBLIOTECA DE EXIBIÇÃO DE FAGO-1							
	FACs		Imunoprecipitação			Western	
	huSp35	mSp35	sp35Fc	huSp35	mSp35	huSp35	Sp35 de camundongo/rato
30-C12 (Li01)				++	++		
38-D01 (Li02)				-/+	-/+		
35-E04 (Li03)				++	+++		
36-C09 (Li04)				-/+	-/+		
30-A11 (Li05)	+		++	++	++		
34-F02 (Li06)				++	++		
29-E07 (Li07)				++	++		
34-G04 (Li08)	+/-		+	++	++		
36-A12 (Li09)				-	-		
28-D02 (Li10)				-/+	+/-		
30-B01 (Li11)	++			++	++		
34-B03 (Li12)				+	+		

TABELA 3B - Anticorpos Monoclonais de Sp35 (continuação)

FRAGMENTOS DE Fab MONOCLONAIS DERIVADOS DA BIBLIOTECA DE EXIBIÇÃO DE FAGO-1									
	IHC em Células Transfectadas		IHC em Tecidos		ELISA				
	huSp35	mSp35	WT (parafina)	KO (parafina)	34- 417	417- 493	419- 495	1-532	34- 532
30-C12 (Li01)									
38-D01 (Li02)									
35-E04 (Li03)									
36-C09 (Li04)									
30-A11 (Li05)									
34-F02 (Li06)									
29-E07 (Li07)									
34-G04 (Li08)									
36-A12 (Li09)									
28-D02 (Li10)									
30-B01 (Li11)									
34-B03 (Li12)									

TABELA 3B - Anticorpos Monoclonais de Sp35 (continuação)

FRAGMENTOS DE Fab MONOCLONAIS DERIVADOS DA BIBLIOTECA DE EXIBIÇÃO DE FAGO-2							
	FACs		Imunoprecipitação			Western	
	huSp35	mSp35	sp35Fc	huSp35	mSp35	huSp35	Sp35 de Camundongo/Rato
3383 (1)	+	-					
3495 (2)	+	-				sim	não
3563 (3)	+						
3564 (4)	+						
3565 (5)	+						
3566 (6)	+						
3567 (7)	+						
3568 (8)	+						
3569 (9)	+						
3570 (10)	+						
3571 (11)	+						
3582 (12)	+						
1968 (13)	+/-	-		++		fraco	não
3011	-			+/-			
3012	-			-			
3013	pegajoso			+			
3418	pegajoso						

Continuação

FRAGMENTOS DE Fab MONOCLONAIS DERIVADOS DA BIBLIOTECA DE EXIBIÇÃO DE FAGO-2							
	FACs		Imunoprecipitação			Western	
	huSp35	mSp35	sp35Fc	huSp35	mSp35	huSp35	Sp35 de Camundongo/Rato
3422	-						
3562	pegajoso						

TABELA 3B - Anticorpos Monoclonais de Sp35 (continuação)

FRAGMENTOS DE Fab MONOCLONAIIS DERIVADOS DA BIBLIOTECA DE EXIBIÇÃO DE FAGO-2									
	IHC em Células Transfectadas		IHC em Tecidos		ELISA				
	huSp35	mSp35	WT (parafina)	KO (parafina)	34-417	417- 493	419- 495	1-532	34-532
3383 (1)	N/A	N/A	sim	sim	sim			sim	
3495(2)	tênue	N/A	sim	sim			+/-	sim	sim
3563 (3)	não	não			sim			sim	
3564 (4)	não	não			sim			sim	
3565 (5)	não	não			sim			sim	
3566 (6)	sim	muito tênue	sim	sim			+/-	sim	sim
3567 (7)	sim	não	sim	sim			+/-	sim	sim
3568 (8)	não	não			sim			sim	
3569 (9)	não	não			sim			sim	
3570 (10)	não	não			sim			sim	
3571 (11)	não	não							
3582 (12)	não	não			sim			sim	
1968 (13)	muito tênue	sim c/ bg	sim	sim			+/-	sim	sim
3011	apenas coloração de pouquíssimas células	tênue							

Continuação

FRAGMENTOS DE Fab MONOCLONAIS DERIVADOS DA BIBLIOTECA DE EXIBIÇÃO DE FAGO-2									
	IHC em Células Transfectadas		IHC em Tecidos		ELISA				
	huSp35	mSp35	WT (parafina)	KO (parafina)	34- 417	417- 493	419- 495	1-532	34- 532
3012	não	não							
3013	sim c/ bg alto	sim							
3418	sim c/ bg alto	sim							
3422	muito tênue	sim c/ bg alto							
3562	não	não							

TABELA 3B - Anticorpos Monoclonais de Sp35 (continuação)

ANTICORPOS MONOCLONAIS COMPLETOS DERIVADOS DA BIBLIOTECA DE EXIBIÇÃO DE FAGO-1							
	FACs		Imunoprecipitação			Western	
	huSp35	mSp35	sp35Fc	huSp35	mSp35	huSp35	Sp35 de Camundongo/Rato
D05	++						
D07	+++						
D08	++						
D10	+++						
D11	+++						

ANTICORPOS MONOCLONAIS COMPLETOS DERIVADOS DA BIBLIOTECA DE EXIBIÇÃO DE FAGO-1									
	IHC em Células Transfectadas		IHC em Tecidos		ELISA				
	huSp35	mSp35	WT (parafina)	KO (parafina)	34-417	417-493	419-495	1-532	34-532
D05									
D07									
D08									
D10									
D11									

Legenda: huSp35 = proteína de Sp35 humano
 mSp35 = proteína de Sp35 de camundongo
 WT = tipo selvagem
 KO = sedação
 IHC = imunoistoquímica
 FACS = Classificação de Célula Ativada Fluorescente

TABELA 3C - Anticorpos Monoclonais de Sp35 Derivados de Híbrido

Anticorpo	espécies	subtipo		ELISA					FACS		IP		Homogeneizado de Cérebro de Rato
				hLIN GO-1	LRR	Ig	mLIN GO1	hLIN GO-2	hLING O-1	mLING O-1	hLING O-1	mLING O-1	
3B5.2 (ATCC: PTA-8106)	murino		mAb	+++	+	-	+++	-	+++	+++	+++	+++	
7P1D5.1G9 (ATCC: PTA-8107)	murino	IgG1/capa	Fab	+			+		+		+++	+++	
			mAb	++	+	-	+++	-	+++		+++	+++	sim

TABELA 3D

Anticorpo	Espécies	Subtipo		ELISA				
				hLINGO-1	LRR	Ig	mLINGO1	hLINGO-2
1A7	murino	IgG1/capa	Fab	+			+/-	
			mAb	+++	-	-	+/-	-
2F3	murino	IgG2a	Fab					
			mAb	++	++	-	++	+/-
3P1D10.2C3	murino	IgG1	mAb	+++	-	-	-	
3P1E11.3B7	murino	IgG1	mAb	+++	-	-	-	
6P4F4.1D3	murino	IgG1/capa	mAb	+++	+++	-	+++	-
6P4F4.1F9	murino	IgG1/capa	mAb	+++	+++	-	+++	-
7P1D5.1G9 (ATCC PTA-8107)	murino	IgG1/capa	Fab	+			+	
			mAb	++	+	-	+++	-
1B6.4	murino	IgG1/capa	mAb	+++	++	-	+++	-
2C7.2	murino	IgG1/capa	mAb	+++	++	-	+++	+
2D6.1	murino	IgG2a/cap a	mAb	-	-	-	-	-
2F7.3	murino	IgG1/capa	mAb	+++	-	-	+++	-
2H3.2	murino	IgG1/capa	mAb	+++	-	-	+++	-

59/278

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		ELISA				
				hLINGO-1	LRR	Ig	mLINGO1	hLINGO-2
3C11.1	murino	IgG1/capa	mAb	+++	-	-	+++	-
3E3.1	murino	IgG1/capa	mAb	+++	++	-	+++	-
3H11.2	murino	IgG1/capa	mAb	+++	-	-	+++	-
3G8.1	murino		mAb	+++	++	-	+++	-
2B8.1	murino		mAb	+++	++	-	+++	-
3B5.2 (ATCC: PTA-8106)	murino	IgG1/capa	mAb	+++	+	-	+++	-
3P3C10.2	murino		mAb	+++	+	-	+++	-
3P4F4.6	murino		mAb	+++	+	-	+++	-

60/278

TABELA 3D (continuação)

Anticorpo	Espécies	Subtipo		FACS em 293 células		FACS em CHO estável	
1A7	murino	IgG1/capa	Fab			1 nM	-
			mAb	+++	-	0,7 nM	-
2F3	murino	IgG2a	Fab	+/-	+/-		
			mAb				
3P1D10.2C3	murino	IgG1	mAb				
3P1E11.3B7	murino	IgG1	mAb				
6P4F4.1D3	murino	IgG1/capa	mAb				
6P4F4.1F9	murino	IgG1/capa	mAb				
7P1D5.1G9 (ATCC PTA-8107)	murino	IgG1/capa	Fab	+		(10,4) nM	3,7 nM
			mAb	+++		2,7 nM	1 nM
1B6.4	murino	IgG1/capa	mAb	+++	+++		
2C7.2	murino	IgG1/capa	mAb	+++	+++		
2D6.1	murino	IgG2a/capa	mAb	++(*)	++(*)	-	-
2F7.3	murino	IgG1/capa	mAb	++	++		
2H3.2	murino	IgG1/capa	mAb	++	++		
3C11.1	murino	IgG1/capa	mAb	++	++		
3E3.1	murino	IgG1/capa	mAb	+++	+++		

61/278

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		FACS em 293 células		FACS em CHO estável	
3H11.2	murino	IgG1/capa	mAb	++	++		
3G8.1	murino		mAb	+	+		
2B8.1	murino		mAb	++	++	5,4 nM	
3B5.2 (ATCC: PTA-8106)	murino	IgG1/capa	mAb	+++	+++	< 0,4 nM	0,4 nM
3P3C10.2	murino		mAb			5,1 nM	4,4 nM
3P4F4.6	murino		mAb			4,6 nM	6 nM

62/278

TABELA 3D (continuação)

Anticorpo	Espécies	Subtipo		ELISA			
				hLINGO-1	LRR	Ig	mLINGO1
30-C12 (Dli01)	humano	capa	Fab	++	+	-	
38-D01 (Dli02)	humano	lambda	Fab	+	-	-	
35-E04 (Dli03)	humano	capa	Fab	+++	+	-	+++
			Ab				
36-C09 (Dli04)	humano		Fab	+	-	-	
30-A11 (Dli05)	humano	lambda	Fab	+++	+(CG), ++(ZS)	-	+++
			Ab				
34-F02 (Dli06)	humano	capa	Fab	++	+(CG), +/- (ZS)	-	++
			Ab				
29-E07 (Dli07)	humano	lambda	Fab	++	+	+/-	
34-G04 (Dli08)	humano	capa	Fab	- (CG), ++ (ZS)	- (CG), +/- (ZS)	-	+
			Ab				
36-A12 (Dli09)	humano	capa	Fab	-	-	-	
28-D02 (Dli10)	humano	capa	Fab	++	-	-	
			Ab				

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		ELISA			
				hLINGO-1	LRR	Ig	mLINGO1
30-B01 (Dli11)	humano	capa	Fab	+++	+	-	
			Ab				
34-B03 (Dli12)	humano		Fab	++	+/-	-	
72-D03 (Dli13)	humano		Fab	++++	-	-	++++
			Ab				
73-C08 (Dli17)	humano		Fab	+++	-	-	+++
74-E08 (Dli21)	humano		Fab	+++	+	-	+++
75-H04 (Dli24)	humano		Fab	++++	-	-	++++
76-F10 (Dli28)	humano		Fab	++++	+	-	++++
79-G02 (Dli32)	humano		Fab	++++	+	-	++++
80-A08 (Dli33)	humano		Fab	++++	++	-	++++
			Ab				
80-D02 (Dli34)	humano		Fab	+++++	++	-	+++++
			Ab				
81-C01 (Dli36)	humano		Fab	++++	++	-	++++
74-D05 (Dli39)	humano		Fab	++++			++++
74-F02 (Dli40)	humano		Fab	++++			++++
75-B09 (Dli42)	humano		Fab	++++			++++

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		ELISA			
				hLINGO-1	LRR	Ig	mLINGO1
94-E07 (Dli54)	humano		Fab	++++			++++
98-B10 (Dli55)	humano		Fab	++++			+++
544L-M0054-E03(Dli62)	humano	IgG1Agly	Fab	++++			
			Ab				
544L-M0059-G09(Dli63)	humano		Fab	++++			
544L-M0063-G06(Dli64)	humano		Fab	++++			
544L-M0069-D12(Dli65)	humano		Fab	++++			
544L-M0070-H12(Dli67)	humano		Fab	++++			
544L-M0090-E09(Di73)	humano	IgG1Agly	Fab	++++			
			Ab				
544L-M0090-E12(Dli74)	humano		Fab	++++			

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		ELISA			
				hLINGO-1	LRR	Ig	mLINGO1
544L-M0090-F08(DIi75)	humano		Fab	++++			
544L-M0104-B01(DIi77)	humano		Fab	++++			
544L-M0120-E08(DIi81)	humano		Fab	++++			
		IgG1Agly	Ab	0,25 nM			0,27 nM

TABELA 3D (continuação)

Anticorpo	Espécies	Subtipo		FACS em 293 células		FACS em CHO estável	
				hLINGO-1	mLINGO-1	hLINGO1	mLINGO1
30-C12 (Dli01)	humano	capa	Fab				
38-D01 (Dli02)	humano	lambda	Fab				
35-E04 (Dli03)	humano	capa	Fab				
			Ab				
36-C09 (Dli04)	humano		Fab				
30-A11 (Dli05)	humano	lambda	Fab	+		22,8 nM sem adaptação	- 5,5 nM
			Ab	++			
34-F02 (Dli06)	humano	capa	Fab			21 nM 2,32 nM	>200 nM 26,6, nM
			Ab				
29-E07 (Dli07)	humano	lambda	Fab				
34-G04 (Dli08)	humano	capa	Fab	+/-		206 nM 3,3 nM	190 nM 18,6 nM
			Ab	++			
36-A12 (Dli09)	humano	capa	Fab				
28-D02 (Dli10)	humano	capa	Fab	+++		0,49 nM	>400 nM
			Ab				
30-B01 (Dli11)	humano	capa	Fab	++			
			Ab	+++			

67/278

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		FACS em 293 células		FACS em CHO estável	
				hLINGO-1	mLINGO-1	hLINGO1	mLINGO1
34-B03 (Dli12)	humano		Fab				
72-D03 (Dli13)	humano		Fab			0,74 nM, 3,2 (CG)	24,7 nM
			Ab				
73-C08 (Dli17)	humano		Fab				
74-E08 (Dli21)	humano		Fab				
75-H04 (Dli24)	humano		Fab				
76-F10 (Dli28)	humano		Fab				
79-G02 (Dli32)	humano		Fab				
80-A08 (Dli33)	humano		Fab			1,39 nM, 4 (CG)	sem adaptação
			Ab			0,208 nM para IgG2	
80-D02 (Dli34)	humano		Fab				
			Ab				
81-C01 (Dli36)	humano		Fab				
74-D05 (Dli39)	humano		Fab			7,6 nM (CG)	
74-F02 (Dli40)	humano		Fab			11 nM (CG)	
75-B09 (Dli42)	humano		Fab			28 nM (CG)	

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		FACS em 293 células		FACS em CHO estável	
				hLINGO-1	mLINGO-1	hLINGO1	mLINGO1
94-E07 (Dli54)	humano		Fab			33 nM (CG)	
98-B10 (Dli55)	humano		Fab			50 nM (CG)	
544L-M0054-E03(Dli62)	humano	IgG1Agly	Fab			0,261 nM	
			Ab				
544L-M0059-G09(Dli63)	humano		Fab				
544L-M0063-G06(Dli64)	humano		Fab				
544L-M0069-D12(Dli65)	humano		Fab				
544L-M0070-H12(Dli67)	humano		Fab				
544L-M0090-E09(Di73)	humano	IgG1Agly	Fab			0,12 nM	
			Ab				
544L-M0090-E12(Dli74)	humano		Fab				

69/278

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		FACS em 293 células		FACS em CHO estável	
				hLINGO-1	mLINGO-1	hLINGO1	mLINGO1
544L-M0090-F08(DIi75)	humano		Fab				
544L-M0104-B01(DIi77)	humano		Fab				
544L-M0120-E08(DIi81)	humano	IgG1Agly	Fab			0,156 nM	
			Ab				

TABELA 3E

Anticorpo	Espécies	Subtipo		IP				IHC	
				hLINGO-1	mLINGO-1	roedor endógeno	bloqueio	congelada	parafina
1A7	murino	IgG1/capa	Fab	+++ (U)	+/-				
			mAb	+++ (U)	+/-		sim		
2F3	murino	IgG2a	Fab						
			mAb	+++ (L)	+++ (L)	não	não	sim (fraca)	+++
3P1D10.2C3	murino	IgG1	mAb						
3P1E11.3B7	murino	IgG1	mAb						
6P4F4.1D3	murino	IgG1/capa	mAb	+++ (U)	+++				
6P4F4.1F9	murino	IgG1/capa	mAb	+++ (U)	+++				
7P1D5.1G9 (ATCC PTA-8107)	murino	IgG1/capa	Fab	+++ (U)	+++				
			mAb	+++ (U)	+++ (L)	sim	sim		

71/278

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		IP				IHC	
				hLINGO-1	mLINGO-1	roedor endógeno	bloqueio	congelada	parafina
1B6.4	murino	IgG1/capa	mAb	+++ (U)	+++ (L)	sim			
2C7.2	murino	IgG1/capa	mAb	+++ (U)	+++ (L)		sim		
2D6.1	murino	IgG2a/capa	mAb	-	-			não	
2F7.3	murino	IgG1/capa	mAb	+++ (L)	+++ (L)		não		
2H3.2	murino	IgG1/capa	mAb	+++ (L)	+++ (L)		não	não	
3C11.1	murino	IgG1/capa	mAb	+++ (L)	+++ (L)	sim (fraco)	não		
3E3.1	murino	IgG1/capa	mAb	+++ (U)	+++ (L)	sim	sim	não	
3H11.2	murino	IgG1/capa	mAb	+++ (L)	+++ (L)		não		

72/278

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		IP				IHC	
				hLINGO-1	mLINGO-1	roedor endógeno	bloqueio	congelada	parafina
3G8.1	murino		mAb	+++ (U)	+++		sim		
2B8.1	murino		mAb	+++ (U)	+ (L)		sim		
3B5.2 (ATCC: PTA/8106)	murino	IgG1/capa	mAb	+++ (U)	+++	sim	sim		
3P3C10.2	murino		mAb						
3P4F4.6	murino		mAb						
30-C12 (Dli01)	humano	capa	Fab	++	++				
38-D01 (Dli02)	humano	lambda	Fab	-/+	-/+				
35-E04 (Dli03)	humano	capa	Fab	++	+++	não		não	
			Ab						

73/278

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		IP				IHC	
				hLINGO-1	mLINGO-1	roedor endógeno	bloqueio	congelada	parafina
36-C09 (Dli04)	humano		Fab	-/+	-/+				
30-A11 (Dli05)	humano	lambda	Fab	++	++	sim			
			Ab	++ (U)	++ (L)				
34-F02 (Dli06)	humano	capa	Fab	++	++				
			Ab						
29-E07 (Dli07)	humano	lambda	Fab	++	++				
34-G04 (Dli08)	humano	capa	Fab	++	++				
			Ab	++ (U)	++ (L)				
36-A12 (Dli09)	humano	capa	Fab	-	-				

74/278

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		IP				IHC	
				hLINGO-1	mLINGO-1	roedor endógeno	bloqueio	congelad a	parafina
28-D02 (Dli10)	humano	capa	Fab Ab	-/+	+/-				
30-B01 (Dli11)	humano	capa	Fab Ab	++ (U)	++ (L)	sim			
								não	+
34-B03 (Dli12)	humano		Fab	+	+				
72-D03 (Dli13)	humano		Fab Ab	++ (U)	++ (L)	não			
									++
73-C08 (Dli17)	humano		Fab						
74-E08 (Dli21)	humano		Fab						

75/278

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		IP				IHC	
				hLINGO-1	mLINGO-1	roedor endógeno	bloqueio	congelada	parafina
75-H04 (Dli24)	humano		Fab						
76-F10 (Dli28)	humano		Fab						
79-G02 (Dli32)	humano		Fab						
80-A08 (Dli33)	humano		Fab	++ (banda mais superior)	++ (L)	sim (fraco)			
			Ab					+++	+
80-D02 (Dli34)	humano		Fab	++ (U)	++ (L)				
			Ab					+++	+++

76/278

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		IP				IHC	
				hLINGO-1	mLINGO-1	roedor endógeno	bloqueio	congelada	parafina
81-C01 (Dli36)	humano		Fab						
74-D05 (Dli39)	humano		Fab						
74-F02 (Dli40)	humano		Fab						
75-B09 (Dli42)	humano		Fab						
94-E07 (Dli54)	humano		Fab						
98-B10 (Dli55)	humano		Fab						
544L-M0054-E03(Dli62)	humano		Fab						
		IgG1Agly	Ab						

77/278

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		IP				IHC	
				hLINGO-1	mLINGO-1	roedor endógeno	bloqueio	congelada	parafina
544L-M0059-G09(DIi63)	humano		Fab						
544L-M0063-G06(DIi64)	humano		Fab						
544L-M0069-D12(DIi65)	humano		Fab						
544L-M0070-H12(DIi67)	humano		Fab						
544L-M0090-E09(Di73)	humano		Fab						
		IgG1Agly	Ab						

78/278

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		IP				IHC	
				hLINGO-1	mLINGO-1	roedor endógeno	bloqueio	congelada	parafina
544L-M0090-E12(Dli74)	humano		Fab						
544L-M0090-F08(Dli75)	humano		Fab						
544L-M0104-B01(Dli77)	humano		Fab						
544L-M0120-E08(Dli81)	humano		Fab						
		IgG1Agly	Ab	sim	sim	sim			

79/278

TABELA 3E (continuação)

Anticorpo	Espécies	Subtipo		Mielinação	Desenvolvimento	SCI	Esmagamento	Cuprizona	Lisolecitina
				em cocultura	de neurite		do nervo ótico		
1A7	murino	IgG1/capa	Fab	sim	sim	sim?	sim	sim	sim
			mAb						
2F3	murino	IgG2a	Fab	sim	sim	não			
			mAb						
3P1D10.2C3	murino	IgG1	mAb	sim/não					
3P1E11.3B7	murino	IgG1	mAb	sim/não					
6P4F4.1D3	murino	IgG1/capa	mAb	sim					
6P4F4.1F9	murino	IgG1/capa	mAb						
7P1D5.1G9 (ATCC PTA-8107)	murino	IgG1/capa	Fab	sim					sim
			mAb	sim					não?
1B6.4	murino	IgG1/capa	mAb	não					
2C7.2	murino	IgG1/capa	mAb	não					
2D6.1	murino	IgG2a/capa	mAb	sim					
2F7.3	murino	IgG1/capa	mAb	sim					
2H3.2	murino	IgG1/capa	mAb	não					

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		Mielinaçã o	Desenvolvi mento de neurite	SCI	Esmaga mento do nervo ótico	Cuprizon a	Lisolecitin a
				em cocultura					
3C11.1	murino	IgG1/capa	mAb	sim					
3E3.1	murino	IgG1/capa	mAb	não					
3H11.2	murino	IgG1/capa	mAb	não					
3G8.1	murino		mAb	não					
2B8.1	murino		mAb	sim					
3B5.2 (ATCC: PTA/8106)	murino	IgG1/capa	mAb	sim	sim	sim			
3P3C10.2	murino		mAb						
3P4F4.6	murino		mAb						
30-C12 (Dli01)	humano	capa	Fab						
38-D01 (Dli02)	humano	lambda	Fab						
35-E04 (Dli03)	humano	capa	Fab Ab						
36-C09 (Dli04)	humano		Fab						
30-A11 (Dli05)	humano	lambda	Fab Ab	sim sim					sim sim

81/278

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		Mielinaçã o	Desenvolvi mento de neurite	SCI	Esmaga mento do nervo ótico	Cuprizon a	Lisolecitin a
				em cocultura					
34-F02 (Dli06)	humano	capa	Fab Ab	sim sim					
29-E07 (Dli07)	humano	lambda	Fab						
34-G04 (Dli08)	humano	capa	Fab Ab	sim sim					sim sim/não
36-A12 (Dli09)	humano	capa	Fab						
28-D02 (Dli10)	humano	capa	Fab Ab						
30-B01 (Dli11)	humano	capa	Fab Ab	não					
34-B03 (Dli12)	humano		Fab						
72-D03 (Dli13)	humano		Fab Ab	sim					sim

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		Mielinação o	Desenvolvimento de neurite	SCI	Esmagamento do nervo ótico	Cuprizona	Lisolecitina
				em cocultura					
73-C08 (Dli17)	humano		Fab						
74-E08 (Dli21)	humano		Fab						
75-H04 (Dli24)	humano		Fab	não					
76-F10 (Dli28)	humano		Fab	sim					
79-G02 (Dli32)	humano		Fab						
80-A08 (Dli33)	humano		Fab Ab	sim					sim sim
80-D02 (Dli34)	humano		Fab Ab	não					
81-C01 (Dli36)	humano		Fab	não					
74-D05 (Dli39)	humano		Fab						
74-F02 (Dli40)	humano		Fab						
75-B09 (Dli42)	humano		Fab						
94-E07 (Dli54)	humano		Fab						
98-B10 (Dli55)	humano		Fab						

83/278

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		Mielinaçã o	Desenvolvi mento de neurite	SCI	Esmaga mento do nervo ótico	Cuprizon a	Lisolecitin a
				em cocultura					
544L-M0054- E03(Dli62)	humano		Fab	sim					
		IgG1Agly	Ab	sim					
544L-M0059- G09(Dli63)	humano		Fab	não					
544L-M0063- G06(Dli64)	humano		Fab	não					
544L-M0069- D12(Dli65)	humano		Fab	sim					
544L-M0070- H12(Dli67)	humano		Fab	sim					
544L-M0090- E09(Di73)	humano		Fab	sim					
		IgG1Agly	Ab	sim					

Continuação

Anticorpo	Espécies	Subtipo		Mielinação	Desenvolvimento de neurite	SCI	Esmagamento do nervo ótico	Cuprizona	Lisolecitina
				em cocultura					
544L-M0090-E12(Dli74)	humano		Fab	não					
544L-M0090-F08(Dli75)	humano		Fab	não					
544L-M0104-B01(Dli77)	humano		Fab	sim					
544L-M0120-E08(Dli81)	humano		Fab	sim					
		IgG1Agly	Ab	sim					

85/278

[00105] Como aqui usado, o termo "domínio de ligação de antígeno" inclui um sítio que especificamente liga um epítipo em um antígeno (por exemplo, um epítipo de Sp35). O domínio de ligação de antígeno de um anticorpo tipicamente inclui pelo menos uma porção de uma região variável de cadeia pesada da imunoglobulina e pelo menos uma porção de uma região variável de cadeia leve da imunoglobulina. O sítio de ligação formado por estas regiões variáveis determina a especificidade do anticorpo.

[00106] A presente invenção mais especificamente é direcionada a um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante ou derivados do mesmo, onde o anticorpo de Sp35 se liga ao mesmo epítipo como um anticorpo monoclonal selecionado do grupo que consiste em 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), 1968 (L1a.13), 7P1D5.1G9, 3B5.2 e Li81.

[00107] A invenção é também estendida a um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante ou derivados do mesmo, onde o anticorpo de Sp35 competitivamente inibe um anticorpo monoclonal selecionado do grupo que consiste em 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33,

Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), 1968 (L1a.13), 7P1D5.1G9, 3B5.2 e Li81 de se ligar a Sp35.

[00108] A invenção é também estendida a um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante ou derivados do mesmo, onde o anticorpo de Sp35 compreende pelo menos a região de ligação de antígeno de um anticorpo monoclonal selecionado do grupo que consiste em 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), 1968 (L1a.13), 7P1D5.1G9, 3B5.2 e Li81.

[00109] No dia 27 de dezembro de 2006, os hibridomas a seguir foram depositados com a American Type Culture Collection (ATCC) em Manassas, VA: 2.P3B5.2 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8106), 7.P1D5.1.G9 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8107). O hibridoma 2.P3B5.2 depositado produz o anticorpo monoclonal 3B5.2, descrito aqui e o hibridoma 7.P1D5.1.G9 depositado produz o anticorpo monoclinal 7P1D5.1.G9, descrito aqui. Os hibridomas podem ser cultivados de acordo com métodos bem-conhecidos na técnica e podem ser descritos aqui.

[00110] Em certas modalidades, a presente invenção é direcionada a um anticorpo, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo que específica ou preferencialmente liga a um fragmento ou domínio de polipeptídeo de Sp35 particular. Tais

fragmentos de polipeptídeo de Sp35 incluem, mas não são limitados a, um polipeptídeo de Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nos aminoácidos 34 a 532; 34 a 417; 34 a 425; 34 a 493; 66 a 532; 66 a 417; 66 a 426; 66 a 493; 66 a 532; 417 a 532; 417 a 425 (a região básica de Sp35); 417 a 493; 417 a 532; 419 a 493 (a região de Ig de Sp35); ou 425 a 532 da SEQ ID NO: 2; ou um polipeptídeo de Sp35 variante pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% idêntico aos aminoácidos 34 a 532; 34 a 417; 34 a 425; 34 a 493; 66 a 532; 66 a 417; 66 a 426; 66 a 493; 66 a 532; 417 a 532; 417 a 425 (a região básica de Sp35); 417 a 493; 417 a 532; 419 a 493 (a região de Ig de Sp35); ou 425 a 532 da SEQ ID NO: 2.

[00111] Fragmentos de peptídeo de Sp35 adicionais aos quais certos anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da presente invenção se ligam incluem, mas não são limitados àqueles fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma ou mais repetições ricas em leucina (LRR) de Sp35. Tais fragmentos incluem, por exemplo, fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nos aminoácidos 66 a 89; 66 a 113; 66 a 137; 90 a 113; 114 a 137; 138 a 161; 162 a 185; 186 a 209; 210 a 233; 234 a 257; 258 a 281; 282 a 305; 306 a 329; ou 330 a 353 da SEQ ID NO: 2. Fragmentos correspondentes de um polipeptídeo de Sp35 variante pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% idêntico aos aminoácidos 66 a 89; 66 a 113; 90 a 113; 114 a 137; 138 a 161; 162 a 185; 186 a 209; 210 a 233; 234 a 257; 258 a 281; 282 a 305; 306 a 329; ou 330 a 353 da SEQ ID NO: 2 são também contemplados.

[00112] Fragmentos de peptídeo de Sp35 adicionais aos quais certos anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da presente invenção se ligam incluem, mas não são limitados àqueles fragmentos compreendendo, consistindo

essencialmente em, ou consistindo em uma ou mais regiões ricas em cisteína flanqueando o LRR de Sp35. Tais fragmentos incluem, por exemplo, um fragmento compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nos aminoácidos 34 a 64 da SEQ ID NO: 2 (a região de flanqueamento de LRR N-terminal (LRRNT)), ou um fragmento compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nos aminoácidos 363 a 416 da SEQ ID NO: 2 (a região de flanqueamento de LRR C-terminal (LRRCT)), aminoácidos. Fragmentos correspondentes de um polipeptídeo de Sp35 variante pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% idênticos aos aminoácidos 34 a 64 e 363 a 416 da SEQ ID NO: 2 são também contemplados.

[00113] Como conhecido na técnica, "identidade de sequência" entre dois polipeptídeos é determinada comparando a sequência de aminoácido de um polipeptídeo à sequência de um segundo polipeptídeo. Quando debatido aqui, se qualquer polipeptídeo particular for pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% idêntico a outro polipeptídeo, pode ser determinado usando métodos e programas de computador/software conhecidos na técnica tais como, mas não-limitados a, o programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versão 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). BESTFIT usa o algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981), para encontrar o melhor segmento de homologia entre duas sequências. Quando usar BESTFIT ou qualquer outro programa de alinhamento de sequência para determinar se uma sequência particular é, por exemplo, 95% idêntica a uma sequência de referência de acordo com a presente invenção, os parâmetros são ajustados, claro, de modo que a porcentagem de identidade é calculada no comprimento total da sequência de polipeptídeo de referência e aqueles intervalos na homologia de até 5%

do número total de aminoácidos na sequência de referência são permitidos.

[00114] Fragmentos de peptídeo de Sp35 adicionais aos quais certos anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da presente invenção se ligam incluem, mas não são limitados àqueles fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nos aminoácidos 41 a 525 da SEQ ID NO: 2; 40 a 526 da SEQ ID NO: 2; 39 a 527 da SEQ ID NO: 2; 38 a 528 da SEQ ID NO: 2; 37 a 529 da SEQ ID NO: 2; 36 a 530 da SEQ ID NO: 2; 35 a 531 da SEQ ID NO: 2; 34 a 531 da SEQ ID NO: 2; 46 a 520 da SEQ ID NO: 2; 45 a 521 da SEQ ID NO: 2; 44 a 522 da SEQ ID NO: 2; 43 a 523 da SEQ ID NO: 2; e 42 a 524 da SEQ ID NO: 2.

[00115] Ainda fragmentos de peptídeo de Sp35 adicionais aos quais certos anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da presente invenção se ligam incluem, mas não são limitados àqueles fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nos aminoácidos 1 a 33 da SEQ ID NO: 2; 1 a 35 da SEQ ID NO: 2; 34 a 64 da SEQ ID NO: 2; 36 a 64 da SEQ ID NO: 2; 66 a 89 da SEQ ID NO: 2; 90 a 113 da SEQ ID NO: 2; 114 a 137 da SEQ ID NO: 2; 138 a 161 da SEQ ID NO: 2; 162 a 185 da SEQ ID NO: 2; 186 a 209 da SEQ ID NO: 2; 210 a 233 da SEQ ID NO: 2; 234 a 257 da SEQ ID NO: 2; 258 a 281 da SEQ ID NO: 2; 282 a 305 da SEQ ID NO: 2; 306 a 329 da SEQ ID NO: 2; 330 a 353 da SEQ ID NO: 2; 363 a 416 da SEQ ID NO: 2; 417 a 424 da SEQ ID NO: 2; 419 a 493 da SEQ ID NO: 2; e 494 a 551 da SEQ ID NO: 2.

[00116] Ainda também, fragmentos de peptídeo de Sp35 aos quais certos anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da presente invenção se ligam incluem, mas não são limitados àqueles fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nos aminoácidos 1 a 33 da SEQ ID

NO: 2; 1 a 35 da SEQ ID NO: 2; 1 a 64 da SEQ ID NO: 2; 1 a 89 da SEQ ID NO: 2; 1 a 113 da SEQ ID NO: 2; 1 a 137 da SEQ ID NO: 2; 1 a 161 da SEQ ID NO: 2; 1 a 185 da SEQ ID NO: 2; 1 a 209 da SEQ ID NO: 2; 1 a 233 da SEQ ID NO: 2; 1 a 257 da SEQ ID NO: 2; 1 a 281 da SEQ ID NO: 2; 1 a 305 da SEQ ID NO: 2; 1 a 329 da SEQ ID NO: 2; 1 a 353 da SEQ ID NO: 2; 1 a 416 da SEQ ID NO: 2; 1 a 424 da SEQ ID NO: 2; 1 a 493 da SEQ ID NO: 2; 1 a 551 da SEQ ID NO: 2; 1 a 531 da SEQ ID NO: 2 e 1 a 532 da SEQ ID NO: 2.

[00117] Fragmentos de peptídeo de Sp35 adicionais aos quais certos anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da presente invenção se ligam incluem, mas não são limitados àqueles fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nos aminoácidos 34 a 64 da SEQ ID NO: 2; 34 a 89 da SEQ ID NO: 2; 34 a 113 da SEQ ID NO: 2; 34 a 137 da SEQ ID NO: 2; 34 a 161 da SEQ ID NO: 2; 34 a 185 da SEQ ID NO: 2; 34 a 209 da SEQ ID NO: 2; 34 a 233 da SEQ ID NO: 2; 34 a 257 da SEQ ID NO: 2; 34 a 281 da SEQ ID NO: 2; 34 a 305 da SEQ ID NO: 2; 34 a 329 da SEQ ID NO: 2; 34 a 353 da SEQ ID NO: 2; 34 a 416 da SEQ ID NO: 2; 34 a 424 da SEQ ID NO: 2; 34 a 493 da SEQ ID NO: 2; e 34 a 551 da SEQ ID NO: 2.

[00118] Ainda, fragmentos de peptídeo de Sp35 adicionais aos quais certos anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da presente invenção se ligam incluem, mas não são limitados àqueles fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nos aminoácidos 34 a 530 da SEQ ID NO: 2; 34 a 531 da SEQ ID NO: 2; 34 a 532 da SEQ ID NO: 2; 34 a 533 da SEQ ID NO: 2; 34 a 534 da SEQ ID NO: 2; 34 a 535 da SEQ ID NO: 2; 34 a 536 da SEQ ID NO: 2; 34 a 537 da SEQ ID NO: 2; 34 a 538 da SEQ ID NO: 2; 34 a 539 da SEQ ID NO: 2; 30 a 532 da SEQ ID NO: 2; 31 a 532 da SEQ ID NO: 2; 32 a 532 da SEQ ID NO: 2; 33 a 532 da

SEQ ID NO: 2; 34 a 532 da SEQ ID NO: 2; 35 a 532 da SEQ ID NO: 2; 36 a 532 da SEQ ID NO: 2; 30 a 531 da SEQ ID NO: 2; 31 a 531 da SEQ ID NO: 2; 32 a 531 da SEQ ID NO: 2; 33 a 531 da SEQ ID NO: 2; 34 a 531 da SEQ ID NO: 2; 35 a 531 da SEQ ID NO: 2; e 36 a 531 da SEQ ID NO: 2.

[00119] Ainda também, fragmentos de peptídeo de Sp35 aos quais certos anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da presente invenção se ligam incluem, mas não são limitados àqueles fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nos aminoácidos 36 a 64 da SEQ ID NO: 2; 36 a 89 da SEQ ID NO: 2; 36 a 113 da SEQ ID NO: 2; 36 a 137 da SEQ ID NO: 2; 36 a 161 da SEQ ID NO: 2; 36 a 185 da SEQ ID NO: 2; 36 a 209 da SEQ ID NO: 2; 36 a 233 da SEQ ID NO: 2; 36 a 257 da SEQ ID NO: 2; 36 a 281 da SEQ ID NO: 2; 36 a 305 da SEQ ID NO: 2; 36 a 329 da SEQ ID NO: 2; 36 a 353 da SEQ ID NO: 2; 36 a 416 da SEQ ID NO: 2; 36 a 424 da SEQ ID NO: 2; 36 a 493 da SEQ ID NO: 2; e 36 a 551 da SEQ ID NO: 2.

[00120] Fragmentos de peptídeo de Sp35 adicionais aos quais certos anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da presente invenção se ligam incluem, mas não são limitados àqueles fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nos aminoácidos 36 a 530 da SEQ ID NO: 2; 36 a 531 da SEQ ID NO: 2; 36 a 532 da SEQ ID NO: 2; 36 a 533 da SEQ ID NO: 2; 36 a 534 da SEQ ID NO: 2; 36 a 535 da SEQ ID NO: 2; 36 a 536 da SEQ ID NO: 2; 36 a 537 da SEQ ID NO: 2; 36 a 538 da SEQ ID NO: 2; e 36 a 539 da SEQ ID NO: 2.

[00121] Mais fragmentos de peptídeo de Sp35 aos quais certos anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da presente invenção se ligam incluem, mas não são limitados àqueles fragmentos compreendendo, consistindo

essencialmente em, ou consistindo nos aminoácidos 417 a 493 da SEQ ID NO: 2; 417 a 494 da SEQ ID NO: 2; 417 a 495 da SEQ ID NO: 2; 417 a 496 da SEQ ID NO: 2; 417 a 497 da SEQ ID NO: 2; 417 a 498 da SEQ ID NO: 2; 417 a 499 da SEQ ID NO: 2; 417 a 500 da SEQ ID NO: 2; 417 a 492 da SEQ ID NO: 2; 417 a 491 da SEQ ID NO: 2; 412 a 493 da SEQ ID NO: 2; 413 a 493 da SEQ ID NO: 2; 414 a 493 da SEQ ID NO: 2; 415 a 493 da SEQ ID NO: 2; 416 a 493 da SEQ ID NO: 2; 411 a 493 da SEQ ID NO: 2; 410 a 493 da SEQ ID NO: 2; 410 a 494 da SEQ ID NO: 2; 411 a 494 da SEQ ID NO: 2; 412 a 494 da SEQ ID NO: 2; 413 a 494 da SEQ ID NO: 2; 414 a 494 da SEQ ID NO: 2; 415 a 494 da SEQ ID NO: 2; 416 a 494 da SEQ ID NO: 2; 417 a 494 da SEQ ID NO: 2; e 418 a 494 da SEQ ID NO: 2.

[00122] Em uma modalidade adicional fragmentos de peptídeo de Sp35 aos quais certos anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da presente invenção se ligam incluem, um polipeptídeo de Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em peptídeos do domínio de Ig de Sp35 ou fragmentos, variantes, ou derivados de tais polipeptídeos. Especificamente, polipeptídeos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nas sequências de polipeptídeo a seguir: ITX1X2X3 (SEQ ID NO: 287), ACX1X2X3 (SEQ ID NO: 288), VCX1X2X3 (SEQ ID NO: 289) e SPX1X2X3 (SEQ ID NO: 290) onde X1 é lisina, arginina, histidina, glutamina, ou asparagina, X2 é lisina, arginina, histidina, glutamina, ou asparagina e X3 é lisina, arginina, histidina, glutamina, ou asparagina. Por exemplo, fragmentos de peptídeo de Sp35 aos quais certos anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da presente invenção se ligam incluem, aqueles fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nas sequências de polipeptídeo a seguir: SPRKH (SEQ ID NO: 291), SPRKK (SEQ ID NO: 292), SPRKR

(SEQ ID NO: 293), SPKKH (SEQ ID NO: 294), SPHKH (SEQ ID NO: 295), SPRRH (SEQ ID NO: 296), SPRHH (SEQ ID NO: 297), SPRRR (SEQ ID NO: 298), SPHHH (SEQ ID NO: 299) SPKKK (SEQ ID NO: 300), LSPRKH (SEQ ID NO: 301), LSPRKK (SEQ ID NO: 302), LSPRKR (SEQ ID NO: 303), LSPKKH (SEQ ID NO: 304), LSPHKH (SEQ ID NO: 305), LSPRRH (SEQ ID NO: 306), LSPRHH (SEQ ID NO: 307), LSPRRR (SEQ ID NO: 308), LSPHHH (SEQ ID NO: 309) LSPKKK (SEQ ID NO: 310), WLSPRKH (SEQ ID NO: 311), WLSPRKK (SEQ ID NO: 312), WLSPRKR (SEQ ID NO: 313), WLSPKKH (SEQ ID NO: 314), WLSPHKH (SEQ ID NO: 315), WLSPRRH (SEQ ID NO: 316), WLSPRHH (SEQ ID NO: 317), WLSPRRR (SEQ ID NO: 318), WLSPHHH (SEQ ID NO: 319) WLSPKKK (SEQ ID NO: 320). Estes polipeptídeos de Sp35 incluem a "alça de RKH" básica (aminoácidos de arginina-lisina-histidina 456-458) no domínio de Ig de Sp35. Peptídeos de Sp35 adicionais que incluem um tripeptídeo básico são ITPKRR (SEQ ID NO: 321), ACHHK (SEQ ID NO: 322) e VCHHK (SEQ ID NO: 323).

[00123] Fragmentos de peptídeo de Sp35 adicionais aos quais certos anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da presente invenção se ligam incluem, um polipeptídeo de Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em peptídeos do domínio de Ig de Sp35 ou fragmentos, variantes, ou derivados de tais polipeptídeos. Especificamente, peptídeos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nas sequências de polipeptídeo a seguir: X4X5RKH (SEQ ID NO: 324), X4X5RRR (SEQ ID NO: 325), X4X5KKK (SEQ ID NO: 326), X4X5HHH (SEQ ID NO: 327), X4X5RKK (SEQ ID NO: 328), X4X5RKR (SEQ ID NO: 329), X4X5KKH (SEQ ID NO: 330), X4X5HKH (SEQ ID NO: 331), X4X5RRH (SEQ ID NO: 332) e X4X5RHH (SEQ ID NO: 333) onde X4 é qualquer aminoácido e X5 é qualquer aminoácido.

[00124] Em outras modalidades fragmentos de peptídeo de Sp35 aos quais certos anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da presente invenção se ligam incluem, um polipeptídeo de Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em peptídeos do domínio de Ig de Sp35 ou fragmentos, variantes, ou derivados de tais polipeptídeos. Especificamente, polipeptídeos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nas sequências de polipeptídeo a seguir: ITX6X7X8 (SEQ ID NO: 334), ACX6X7X8 (SEQ ID NO: 335), VCX6X7X8 (SEQ ID NO: 336) e SPX6X7X8 (SEQ ID NO: 337) onde X6 é lisina, arginina, histidina, glutamina, ou asparagina, X7 é qualquer aminoácido e X8 é lisina, arginina, histidina, glutamina, ou asparagina. Por exemplo, um polipeptídeo compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo na sequência de polipeptídeo a seguir: SPRLH (SEQ ID NO: 338).

[00125] Fragmentos de peptídeo de Sp35 aos quais certos anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da presente invenção se ligam incluem, um polipeptídeo de Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em peptídeos contendo aminoácidos 452-458 no domínio de Ig de Sp35, ou derivados dos mesmos, em que aminoácido 452 é um resíduo de triptofano ou de fenilalanina.

[00126] Fragmentos de peptídeo de Sp35 adicionais aos quais certos anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da presente invenção se ligam incluem, um polipeptídeo de Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em peptídeos do domínio básico de Sp35. Especificamente, peptídeos compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo nas sequências de polipeptídeo a seguir: RRARIRDRK (SEQ ID NO: 339), KKVKEKEKR (SEQ ID NO:

340), RRLRLRDRK (SEQ ID NO: 341), RRGRGRDRK (SEQ ID NO: 342) e RRIRARDRK (SEQ ID NO: 343).

[00127] Polipeptídeos de Sp35 solúveis exemplares adicionais e métodos e materiais para obter estas moléculas podem ser encontrados para produzir anticorpos ou fragmentos de anticorpos da presente invenção, por exemplo, no Pedido de Patente Internacional PCT/US2004/008323, incorporado aqui por referência em sua totalidade.

[00128] Métodos de fazer anticorpos são bem-conhecidos na técnica e descritos aqui. Uma vez anticorpos para vários fragmentos de, ou para o Sp35 de comprimento total sem a sequência sinal, foram produzidos, determinar que aminoácidos, ou epitopo, de Sp35 ao(s) qual(is) o anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno se liga pode ser determinado por protocolos de mapeamento de epitopo como descritos aqui como também métodos conhecidos na técnica (por exemplo, ELISA intercalada de anticorpo duplo como descrito no "Capítulo 11 - Imunologia", Current Protocols in Molecular Biology, Ed. Ausubel et al., v. 2, John Wiley & Sons, Inc. (1996)). Protocolos de mapeamento de epitopo adicionais podem ser encontrados em Morris, G., Epitope Mapping Protocols, Nova Jersey: Human Press (1996) que são ambos incorporados aqui por referência em suas totalidades. Mapeamento de epitopo pode também ser executado por meios comercialmente disponíveis (isto é, ProtoPROBE, Inc. (Milwaukee, Wisconsin)).

[00129] Adicionalmente, anticorpos produzidos que se liga a qualquer porção de Sp35 podem ser depois triados para sua capacidade de agir como antagonista de Sp35 e desse modo promover desenvolvimento de neurite, sobrevivência, proliferação e diferenciação neuronal e de oligodendrócitos como também promover mielinização. Anticorpos podem ser triados para sobrevivência de oligodendrócitos/neuronal usando o método como descrito nos

Exemplos 10 e 11. Adicionalmente, anticorpos podem ser triados para sua habilidade para promover mielinização usando o método do Exemplo 9. Por fim, anticorpos podem ser triados para sua habilidade de promover proliferação e diferenciação de oligodendrócitos, como também desenvolvimento de neurite usando o método como descrito no Exemplo 7. Outras funções de antagonista de anticorpos da presente invenção podem ser testadas usando outros ensaios como descrito nos Exemplos aqui.

[00130] Em outras modalidades, a presente invenção inclui um anticorpo, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo que específica ou preferencialmente se liga pelo menos um epitopo de Sp35 onde o epitopo compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em pelo menos cerca de quatro a cinco aminoácidos da SEQ ID NO: 2, pelo menos sete, pelo menos nove, ou entre pelo menos cerca de 15 a cerca de 30 aminoácidos da SEQ ID NO: 2. Os aminoácidos de um epitopo dado da SEQ ID NO: 2 como descritos podem ser, mas não necessariamente, contíguos ou lineares. Em certas modalidades, o pelo menos um epitopo de Sp35 compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em um epitopo não-linear formado pelo domínio extracelular de Sp35 como expresso na superfície de uma célula ou como um fragmento solúvel, por exemplo, fundido em uma região de Fc de IgG. Desse modo, em certas modalidades o pelo menos um epitopo de Sp35 compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 25, entre cerca de 15 a cerca de 30, ou pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, ou 100 aminoácidos contíguos ou não-contíguos da SEQ ID NO: 2 onde os aminoácidos não-contíguos formam um epitopo através do dobramento da proteína.

[00131] Em outras modalidades, a presente invenção inclui um anticorpo, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo que especifica ou preferencialmente se liga pelo menos um epitopo de Sp35 onde o epitopo compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em, além de um, dois, três, quatro, cinco, seis ou mais aminoácidos contíguos ou não-contíguos da SEQ ID NO: 2 como descritos acima, e uma metade adicional que modifica a proteína, por exemplo, uma metade de carboidrato pode ser incluída de modo que o anticorpo de Sp35 se liga com afinidade mais alta à proteína-alvo modificada que com uma versão inalterada da proteína. Alternativamente, o anticorpo de Sp35 de modo algum se liga à versão inalterada da proteína-alvo.

[00132] Em certos aspectos, a presente invenção é direcionada a um anticorpo, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo que especificamente se liga a um polipeptídeo de Sp35 ou fragmento do mesmo, ou um polipeptídeo de Sp35 variante, com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação (KD) que é menos que a KD para o dito anticorpo monoclonal de referência.

[00133] Em certas modalidades, um anticorpo, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo da invenção especificamente se liga a pelo menos um epitopo de Sp35 ou fragmento ou variante descrito acima, isto é, se liga a um tal epitopo mais facilmente que ligaria a um epitopo não relacionado, ou aleatório; se liga preferencialmente a pelo menos um epitopo de Sp35 ou fragmento ou variante descrito acima, isto é, se liga a um tal epitopo mais facilmente que ligaria a um epitopo relacionado, similar, homólogo, ou análogo; competitivamente inibe ligação de um anticorpo de referência que especifica ou preferencialmente se liga a um certo epitopo de Sp35 ou fragmento ou variante descrito acima; ou liga pelo menos um epitopo de Sp35 ou fragmento ou variante descrito acima com uma afinidade

caracterizada por uma constante de dissociação K_D de menos que cerca de 5×10^{-2} M, cerca de 10^{-2} M, cerca de 5×10^{-3} M, cerca de 10^{-3} M, cerca de 5×10^{-4} M, cerca de 10^{-4} M, cerca de 5×10^{-5} M, cerca de 10^{-5} M, cerca de 5×10^{-6} M, cerca de 10^{-6} M, cerca de 5×10^{-7} M, cerca de 10^{-7} M, cerca de 5×10^{-8} M, cerca de 10^{-8} M, cerca de 5×10^{-9} M, cerca de 10^{-9} M, cerca de 5×10^{-10} M, cerca de 10^{-10} M, cerca de 5×10^{-11} M, cerca de 10^{-11} M, cerca de 5×10^{-12} M, cerca de 10^{-12} M, cerca de 5×10^{-13} M, cerca de 10^{-13} M, cerca de 5×10^{-14} M, cerca de 10^{-14} M, cerca de 5×10^{-15} M, ou cerca de 10^{-15} M. Em um aspecto particular, o anticorpo ou fragmento do mesmo preferencialmente se liga a um polipeptídeo de Sp35 humano ou fragmento do mesmo, com relação a um polipeptídeo de Sp35 murino ou fragmento do mesmo.

[00134] Como usado no contexto de constantes de dissociação de ligação de anticorpo, o termo "cerca de" permite o grau de variação inerente nos métodos utilizados para medir afinidade de anticorpo. Por exemplo, dependendo do nível de precisão da instrumentação usada, erro padrão com base no número de amostras medidas, e erro de arredondamento, o termo "cerca de 10^{-2} M" poderia incluir, por exemplo, de 0,05 M a 0,005 M.

[00135] Em modalidades específicas, um anticorpo, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo da invenção liga polipeptídeos de Sp35 ou fragmentos ou variantes dos mesmos com uma taxa de dissociação (k_{off}) menor ou igual a $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ou 10^{-3} s^{-1} . Alternativamente, um anticorpo, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo da invenção liga polipeptídeos de Sp35 ou fragmentos ou variantes dos mesmos com uma taxa de dissociação (k_{off}) menor ou igual a $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, ou 10^{-5} s^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ou 10^{-7} s^{-1} .

[00136] Em outras modalidades, um anticorpo, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo da invenção liga polipeptídeos de Sp35 ou fragmentos ou variantes dos mesmos com uma taxa associação ($k(\text{associação})$) maior ou igual a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ou $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Alternativamente, um anticorpo, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo da invenção liga polipeptídeos de Sp35 ou fragmentos ou variantes dos mesmos com uma taxa associação ($k(\text{associação})$) maior ou igual a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ou $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ou $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

[00137] Em várias modalidades, um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo como descrito aqui é antagonista da atividade de Sp35. Em certas modalidades, por exemplo, ligação de um anticorpo de Sp35 de antagonista a Sp35, conforme expresso em neurônios, bloqueia inibição associada à mielina do desenvolvimento de neurite ou morte de célula neuronal. Em outras modalidades, ligação do anticorpo de Sp35 a Sp35, como expresso em oligodendrócitos, bloqueia a inibição do crescimento ou diferenciação de oligodendrócitos, ou bloqueia desmielinização ou dismielinização dos neurônios do SNC.

[00138] A menos que seja especificamente observado, como aqui usado um "fragmento do mesmo" em referência a um anticorpo refere-se a um fragmento de ligação de antígeno, isto é, uma porção do anticorpo que especificamente liga ao antígeno. Em uma modalidade, um anticorpo de Sp35, por exemplo, um anticorpo da invenção é um anticorpo de Sp35 biespecífico, polipeptídeo de ligação, ou anticorpo, por exemplo, um anticorpo biespecífico, minicorpo, anticorpo com domínio excluído, ou proteína de fusão tendo especificidade de ligação para mais de um epítipo, por exemplo, mais de um antígeno ou mais de um epítipo no mesmo antígeno. Em uma modalidade, um anticorpo

de Sp35 biespecífico, polipeptídeo de ligação, ou anticorpo tem pelo menos um domínio de ligação específico para pelo menos um epitopo em um polipeptídeo-alvo descrito aqui, por exemplo, Sp35. Em outra modalidade, um anticorpo de Sp35 biespecífico, polipeptídeo de ligação, ou anticorpo tem pelo menos um domínio de ligação específico para um epitopo em um polipeptídeo-alvo e pelo menos um domínio de ligação-alvo específico para um fármaco ou toxina. Em ainda outra modalidade, um anticorpo de Sp35 biespecífico, polipeptídeo de ligação, ou anticorpo tem pelo menos um domínio de ligação específico para um epitopo em um polipeptídeo-alvo descrito aqui, e pelo menos um domínio de ligação específico para um profármaco. Um anticorpo de Sp35 biespecífico, polipeptídeo de ligação, ou anticorpo pode ser um anticorpo tetravalente tendo dois domínios de ligação-alvos específicos para um epitopo de um polipeptídeo-alvo descrito aqui e dois domínios de ligação-alvos específicos para um segundo alvo. Desse modo, um anticorpo de Sp35 biespecífico tetravalente, polipeptídeo de ligação, ou anticorpo pode ser bivalente para cada especificidade.

[00139] Anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção, como conhecidos por aqueles versados na técnica, podem compreender uma região constante que medeia uma ou mais funções efetoras. Por exemplo, ligação do componente C1 do complemento a uma região constante de anticorpo pode ativar o sistema do complemento. Ativação do complemento é importante na opsonização e lise dos patógenos celulares. A ativação do complemento também estimula a resposta inflamatória e pode também estar envolvida na hipersensibilidade autoimune. Também, os anticorpos se ligam aos receptores em várias células por meio da região de Fc, com um sítio de ligação do receptor Fc na região de Fc de anticorpo que liga a um receptor Fc (FcR) em uma célula. Há vários receptores Fc que são específicos para classes

diferentes de anticorpo, incluindo IgG (receptores gama), IgE (receptores epsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). Ligação do anticorpo aos receptores Fc nas superfícies celulares desencadeia várias respostas biológicas importantes e diversas incluindo englobamento e destruição das partículas revestidas com anticorpo, liberação dos complexos imunes, lise de células-alvos revestidas com anticorpo através de células assassinas (chamadas citotoxicidade mediada por célula anticorpo-dependente, ou ADCC), liberação de mediadores inflamatórios, transferência placentária e controle de produção de imunoglobulina.

[00140] Consequentemente, certas modalidades da invenção incluem um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo em que pelo menos uma fração de um ou mais dos domínios de região constante foram deletados ou do contrário alterados para fornecer características bioquímicas desejadas tais como funções efetoras reduzidas, a habilidade para não-covalentemente dimerizar, habilidade aumentada para localizar no sítio de um tumor, meia-vida de soro reduzida, ou meia-vida de soro aumentada quando comparado com um todo, anticorpo inalterado de aproximadamente a mesma imunogenicidade. Por exemplo, certos anticorpos para o uso nos métodos de diagnóstico e de tratamento descritos aqui são anticorpos com domínio excluído compreendendo uma cadeia de polipeptídeo similar a uma cadeia pesada da imunoglobulina, mas que carece de pelo menos uma porção de um ou mais domínios de cadeia pesada. Por exemplo, em certos anticorpos, será deletado um domínio inteiro da região constante do anticorpo modificado, por exemplo, todo ou parte do domínio CH2 será deletada.

[00141] Em certos anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos descrito aqui, a porção de Fc pode ser mutada para diminuir a função efetora usando técnicas

conhecidas na técnica. Por exemplo, a deleção ou inativação (através de mutações de ponto ou outros meios) de um domínio de região constante pode reduzir a ligação do receptor Fc do anticorpo circulante modificado assim aumentando a localização do tumor. Em outros casos pode ser que modificações da região constante consistentes com a invenção imediata modere a ligação do complemento e desse modo reduza a meia-vida de soro e associação não-específica de uma citotoxina conjugada. Ainda outras modificações da região constante podem ser usadas para modificar as ligações de dissulfeto ou metades de oligossacarídeo que permitem localização intensificada devido à especificidade de antígeno aumentada ou flexibilidade de anticorpo. O perfil fisiológico resultante, biodisponibilidade e outros efeitos bioquímicos das modificações, tais como localização do tumor, biodistribuição e meia-vida de soro, podem ser facilmente ser medidos e quantificados usando técnicas imunológicas bem-conhecidas sem experimentação imprópria.

[00142] Formas modificadas de anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser feitas de anticorpos precursores inteiros ou de origem usando técnicas conhecidas na técnica. Técnicas exemplares são debatidas em mais detalhe aqui.

[00143] Em certas modalidades ambas as regiões variáveis e constantes dos anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos são completamente humanas. Anticorpos completamente humanos podem ser feitos usando técnicas que são conhecidas na técnica e como descritas aqui. Por exemplo, anticorpos completamente humanos contra um antígeno específico podem ser preparados administrando o antígeno a um animal transgênico que foi modificado para produzir tais anticorpos em resposta ao desafio antigênico, mas cujos loci endógenos foram inválidos.

Técnicas exemplares que podem ser usadas para fazer tais anticorpos são descritas nas patentes US em: 6.150.584; 6.458.592; 6.420.140 que são incorporadas por referência em suas totalidades. Outras técnicas são conhecidas na técnica. Anticorpos completamente humanos podem ser igualmente produzidos através de várias tecnologias de exibição, por exemplo, exibição de fago ou outros sistemas de exibição viral, como descritos em outro lugar em mais detalhe aqui.

[00144] Anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser feitos ou fabricados usando técnicas que são conhecidas na técnica. Em certas modalidades, moléculas de anticorpo ou fragmentos do mesmo são "recombinantemente produzidas", isto é, são produzidas usando tecnologia de DNA recombinante. Técnicas exemplares para fazer as moléculas de anticorpo ou fragmentos do mesmo são debatidas em outro lugar em mais detalhe aqui.

[00145] Anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção também incluem derivados que são modificados, por exemplo, pela ligação covalente de qualquer tipo de molécula ao anticorpo de modo que ligação covalente ao anticorpo não impede de especificamente ligar a seu epitopo cognato. Por exemplo, mas não por via de limitação, os derivados de anticorpo incluem anticorpos que foram modificados, por exemplo, através de glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivatização através de grupos de proteção/bloqueio conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligante celular ou outra proteína, etc. Quaisquer de numerosas modificações químicas pode ser realizada através de técnicas conhecidas, incluindo, mas não-limitadas a clivagem química específica, acetilação, formilação, síntese metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, o derivado pode conter um ou mais aminoácidos não-clássicos.

[00146] Em certas modalidades, anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção não suscitará uma resposta imune deletéria no animal a ser tratado, por exemplo, em um humano. Em uma modalidade, anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção são modificados para reduzir sua imunogenicidade usando técnicas reconhecidas na técnica. Por exemplo, anticorpos podem ser anticorpos humanizados, primatizados, desimunizados, ou quiméricos podem ser feitos. Estes tipos de anticorpos são derivados de um anticorpo não-humano, tipicamente um anticorpo murino ou primata, que retém ou substancialmente retém as propriedades de ligação de antígeno do anticorpo de origem, mas que é menos imunogênico em seres humanos. Isto pode ser alcançado através de vários métodos, incluindo (a) enxertar os domínios variáveis não-humanos inteiros sobre regiões constantes humanas para gerar anticorpos quiméricos; (b) enxertar pelo menos uma parte de uma ou mais das regiões de determinação de complementaridade não-humanas (CDRs) em uma estrutura humana e regiões constantes com ou sem retenção de resíduos estruturais críticos; ou (c) transplantar os domínios variáveis não-humanos inteiros, mas "encapotar" os mesmos com uma seção semelhante à humana por substituição dos resíduos de superfície. Tais métodos são descritos em Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-6855 (1984); Morrison et al., Adv. Immunol. 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun. 31:169-217 (1994), e Pats. U.S. 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762, e 6.190.370 todas estas são por este meio incorporadas por referência em sua totalidade.

[00147] Desimunização pode também ser usada para diminuir a imunogenicidade de um anticorpo. Como aqui usado, o termo "desimunização" inclui alteração de um anticorpo para modificar

epitopos de célula T (vide, por exemplo, WO9852976A1, WO0034317A2). Por exemplo, sequências de VH e VL do anticorpo de partida são analisadas e um "mapa" de epítipo de células T humanas de cada região V mostrando a localização dos epítipos em relação às regiões de determinação de complementaridade (CDRs) e outros resíduos fundamentais dentro da sequência. Epítipos de células T individuais do mapa de epítipo de células T São analisados para identificar substituições de aminoácido alternativas com um risco baixo de alterar a atividade do anticorpo final. Uma faixa de sequências VH e VL alternativas compreendendo combinações de substituições de aminoácido é projetada e estas sequências são subsequentemente incorporadas em uma faixa de polipeptídeos de ligação, por exemplo, anticorpos Sp35-específicos ou fragmentos imuno-específicos dos mesmos para o uso nos métodos de diagnóstico e de tratamento descritos aqui que são depois testados para função. Tipicamente, entre 12 e 24 anticorpos variantes são gerados e são testados. Genes de cadeia pesada e leve completos compreendendo regiões V modificadas e C humanas são depois clonados em vetores de expressão e os plasmídeos subsequentes introduzidos nas linhagens celulares para a produção de anticorpo inteiro. Os anticorpos são depois comparados em ensaios bioquímicos e biológicos apropriados, e a variante ótima é identificada.

[00148] Anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser gerados por qualquer método adequado conhecido na técnica. Anticorpos policlonais para um antígeno de interesse podem ser produzidos por vários procedimentos bem-conhecidos na técnica. Por exemplo, um anticorpo de Sp35, por exemplo, um polipeptídeo de ligação, por exemplo, um anticorpo Sp35-específico ou fragmento imuno-específico do mesmo pode ser administrado a vários animais hospedeiros

incluindo, mas não-limitados a, coelhos, camundongos, ratos, galinhas, hamsters, cabras, burros, etc., para induzir a produção de soros contendo anticorpos policlonais específicos para o antígeno. Vários adjuvantes podem ser usados para aumentar a resposta imunológica, dependendo das espécies hospedeiras, e incluem mas não são limitados a, Freund (complete e incompleto), géis minerais tais como hidróxido de alumínio, substâncias ativas de superfície tais como lisolecitina, polióis plurônicos, poliânions, peptídeos, emulsões de óleo, hemocianinas de lapa, dinitrofenol, e adjuvantes humanos potencialmente úteis tais como BCG (bacille Calmette-Guerin) e *Corynebacterium parvum*. Tais adjuvantes são também bem-conhecidos na técnica.

[00149] Anticorpos monoclonais podem ser preparados usando uma ampla variedade de técnicas conhecidas na técnica incluindo o uso de tecnologias de hibridoma, recombinante, e de exibição de fago, ou uma combinação das mesmas. Por exemplo, anticorpos monoclonais podem ser produzidos usando técnicas de hibridoma incluindo aquelas conhecidas na técnica e ensinadas, por exemplo, em Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988); Hammerling et al., em: *Monoclonal Anticorpos and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981) (ditas referências incorporadas por referência em suas totalidades). O termo "anticorpo monoclonal" como aqui usado não é limitado a anticorpos produzidos através de tecnologia de hibridoma. O termo "anticorpo monoclonal" refere-se a um anticorpo que é derivado de um clone simples, incluindo qualquer clone eucariótico, procariótico, ou de fago, e não o método pelo qual é produzido. Desse modo, o termo "anticorpo monoclonal" não é limitado a anticorpos produzidos através de tecnologia de hibridoma. Anticorpos monoclonais podem ser preparados usando camundongos knockout em Sp35 para aumentar as regiões de reconhecimento de

epitopo. Anticorpos monoclonais podem ser preparados usando uma ampla variedade de técnicas conhecidas na técnica incluindo o uso de tecnologia de hibridoma e recombinante e de exibição de fago como descrita em outro lugar aqui.

[00150] Usando os protocolos reconhecidos na técnica, em um exemplo, anticorpos são suscitados em mamíferos através de múltiplas injeções subcutâneas ou intraperitoneais do antígeno relevante (por exemplo, antígenos associados ao tumor purificados tais como Sp35 ou células ou extratos celulares compreendendo tais antígenos) e um adjuvante. Esta imunização tipicamente provoca uma resposta imune compreendendo a produção de anticorpos antígeno-reativos de esplenócitos ou linfócitos ativados. Embora os anticorpos resultantes possam ser colhidos do soro do animal para fornecer preparações policlonais, é frequentemente desejável isolar os linfócitos individuais do baço, linfonodos ou sangue periférico para fornecer preparações homogêneas de anticorpos monoclonais (MAbs). Preferivelmente, os linfócitos são obtidos do baço.

[00151] Neste processo bem-conhecido (Kohler et al., Nature 256:495 (1975)) os linfócitos relativamente de vida curta, ou mortais, de um mamífero que foi injetado com antígeno são fundidos com uma linhagem de célula tumoral imortal (por exemplo, uma linhagem celular de mieloma), desse modo, produzindo células híbridas ou "hibridomas" que são imortais e capazes de produzir o anticorpo geneticamente codificado da célula B. Os híbridos resultantes são segregados em cepas genéticas simples por seleção, diluição, e recultivo com cada cepa individual compreendendo genes específicos para a formação de um anticorpo simples. Eles produzem anticorpos que são homogêneos contra um antígeno desejado e, em referência a sua ascendência genética pura, são denominados "monoclonais".

[00152] Células de hibridoma desse modo preparadas são

semeadas e crescidas em um meio de cultura adequado que preferivelmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma parentais não-fundidas. Aqueles versados na técnica apreciarão que reagentes, linhagens celulares e meios para a formação, seleção e crescimento de hibridomas estão comercialmente disponíveis de várias fontes e protocolos padronizados estão bem estabelecidos. Em geral, o meio de cultura no qual as células de hibridoma estão cultivando é ensaiado para produção de anticorpos monoclonais contra o antígeno desejado. Preferivelmente, a especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais produzida por células de hibridoma é determinada por ensaios in vitro tais como imunoprecipitação, radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA). Após as células de hibridoma serem identificadas que produzem os anticorpos da especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados limitando os procedimentos de diluição e crescidos através de métodos padrões (Goding, *Monoclonal Anticorpos: Principles and Practice*, Academic Press, páginas 59-103 (1986)). Também será apreciado que os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones podem ser separados do meio de cultura, fluido de ascites ou soro através de procedimentos de purificação convencionais tais como, por exemplo, proteína-a, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

[00153] Fragmentos de anticorpo que reconhecem epitopos específicos podem ser gerados através de técnicas conhecidas. Por exemplo, fragmentos Fab e F(ab')₂ podem ser produzidos por clivagem proteolítica de moléculas de imunoglobulina, usando enzimas tais como papaína (para produzir fragmentos Fab) ou pepsina (para produzir fragmentos F(ab')₂). Fragmentos F(ab')₂ contêm a região variável, a região constante de cadeia leve e o domínio CH1 da cadeia pesada.

[00154] Aqueles versados na técnica também apreciarão que DNA que codifica os anticorpos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, sítios de ligação de antígeno) podem ser também derivados de bibliotecas de anticorpo, tais como bibliotecas de exibição de fago. Em particular, tal fago pode ser utilizado para exibir domínios de ligação de antígeno expressos de um repertório ou biblioteca de anticorpo combinatória (por exemplo, humano ou murino). Fago que expressa um domínio de ligação de antígeno que liga o antígeno de interesse pode ser selecionado ou identificado com antígeno, por exemplo, usando antígeno marcado ou antígeno ligado ou capturado em uma superfície sólida ou esfera. Fagos usados nestes métodos são tipicamente fago filamentoso incluindo domínios de ligação de fd e M13 expressos do fago com Fab, Fv OE DAB (região de Fv individual de cadeias leves ou pesadas) ou domínios de Fv estabilizados de dissulfeto recombinantemente fundidos ou o gene III de fago ou proteína do gene VIII. Métodos exemplares estão expostos, por exemplo, em EP 368 684 B1; patente U.S. 5.969.108, Hoogenboom, H. R. e Chames, Immunol. Today 21:371 (2000); Nagy et al. Nat. Med. 8:801 (2002); Huie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:2682 (2001); Lui et al., J. Mol. Biol. 315:1063 (2002), cada uma destas é incorporada aqui por referência. Várias publicações (por exemplo, Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)) descreveram a produção de anticorpos humanos de afinidade alta por embaralhamento de cadeias, como também infecção combinatória e recombinação in vivo como uma estratégia para construir bibliotecas de fago grandes. Em outra modalidade, exibição ribossômica pode ser usada para substituir o bacteriófago como a plataforma de exibição (vide, por exemplo, Hanes et al., Nat. Biotechnol. 18:1287 (2000); Wilson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:3750 (2001); ou Irving et al., J. Immunol. Methods 248:31 (2001)). Em ainda outra modalidade, bibliotecas de superfície celular podem ser triadas para

anticorpos (Boder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:10701 (2000); Daugherty et al., J. Immunol. Methods 243:211 (2000)). Tais procedimentos provêem alternativas às técnicas de hibridoma tradicionais para o isolamento e clonagem subsequente dos anticorpos monoclonais.

[00155] Em métodos de exibição de fago, domínios de anticorpo funcionais são exibidos na superfície das partículas de fago que carregam as sequências de polinucleotídeo que os codificam. Por exemplo, sequências de DNA que codificam as regiões VH e VL são amplificadas de bibliotecas de cDNA animais (por exemplo, bibliotecas de cDNA humanas ou murinas de tecidos linfoides) ou bibliotecas de cDNA sintéticas. Em certas modalidades, o DNA que codifica as regiões VH e VL é unido por um ligante de scFv por PCR e clonado em um vetor de fagemídeo (por exemplo, p CANTAB 6 ou pComb 3 HSS). O vetor é eletroporado em E. coli e o E. coli é infectado com fago auxiliar. Fagos usados nestes métodos são tipicamente fagos filamentosos incluindo fd e M13 e as regiões VH e VL são usualmente recombinantemente fundidas no gene III de fago ou gene VIII. Fago que expressa um domínio de ligação de antígeno que liga a um antígeno de interesse (isto é, um polipeptídeo de Sp35 ou um fragmento do mesmo) pode ser selecionado ou identificado com antígeno, por exemplo, usando antígeno marcado ou antígeno ligado ou capturado em uma superfície sólida ou esfera.

[00156] Exemplos adicionais de métodos de exibição de fago que podem ser usados para fazer os anticorpos incluem aqueles descritos em Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187:9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); Pedido de Patente de PCT PCT/GB91/01134; publicações de PCT WO 90/02809;

WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; e Pats. U.S. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 e 5.969.108; cada um destes é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

[00157] Como descrito nas referências acima, após seleção de fago, as regiões de codificação de anticorpo do fago podem ser isoladas e usadas para gerar anticorpos inteiros, incluindo anticorpos humanos, ou qualquer outro fragmento de ligação de antígeno desejado, e expresso em qualquer hospedeiro desejado, incluindo células mamíferas, células de inseto, células de planta, levedura, e bactérias. Por exemplo, técnicas para recombinantemente produzir fragmentos Fab, Fab' e F(ab')₂ podem ser também empregadas usando métodos conhecidos na técnica tais como aqueles descritos na publicação de PCT WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992); e Sawai et al., *AJRI* 34:26-34 (1995); e Better et al., *Science* 240:1041-1043 (1988) (ditas referências incorporadas por referência em suas totalidades).

[00158] Exemplos de técnicas que podem ser usadas para produzir Fvs de cadeia simples e anticorpos incluem aquelas descritas nas Pats. U.S. 4.946.778 e 5.258.498; Huston et al., *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu et al., *PNAS* 90:7995-7999 (1993); e Skerra et al., *Science* 240:1038-1040 (1988). Para alguns usos, incluindo uso in vivo de anticorpos em seres humanos e ensaios de detecção in vitro, pode ser preferível usar anticorpos quiméricos, humanizados, ou humanos. Um anticorpo quimérico é uma molécula em que as porções diferentes do anticorpo são derivadas de espécies animais diferentes, tais como anticorpos tendo uma região variável derivada de um anticorpo monoclonal murino e uma região constante de imunoglobulina humana. Métodos para produzir anticorpos quiméricos são conhecidos

na técnica. Vide, por exemplo, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., J. Immunol. Methods 125:191-202 (1989); Pats. U.S. 5.807.715; 4.816.567; e 4.816.397 que são incorporadas aqui por referência em suas totalidades. Anticorpos humanizados são moléculas de anticorpo derivadas de um anticorpo de espécie não-humana que liga o antígeno desejado tendo uma ou mais regiões de determinação de complementaridade (CDRs) das espécies não-humanas e regiões de estrutura de uma molécula de imunoglobulina humana. Frequentemente, os resíduos de estrutura serão substituídos nas regiões de estrutura humanas com o resíduo correspondente do anticorpo doador de CDR para alterar, preferivelmente melhorar, a ligação do antígeno. Estas substituições de estrutura são identificadas por métodos bem-conhecidos na técnica, por exemplo, modelagem das interações da CDR e resíduos de estrutura para identificar resíduos de estrutura importantes para ligação do antígeno e comparação de sequência para identificar resíduos de estrutura incomuns em posições particulares. (Vide, por exemplo, Queen et al., Patente U.S. 5.585.089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988) que é incorporada aqui por referência em suas totalidades). Anticorpos podem ser humanizados usando uma variedade de técnicas conhecidas na técnica incluindo, por exemplo, enxerto de CDR (EP 239,400; publicação de PCT WO 91/09967; Pats. U.S. 5.225.539; 5.530.101; e 5.585.089), capeamento ou recobrimento (EP 592,106; EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., PNAS 91:969-973 (1994)), e embaralhamento de cadeias (Patente U.S. 5.565.332 que é incorporada por referência em sua totalidade).

[00159] Anticorpos completamente humanos são particularmente desejáveis para tratamento terapêutico de pacientes humanos. Anticorpos humanos podem ser feitos por uma variedade de métodos

conhecidos na técnica incluindo métodos de exibição de fago descritos acima usando bibliotecas de anticorpo derivadas de sequências de imunoglobulina humanas. Vide também, Pats. U.S. Nos. 4.444.887 e 4.716.111; e publicações de PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, e WO 91/10741; cada uma destas é incorporada aqui por referência em sua totalidade.

[00160] Anticorpos humanos podem ser também produzidos usando camundongos transgênicos que são incapazes de expressar imunoglobulinas endógenas funcionais, mas que podem expressar genes humanos de imunoglobulina. Por exemplo, os complexos de genes humanos de cadeia pesada e leve da imunoglobulina podem ser introduzidos fortuitamente ou por recombinação homóloga em células-tronco embrionárias de camundongo. Alternativamente, a região variável humana, região constante, e região de diversidade podem ser introduzidas em células-tronco embrionárias de camundongo além dos genes humanos de cadeia pesada e leve. Os genes de camundongo de cadeia pesada e leve da imunoglobulina podem ser transmitidos de modo separado ou simultaneamente não-funcional com a introdução dos loci de imunoglobulina humana através de recombinação homóloga. Em particular, deleção homozigota da região JH impede a produção de anticorpo endógeno. As células-tronco embrionárias modificadas são expandidas e microinjetadas em blastocistos para produzir camundongos quiméricos. Os camundongos quiméricos são depois criados para produzir descendência homozigota que expressam anticorpos humanos. Os camundongos transgênicos são imunizados na maneira normal com um antígeno selecionado, por exemplo, todo ou uma porção de um polipeptídeo-alvo desejado. Anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno podem ser obtidos dos camundongos imunizados, transgênicos usando tecnologia de hibridoma convencional. Os transgenes de imunoglobulina humana abrigados

pelos camundongos transgênicos rearranjam-se durante a diferenciação de célula B, e subsequentemente sofrem troca de classe e mutação somática. Desse modo, usando uma tal técnica, é possível produzir anticorpos de IgG, IgA, IgM e IgE terapeuticamente úteis. Para uma visão geral desta tecnologia para produzir anticorpos humanos, vide Lonberg e Huszar *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995). Para um debate detalhado desta tecnologia para produzir anticorpos humanos e anticorpos monoclonais humanos e protocolos por produzir tais anticorpos, vide, por exemplo, Publicações de PCT WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; Pats. U.S. 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; e 5.939.598, que são incorporadas por referência aqui em sua totalidade. Além disso, companhias tais como Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) e GenPharm (San Jose, Calif.) podem empenhar-se para fornecer anticorpos humanos direcionados contra um antígeno selecionado usando tecnologia similar àquela descrita acima.

[00161] Anticorpos completamente humanos que reconhecem um epítipo selecionado podem ser gerados usando uma técnica referida como "seleção guiada". Nesta abordagem um anticorpo monoclonal não-humano selecionado, por exemplo, um anticorpo de camundongo, é usado para guiar a seleção de um anticorpo completamente humano que reconhece o mesmo epítipo. (Jespers et al., *Bio/Technology* 12:899-903 (1988). Ver também, patente U.S. 5.565.332 que é incorporada por referência em sua totalidade).

[00162] Também, anticorpos para alvejar polipeptídeos da invenção podem, por sua vez, ser utilizados para gerar anticorpos de anti-idiotipo que "mimetizam" polipeptídeos alvos usando técnicas bem-conhecidas àquelas versadas na técnica. (Vide, por exemplo, Greenspan & Bona, *FASEB J.* 7(5):437-444 (1989) e Nissindissociação, *J. Immunol.* 147(8):2429-2438 (1991)). Por exemplo, anticorpos que ligam e

competitivamente inibem multimerização de polipeptídeo e/ou ligação de um polipeptídeo da invenção a um ligante podem ser usados para gerar anti-idiotipos que "mimetizam" a multimerização do polipeptídeo e/ou domínio de ligação e, como uma consequência, ligam e neutralizam o polipeptídeo e/ou seu ligante. Tais anti-idiotipos neutralizantes ou fragmentos Fab de tais anti-idiotipos podem ser usados em regimes terapêuticos para neutralizar o ligante polipeptídico. Por exemplo, tais anticorpos anti-idiotípicos podem ser usados para ligar um polipeptídeo-alvo desejado e/ou ligar seus ligantes/receptores, e assim bloquear sua atividade biológica.

[00163] Em outra modalidade, DNA que codifica anticorpos monoclonais desejados pode ser facilmente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, usando sondas de oligonucleotídeo que são capazes de especificamente ligar aos genes que codificam as cadeias pesadas e leves de anticorpos murinos). As células de hibridoma isoladas e subclonadas servem como uma fonte preferida de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão que são depois transfeccionados em células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas tais como células de *E. coli*, células COS de símio, células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) ou células de mieloma que do contrário não produzem imunoglobulinas. Mais particularmente, o DNA isolado (que pode ser sintético como descrito aqui) pode ser usado para clonar sequências de região constante e variável para os anticorpos de fabricação como descritos em Newman et al., Patente U.S. 5.658.570, depositada em 25 de janeiro de 1995, que é incorporada por referência aqui. Essencialmente, isto requer extração de RNA das células selecionadas, conversão para cDNA, e amplificação por PCR usando iniciadores Ig-específicos. Iniciadores adequados para este propósito são também descritos na Patente U.S. 5.658.570. Como será debatido em mais detalhe abaixo,

células transformadas que expressam o anticorpo desejado podem ser crescidas em quantidades relativamente grandes para fornecer materiais clínicos e comerciais da imunoglobulina.

[00164] Em uma modalidade, um anticorpo de Sp35 da invenção compreende pelo menos uma CDR de cadeia pesada ou leve de uma molécula de anticorpo. Em outra modalidade, um anticorpo de Sp35 da invenção compreende pelo menos duas CDRs de uma ou mais moléculas de anticorpo. Em outra modalidade, um anticorpo de Sp35 da invenção compreende pelo menos três CDRs de uma ou mais moléculas de anticorpo. Em outra modalidade, um anticorpo de Sp35 da invenção compreende pelo menos quatro CDRs de uma ou mais moléculas de anticorpo. Em outra modalidade, um anticorpo de Sp35 da invenção compreende pelo menos cinco CDRs de uma ou mais moléculas de anticorpo. Em outra modalidade, um anticorpo de Sp35 da invenção compreende pelo menos seis CDRs de uma ou mais moléculas de anticorpo. Moléculas de anticorpo exemplares que compreendem pelo menos uma CDR que pode ser incluída nos anticorpos de Sp35 em questão são descritos aqui.

[00165] Em uma modalidade específica, a sequência de aminoácido dos domínios variáveis de cadeia pesada e/ou leve pode ser inspecionada para identificar as sequências das regiões de determinação de complementaridade (CDRs) por métodos que são bem-conhecidos na técnica, por exemplo, por comparação às sequências de aminoácido conhecidas de outras regiões variáveis de cadeia pesada e leve para determinar as regiões de hipervariabilidade da sequência. Usando técnicas de DNA recombinante rotineiras, uma ou mais do CDRs podem ser inseridas dentro das regiões de estrutura, por exemplo, em regiões de estrutura humanas para humanizar um anticorpo não-humano. As regiões de estrutura podem ser de ocorrência natural ou regiões de estrutura de consenso, e preferivelmente regiões

de estrutura humanas (vide, por exemplo, Chothia et al., J. Mol. Biol. 278:457-479 (1998) para uma listagem de regiões de estrutura humanas). Preferivelmente, o polinucleotídeo gerado pela combinação das regiões de estrutura e CDRs codifica um anticorpo ao qual especificamente liga pelo menos a um epitopo de um polipeptídeo desejado, por exemplo, Sp35. Preferivelmente, uma ou mais substituições de aminoácido podem ser feitas dentro das regiões de estrutura, e, preferivelmente, as substituições de aminoácido melhoram a ligação do anticorpo a seu antígeno. Adicionalmente, tais métodos podem ser usados para fazer substituições ou deleções de aminoácido de um ou mais resíduos de cisteína de regiões variáveis que participam em uma ligação de dissulfeto de intracadeia para gerar moléculas de anticorpo que carecem de uma ou mais ligações de dissulfeto de intracadeia. Outras alterações para o polinucleotídeo são abrangidas pela presente invenção e estão dentro da habilidade da técnica.

[00166] Além disso, técnicas desenvolvidas para a produção de "anticorpos quiméricos" (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855 (1984); Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984); Takeda et al., Nature 314:452-454 (1985)) por splicing de genes de uma molécula de anticorpo de camundongo de especificidade de antígeno apropriada junto com genes de uma molécula de anticorpo humano de atividade biológica apropriada podem ser usadas. Como aqui usado, um anticorpo quimérico é uma molécula em que porções diferentes são derivadas de espécies animais diferentes, tais como aquelas tendo uma região variável derivada de um anticorpo monoclonal murino e uma região constante de imunoglobulina humana, por exemplo, anticorpos humanizados.

[00167] Alternativamente, técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia simples (Patente U.S. 4.694.778; Bird, Science 242:423-442 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-

5883 (1988); e Ward et al., Nature 334:544-554 (1989)) podem ser adaptadas para produzir anticorpos de cadeia simples. Anticorpos de cadeia simples são formados ligando os fragmentos de cadeia pesada e leve da região de Fv por meio de uma ponte de aminoácido, resultando em um anticorpo de cadeia simples. Técnicas para o conjunto de fragmentos de Fv funcionais em E. coli podem ser também usadas (Skerra et al., Science 242:1038-1041 (1988)).

[00168] Ainda outras modalidades da presente invenção compreendem a geração de anticorpos humanos ou substancialmente humanos em animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que são incapazes de produção de imunoglobulina endógena (vide por exemplo, Pats. U.S. 6.075.181, 5.939.598, 5.591.669 e 5.589.369 cada uma destas é incorporada aqui por referência). Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigota da região de junção de cadeia pesada do anticorpo em camundongos mutantes quiméricos e de linhagem germinal resulta em inibição completa da produção de anticorpo endógeno. Transferência de um arranjo de gene de imunoglobulina humana para tais camundongos mutantes de linhagem germinal resultará na produção de anticorpos humanos sob desafio de antígeno. Outros meios preferidos de gerar anticorpos humanos usando camundongos de SCID são descritos na Patente U.S. 5.811.524 que é incorporada aqui por referência. Será apreciado que o material genético associado a estes anticorpos humanos pode ser também isolado e manipulado como descrito aqui.

[00169] Ainda outros meios altamente eficientes para gerar anticorpos recombinantes são descritos por Newman, Biotechnology 10: 1455-1460 (1992). Especificamente, esta técnica resulta na geração de anticorpos primatizados contendo domínios variáveis de macaco e sequências constantes humanas. Esta referência é incorporada por referência em sua totalidade aqui. Além disso, esta técnica é também

descrita nas Pats. U.S. comumente atribuídas 5.658.570, 5.693.780 e 5.756.096 cada uma destas é incorporada aqui por referência.

[00170] Em outra modalidade, linfócitos podem ser selecionados por micromanipulação e os genes variáveis isolados. Por exemplo, células mononucleares de sangue periférico podem ser isoladas de um mamífero imunizado e cultivado durante cerca de 7 dias in vitro. As culturas podem ser triadas para IgGs específicos que satisfazem os critérios de triagem. As células podem ser isoladas de poços positivos. Células B produtoras de Ig individuais podem ser isoladas por FACS ou as identificando em um ensaio de placa hemolítico mediado por complemento. Células B produtoras de Ig podem ser micromanipuladas em um tubo e os genes de VH e VL podem ser amplificados usando, por exemplo, RT-PCR. Os genes de VH e VL podem ser clonados em um vetor de expressão de anticorpo e transfeccionados em células (por exemplo, células eucarióticas ou procarióticas) para expressão.

[00171] Alternativamente, linhagens celulares produtoras de anticorpo podem ser selecionadas e cultivadas usando técnicas bem-conhecidas ao artesão versado. Tais técnicas são descritas em uma variedade de manuais de laboratório e publicações primárias. Neste respeito, técnicas adequadas para o uso na invenção como descritas abaixo são descritas em Current Protocols in Immunology, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Nova Iorque (1991) que é aqui incorporada por referência em sua totalidade, incluindo suplementos.

[00172] Anticorpos para o uso nos métodos de diagnósticos e terapêuticos descritos aqui podem ser produzidos por qualquer método conhecido na técnica pela síntese de anticorpos, em particular, através de síntese química ou preferivelmente, através de técnicas de expressão recombinantes como descritas aqui.

[00173] Em uma modalidade, um anticorpo de Sp35, ou fragmento

de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo da invenção compreende uma região constante sintética em que um ou mais domínios são parcial ou completamente deletados ("anticorpos com domínio excluído"). Em certas modalidades os anticorpos modificados compatíveis compreenderão construções ou variantes com domínio excluído em que o domínio CH2 inteiro foi removido (construções de Δ CH2). Para outras modalidades um peptídeo de conexão curto pode ser substituído pelo domínio deletado para prover flexibilidade e liberdade de movimento para a região variável. Aqueles versados na técnica apreciarão que tais construções são particularmente preferidas devido às propriedades reguladoras do domínio CH2 na taxa catabólica do anticorpo. Construções com domínio deletado podem ser derivadas usando um vetor (por exemplo, de Biogen IDEC Incorporated) codificando um domínio constante de IgG1 humana (vide, por exemplo, WO 02/060955A2 e WO02/096948A2, que são incorporados por referência em suas totalidades). Este vetor exemplar foi criado para excluir o domínio CH2 e fornecer um vetor sintético que expressa uma região constante de IgG1 com domínio excluído.

[00174] Em certas modalidades, anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção são minicorpos. Minicorpos podem ser feitos usando métodos descritos na técnica (vide, por exemplo, Patente US 5.837.821 ou WO 94/09817A1, que são incorporados por referência em suas totalidades).

[00175] Em uma modalidade, um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo da invenção compreende cadeia pesada de imunoglobulina tendo deleção ou substituição de alguns ou até mesmo um só aminoácido contanto que permita associação entre as subunidades monoméricas. Por exemplo, a mutação de um aminoácido simples em áreas selecionadas do domínio CH2 pode ser bastante para substancialmente reduzir ligação

de Fc e assim aumentar a localização do tumor. Similarmente, pode ser desejável simplesmente deletar aquela parte de um ou mais domínios de região constante que controlam a função efetora (por exemplo, ligação do complemento) a ser modulada. Tais deleções parciais das regiões constantes podem melhorar as características selecionadas do anticorpo (meia-vida de soro) enquanto deixando outras funções desejáveis associadas ao domínio de região constante em questão intactas. Além disso, como aludido acima, as regiões constantes dos anticorpos descritos podem ser sintéticas através da mutação ou substituição de um ou mais aminoácidos que intensificam o perfil da construção resultante. Neste respeito pode ser possível romper a atividade fornecida por um sítio de ligação conservado (por exemplo, ligação de Fc) enquanto substancialmente mantendo a configuração e perfil imunogênico do anticorpo modificado. Ainda outras modalidades compreendem a adição de um ou mais aminoácidos à região constante para intensificar as características desejáveis tais como função efetora ou prover mais ligação de citotoxina ou de carboidrato. Em tais modalidades pode ser desejável a inserção ou réplica daquelas sequências específicas derivadas dos domínios de região constante selecionados.

[00176] A presente invenção também fornece anticorpos que compreendem, consistem essencialmente em, ou consistem em, variantes (incluindo derivados) de moléculas de anticorpo (por exemplo, as regiões VH e/ou regiões VL) descritas aqui cujos anticorpos ou fragmentos dos mesmos imuno-especificamente ligam a um polipeptídeo de Sp35 ou fragmento ou variante dos mesmos. Técnicas-padrão conhecidas àqueles de habilidade na técnica podem ser usadas para introduzir mutações na sequência de nucleotídeo que codifica um anticorpo de Sp35, incluindo, mas não-limitadas a, mutagênese dirigida e mutagênese mediada por PCR resultando em substituições de

aminoácidos. Preferivelmente, as variantes (incluindo derivados) codificam menos de 50 substituições de aminoácido, menos de 40 substituições de aminoácido, menos de 30 substituições de aminoácido, menos de 25 substituições de aminoácido, menos de 20 substituições de aminoácido, menos de 15 substituições de aminoácido, menos de 10 substituições de aminoácido, menos de 5 substituições de aminoácido, menos de 4 substituições de aminoácido, menos de 3 substituições de aminoácido, ou menos de 2 substituições de aminoácido com relação à região VH de referência, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, região VL, VLCDR1, VLCDR2, ou VLCDR3. Uma "substituição de aminoácido conservadora" é uma em que o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral com uma carga similar. Famílias de resíduos de aminoácido que têm cadeias laterais com cargas similares foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais acídicas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares descarregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não-polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Alternativamente, mutações podem ser introduzidas fortuitamente ao longo de toda ou parte da sequência de codificação, tal como através de mutagênese de saturação, e os mutantes resultantes podem ser triados para atividade biológica para identificar mutantes que retêm a atividade (por exemplo, a habilidade de ligar um polipeptídeo de Sp35).

[00177] Por exemplo, é possível introduzir mutações apenas nas regiões de estrutura ou apenas nas regiões de CDR de uma molécula

de anticorpo. Mutações introduzidas podem ser mutações de sentido errado silenciosas ou neutras, isto é, têm nenhum, ou pequeno, efeito na habilidade de um anticorpo para ligar o antígeno. Estes tipos de mutações podem ser úteis para otimizar o uso de códon, ou melhorar a produção de anticorpo de um hibridoma. Alternativamente, mutações de sentido errado não-neutras podem alterar a habilidade de um anticorpo para ligar o antígeno. A localização das mutações de sentido errado mais silenciosas e neutras é provável de estar nas regiões de estrutura, enquanto a localização da maioria das mutações de sentido errado não-neutras é provável estar na CDR, entretanto este não é um requerimento absoluto. Alguém de habilidade na técnica poderia projetar e testar moléculas mutantes com propriedades desejadas tais como nenhuma alteração na atividade de ligação de antígeno ou alteração na atividade de ligação (por exemplo, melhorias na atividade de ligação de antígeno ou alterações na especificidade de anticorpo). Seguindo mutagênese, a proteína codificada pode ser habitualmente expressada e a atividade funcional e/ou biológica da proteína codificada, (por exemplo, habilidade para imunoespecificamente ligar pelo menos um epítipo de um polipeptídeo de Sp35) pode ser determinada usando as técnicas descritas aqui ou habitualmente modificando as técnicas conhecidas na técnica.

IV. POLINUCLEOTÍDEOS QUE CODIFICAM ANTICORPOS DE Sp35

[00178] A presente invenção também provê moléculas de ácido nucleico que codificam anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção.

[00179] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma região variável de cadeia pesada da imunoglobulina (VH), onde pelo menos uma das CDRs da região variável de cadeia pesada ou pelo menos duas

das CDRs da região variável de cadeia pesada são pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às sequências de aminoácido de cadeia pesada de referência CDR1, CDR2, ou CDR3 dos anticorpos de Sp35 monoclonais descritos aqui. Alternativamente, as regiões CDR1, CDR2, e CDR3 da VH são pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às sequências de aminoácido de cadeia pesada de referência CDR1, CDR2, e CDR3 dos anticorpos de Sp35 monoclonais descritos aqui. Desse modo, de acordo com esta modalidade uma região variável de cadeia pesada da invenção tem sequências de polipeptídeo CDR1, CDR2, ou CDR3 relacionadas às sequências de polipeptídeo mostradas na Tabela 4:

TABELA 4: Sequências de Aminoácido de CDR1, CDR2, e CDR3 de VH* de Referência

Nome do anticorpo	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
Li10	P=TYPMV (SEQ ID NO: 6)	P=WIGPSGGVTAYADSVKG (SEQ ID NO: 8)	P=PYSSGWDFDL (SEQ ID NO: 10)
	N=ACTTACCCTATGGTT (SEQ ID NO: 5)	N=TGGATCGGTCCTTCTGGTGGCGTTACTGCTTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO: 7)	N=CCCTATAGCAGTGGCTGGTGGGACTTCGATCTC (SEQ ID NO: 9)
Li07	P=MYFMG (SEQ ID NO: 12)	P=SISPSGGFTSYADSVKG (SEQ ID NO: 14)	P=DRHAFDI (SEQ ID NO: 16)
	N=ATGTACTTTATGGGT (SEQ ID NO: 11)	N=TCTATCTCTCCTTCTGGTGGCTTTAC C TTCTTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO: 13)	N=GATCGGCATGCTTTTGTATATC (SEQ ID NO: 15)
Li05	P=AYAMG (SEQ ID NO: 18)	P=SIVSSGGYTDYADSVKG (SEQ ID NO: 20)	P=EGDHNAFDI (SEQ ID NO: 22)
	N=CTTACGCTATGGGT (SEQ ID NO: 17)	N=TCTATCGTTTCTTCTGGTGGCTATACTGATTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO: 19)	N=GAGGGTGACCATAATGCTTTTGATATC (SEQ ID NO: 21)
Li11	P=SYAMY (SEQ ID NO: 24)	P=SISTSGGYTGYADSVKG (SEQ ID NO: 26)	P=DTSDNDYYMDV (SEQ ID NO: 28)

Nome do anticorpo	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
	N=TCTTACGCTAT GTAT (SEQ ID NO: 23)	N=TCTATCTCTACTTCTGGTGGCTA TACTGGTTATGCTGACTCCGTTAAAG GT (SEQ ID NO: 25)	N=GATACCAGCGATAATG AC TACTACTACATGGACGTC (SEQ ID NO: 27)
Li01	P=KYQMT (SEQ ID NO: 30)	P=SIYPSGGNTVYADSVKG (SEQ ID NO: 32)	P=GTTEAVFDY (SEQ ID NO: 34)
	N=AAGTACCAGAT G ACT (SEQ ID NO: 29)	N=TCTATCTATCCTTCTGGTGGCAA TACTGTTTATGCTGACTCCGTTAA AGGT (SEQ ID NO: 31)	N=GGGACTACAGAGGCAG TCTT TGACTAC (SEQ ID NO: 33)
Li12	P=QYNMF (SEQ ID NO: 36)	P=RISSSGGMTMYADSVKG (SEQ ID NO: 38)	P=EALRPYCSGGSCYSDY YYYGMDV (SEQ ID NO: 40)
	N= CAGTACAATATGT TT (SEQ ID NO: 35)	N= CGTATCTCTTCTTCTGGTGGCAT GACTATGTATGCTGACTCCGTTAA GGT (SEQ ID NO: 37)	N= GAAGCGTTACGGCCTTAT TG TAGTGGTGGTAGCTGCTA CTCCG ACTACTACTACTACGGTA TGGAC GTC (SEQ ID NO: 39)
Li06	P=EYPMD (SEQ ID NO: 42)	P=SIYSSGGSTVYADSIKG (SEQ ID NO: 44)	P=EGDSDAFDI (SEQ ID NO: 46)
	N=GAGTACCCTAT GG AT (SEQ ID NO: 41)	N=TCTATCTATTCTTCTGGTGGCTC TACTGTTTATGCTGACTCCATTAA AGGT (SEQ ID NO: 43)	N=GAGGGTGACTCTGATG CTTTT GATATC (SEQ ID NO: 45)
Li08	P=HYEMV (SEQ ID NO: 48)	P=SIRSSGGATKYA DSVKG (SEQ ID NO: 50)	P=ESPDDYFDY (SEQ ID NO: 52)
	N= CATTACGAGATGG TT (SEQ ID NO: 47)	N= TCTATCCGTTCTTCTGGTGGCGCT ACTAAGTATGCTGACTCCGTTAAAG GT (SEQ ID NO: 49)	N= GAGTCGCCAGACGACTAC TTT GACTAC (SEQ ID NO: 51)
Li03	P=QYPME (SEQ ID NO: 54)	P=GIYPSGGSTVYADSVKG (SEQ ID NO: 56)	P=AGQWLGDYFDY (SEQ ID NO: 58)
	N=CAGTACCCTAT G GAG (SEQ ID NO: 53)	N=GGTATCTATCCTTCTGGTGGCTCTA CTGTTTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO: 55)	N=GCGGGGCGAGTGGCTGG GGGAC TTTGACTAC (SEQ ID NO: 57)

Nome do anticorpo	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
Li09	P=MYSMV (SEQ ID NO: 60)	P=YISPSGGKTMYSVKG (SEQ ID NO: 62)	P=DSRRRYDFWSGYHNY YYYYM DV (SEQ ID NO: 64)
	N=ATGTACTCTAT GG TT (SEQ ID NO: 59)	N=TATATCTCTCCTTCTGGTGGCAAG ACTATGTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO: 61)	N=GATTCGAGACGCCGGT ATTACG ATTTTGGAGTGGTTATC ACAATA CTACTACTACTACATGGA CGTC (SEQ ID NO: 63)
Li04	P=RYNMG (SEQ ID NO: 66)	P=VIYPSGGGTHYADSVKG (SEQ ID NO: 68)	P=SIADDAFDI (SEQ ID NO: 70)
	N=CGTTACAATAT GG GT (SEQ ID NO: 65)	N=GTTATCTATCCTTCTGGTGGCGGT ACTCATTATGCTGACTCCGTTAAAGGT (SEQ ID NO: 67)	N=TCTATAGCAGATGATG CTTTTGA TATC (SEQ ID NO: 69)
Li02	P=TYEMI (SEQ ID NO: 72)	P=SIGPSGGLTWYADSVKG (SEQ ID NO: 74)	P=MYVCVRIDDSSGWAFD I (SEQ ID NO: 76)
	N=ACTTACGAGAT G ATT (SEQ ID NO: 71)	N=TCTATCGGTCCTTCTGGTGGCC TTACTTGGTATGCTGACTCCGTTAAA (SEQ ID NO: 73)	N=ATGTATTACTGTGTAC GGATTGA TGATAGTAGTGGTTGGGC TTTTGAT ATC (SEQ ID NO: 75)
Li13	P=HYEMY (SEQ ID NO: 389)	P=RIVSSGGFTKYADSVKG (SEQ ID NO: 390)	P=EGDNDAFDI (SEQ ID NO: 391)
Li32	P=AYMMQ (SEQ ID NO: 395)	P=SISPSGGNTKYADSVKG (SEQ ID NO: 396)	P=GDYGYWFDI (SEQ ID NO: 397)
Li33	P=IYPMF (SEQ ID NO: 401)	P=WIGPSGGITKYADSVKG (SEQ ID NO: 402)	P=EGHNDWYFDL (SEQ ID NO: 403)
Li34	P=NYEMY (SEQ ID NO: 407)	P=GIYSSGGITVYADSVKG (SEQ ID NO: 408)	P=AAILDWYFDL (SEQ ID NO: 409)
1A7	P=NYGMN (SEQ ID NO: 77)	P=WINTDTGEPTYTEDFQG (SEQ ID NO: 78)	P=EGVHFDY (SEQ ID NO: 79)
2F3	P=FSDAWLD (SEQ ID NO: 80)	P=EIRSKANNHATNYAESVKG (SEQ ID NO: 81)	P=SFAY (SEQ ID NO: 82)
3P1D10. 2C3 e 3P1E11. 3B7	P=SSWTQ (SEQ ID NO: 83)	P=AIYPGDGDTRYTQKFKG (SEQ ID NO: 84)	P=HNSYGM DY (SEQ ID NO: 85)
L1a.01	P=GYSFTNYWIG (SEQ ID NO: 195)	P=IIDPDDSYTTYSPSFQG (SEQ ID NO: 196)	P=AEFYWGAYDG (SEQ ID NO: 197)

Nome do anticorpo	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
L1a.02	P=GGSIIRGNYS (SEQ ID NO: 198)	P=SINYSGFTNPSLKG (SEQ ID NO: 199)	P=VRHWYFDV (SEQ ID NO: 200)
L1a.03	P=GYTFNGFDMH (SEQ ID NO: 201)	P=WIDPYNGSTTYAQKFQG (SEQ ID NO: 202)	P=DFYMDGHYYIFDV (SEQ ID NO: 203)
L1a.04	P=GYSFSNYYIH (SEQ ID NO: 204)	P=IIDPGDSFTSYSPSFQG (SEQ ID NO: 205)	P=DLAWIDYGFDY (SEQ ID NO: 206)
L1a.05	P=GFTFTSHTVS (SEQ ID NO: 207)	P=SITGNGSTTYADSVKG (SEQ ID NO: 208)	P=FYGDFDS (SEQ ID NO: 209)
L1a.06	P=GFTFSSNWS (SEQ ID NO: 210)	P=TIFYSGSSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 211)	P=DLPMKGFIIQRYGFDD V (SEQ ID NO: 212)
L1a.07	P=GFTFSGYAIS (SEQ ID NO: 213)	P=TIWGSSTTYADSVKG (SEQ ID NO: 214)	P=EYWYDQFTAV (SEQ ID NO: 215)
L1a.08	P=GDSVSSNSAAW S (SEQ ID NO: 216)	P=RIYYRSKWYNDYAVSVKS (SEQ ID NO: 217)	P=EVYSAGIMDY (SEQ ID NO: 218)
L1a.09	P=GYSFTNHWIG (SEQ ID NO: 219)	P=IIDPSDSDTNYSFQFQG (SEQ ID NO: 220)	P=GFYGIADTFDV (SEQ ID NO: 221)
L1a.10	P=GYSFTNYWIA (SEQ ID NO: 222)	P=MIYPDDSDTNYSFQFQG (SEQ ID NO: 223)	P=TNYLGFYDS (SEQ ID NO: 224)
L1a.11	P=GFTFSDYGIS (SEQ ID NO: 225)	P=NILYDGSETYYADSVKG (SEQ ID NO: 226)	P=GYPTDDYSFDI (SEQ ID NO: 227)
L1a.12	P=GDSVSDNSAAW G (SEQ ID NO: 228)	P=RIYYRSKWYNDYAVSVKS (SEQ ID NO: 229)	P=GRHEYGGLGYAEAMDH (SEQ ID NO: 230)
L1a.13	P=GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 231)	P=AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 232)	P=HYTYMHFEDY (SEQ ID NO: 233)
3B5.2	P=SYWMH (SEQ ID NO: 410)	P=VIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ ID NO: 411)	P=PYYGSHWFFDV (SEQ ID NO: 412)
	N=AGCTACTGGAT G CAC (SEQ ID NO: 424)	N=GTGATTGATCCTTCT GATAGTTATACTAACTACAATCAA AAGTTCAGGGGC (SEQ ID NO: 425)	N=CCTTACTACGGTAGTC ACT GGTTCCTCGATGTC (SEQ ID NO: 426)

Nome do anticorpo	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
Li81	P= AYEMK (SEQ ID NO: 436) N=GCTTACGAGAT GA AG (SEQ ID NO: 439)	P= VIGPSGGFTFYADSVKG (SEQ ID NO: 437) N=GTTATCGGTCCTTCTGGTGGCT TTACTTTTTATGCTGACTCCGTT AAAGGT (SEQ ID NO: 440)	P= EGDNDAFDI (SEQ ID NO: 438) N=GAGGGTGATAATGATG CTTTGTAT ATC (SEQ ID NO: 441)

*Determinado pelo sistema de Kabat (vide *supra*).

N=sequência de nucleotídeo, **P**=sequência de polipeptídeo.

[00180] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreendendo a VH específica ou preferencialmente codificada pelo polinucleotídeo se liga a Sp35.

[00181] Em outra modalidade, a presente invenção fornece um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma região variável de cadeia pesada da imunoglobulina (VH) em que as regiões CDR1, CDR2, e CDR3 têm sequências de polipeptídeo que são idênticas aos grupos CDR1, CDR2, e CDR3 mostrados na Tabela 4. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreendendo a VH específica ou preferencialmente codificada pelo polinucleotídeo se liga a Sp35.

[00182] Em uma modalidade adicional da invenção, a presente invenção fornece um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma região variável de cadeia pesada da imunoglobulina (VH) em que as regiões CDR1, CDR2, e CDR3 são codificadas através das sequências de nucleotídeo pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idênticas às regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de VH do polipeptídeo de cadeia pesada da imunoglobulina produzido pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8106) ou as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de VH do polipeptídeo de cadeia pesada da imunoglobulina produzido pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação de

Depósito de ATCC PTA-8107).

[00183] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma região variável de cadeia pesada da imunoglobulina (VH) em que as regiões CDR1, CDR2, e CDR3 são codificadas por sequências de nucleotídeo que são idênticas às sequências de nucleotídeo que codificam os grupos CDR1, CDR2, e CDR3 mostrados na Tabela 4. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreendendo a VH específica ou preferencialmente codificada pelo polinucleotídeo se liga a Sp35.

[00184] Em uma modalidade adicional da invenção, a presente invenção fornece um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma região variável de cadeia pesada da imunoglobulina (VH) em que as regiões CDR1, CDR2, e CDR3 são codificadas através de sequências de nucleotídeo pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idênticas ao polinucleotídeo que codifica as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de VH da cadeia pesada de imunoglobulina produzido pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8106) ou o polinucleotídeo que codifica as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de VH da cadeia pesada de imunoglobulina produzido pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8107).

[00185] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma VH codificada por um ou mais dos polinucleotídeos descritos acima específica ou preferencialmente se liga ao mesmo epitopo como um anticorpo monoclonal selecionado do grupo que consiste em: 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7,

3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li022), 35-E04 (Li033), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), 1968 (L1a.13), 7P1D5.1G9, 3B5.2 e Li81, ou competitivamente inibirá um tal anticorpo monoclonal de se ligar a Sp35.

[00186] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma VH codificada por um ou mais dos polinucleotídeos descritos acima específica ou preferencialmente se liga a um polipeptídeo de Sp35 ou fragmento do mesmo, ou um polipeptídeo de Sp35 variante, com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação (KD) não maior que 5 x 10⁻² M, 10⁻² M, 5 x 10⁻³ M, 10⁻³ M, 5 x 10⁻⁴ M, 10⁻⁴ M, 5 x 10⁻⁵ M, 10⁻⁵ M, 5 x 10⁻⁶ M, 10⁻⁶ M, 5 x 10⁻⁷ M, 10⁻⁷ M, 5 x 10⁻⁸ M, 10⁻⁸ M, 5 x 10⁻⁹ M, 10⁻⁹ M, 5 x 10⁻¹⁰ M, 10⁻¹⁰ M, 5 x 10⁻¹¹ M, 10⁻¹¹ M, 5 x 10⁻¹² M, 10⁻¹² M, 5 x 10⁻¹³ M, 10⁻¹³ M, 5 x 10⁻¹⁴ M, 10⁻¹⁴ M, 5 x 10⁻¹⁵ M, ou 10⁻¹⁵ M.

[00187] Em outra modalidade, a presente invenção fornece um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma região variável de cadeia leve da imunoglobulina (VL), onde pelo menos uma das CDRs da região variável de cadeia leve ou pelo menos duas das CDRs da região variável de cadeia leve são pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às sequências de aminoácido de cadeia leve de CDR1, CDR2, ou CDR3 de referência dos anticorpos de Sp35 monoclonais descritos aqui. Alternativamente, as regiões CDR1, CDR2,

e CDR3 da VL são pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às sequências de aminoácido de cadeia leve de CDR1, CDR2, e CDR3 de referência dos anticorpos monoclonais de Sp35 descritos aqui. Desse modo, de acordo com esta modalidade uma região variável de cadeia leve da invenção tem sequências de polipeptídeo de CDR1, CDR2, ou CDR3 relacionadas às sequências de polipeptídeo mostradas na Tabela 5:

TABELA 5: Sequências de Aminoácido de VL de CDR1, CDR2, e CDR3 de Referência*

Nome do anticorpo	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
Li10	P=RASQGIGNWLA (SEQ ID NO: 87)	P=AASSLES (SEQ ID NO: 89)	P=QQAQTFPLT (SEQ ID NO: 91)
	N=CGGGCGAGTCAGGG TATTGGCAACTGGTTAG CC (SEQ ID NO: 86)	N=GCTGCATCCAGTTTG GAAAGT (SEQ ID NO: 88)	N=CAACAGGCTCAGAC TTCCCCGCTCACC (SEQ ID NO: 90)
Li07	P=SGDQLGDKHVA (SEQ ID NO: 93)	P=LDIKRPA (SEQ ID NO: 95)	P=QAWDIKTV (SEQ ID NO: 97)
	N=TCTGGAGATCAGTTG GGTGACAAACATGTGG CT (SEQ ID NO: 92)	N=CTAGACATTAAG AGGCCCGCA (SEQ ID NO: 94)	N=CAGGCGTGGGACATC AAGACGGTC (SEQ ID NO: 96)
Li05	P=GGDNIGSKSVH (SEQ ID NO: 99)	P=DDYDRPS (SEQ ID NO: 101)	P=QVRDSRTEERV (SEQ ID NO: 103)
	N=GGGGGAGACAACAT TGGAAGTAAGAGTGT CCAC (SEQ ID NO: 98)	N=GATGATTATGACC GGCCCTCA (SEQ ID NO: 100)	N=CAGGTGAGGGACAGCCG TACTGAGGAACGGGTG (SEQ ID NO: 102)
Li11	P=RASQEIANLYLA (SEQ ID NO: 105)	P=DTYTLQT (SEQ ID NO: 107)	P=QQADIFPLS (SEQ ID NO: 109)
	N=CGGGCGAGTCAGGAG ATTGCCAACTACTTAGCC (SEQ ID NO: 104)	N=GATACATACAC TTTGCAGACT (SEQ ID NO: 106)	N=CAACAGGCTGACATTTT CCCGCTCTCT (SEQ ID NO: 108)
Li01	P=QASQDISNYLN (SEQ ID NO: 111)	P=DASNLET (SEQ ID NO: 113)	P=QQADRFPAVT (SEQ ID NO: 115)
	N=CAGGCGAGTCAGGA CATTAGCAACTATTTAAAT (SEQ ID NO: 110)	N=GATGCATCCAATT TGGAAACA (SEQ ID NO: 112)	N=CAACAGGCTGACAGGTT C CCTGCGGTCACT (SEQ ID NO: 114)

Nome do anticorpo	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
Li06	P=RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 117)	P=AASSLRT (SEQ ID NO: 119)	P=LQDYSYPLT (SEQ ID NO: 121)
	N=CGGGCCAGTCAGAGTA TTAGTAGCTGGTTGG CC (SEQ ID NO: 116)	N=GCTGCATCCAGT TTACGAACT (SEQ ID NO: 118)	N=CTACAAGATTACAGTTA C CCTCTCACT (SEQ ID NO: 120)
Li08	P=QASQDISYYLN (SEQ ID NO: 123)	P=DVSNLQT (SEQ ID NO: 125)	P=QQSDNLPLT (SEQ ID NO: 127)
	N=CAGGCGAGTCAGGAC ATTAGTTACTATTT AAAT (SEQ ID NO: 122)	N=GATGTATCCAAT TTGCAAACA (SEQ ID NO: 124)	N=CAACAGTCTGATA ATCTCCCTCTCACT (SEQ ID NO: 126)
Li03	P=RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 129)	P=AASSLQS (SEQ ID NO: 131)	P=QQSYSTPWT (SEQ ID NO: 133)
	N=GGGCAAGTCAGAGC ATTAGCAGCTATTTA AAT (SEQ ID NO: 128)	N=GCTGCATCCAG TTTGCAAAGT (SEQ ID NO: 130)	N=CAACAGAGTTACA GTACCCCGTGGACG (SEQ ID NO: 132)
Li09	P=RASQSIDTYLN (SEQ ID NO: 135)	P=AASKLED (SEQ ID NO: 137)	P=QQSYSPPLT (SEQ ID NO: 139)
	N=CGCGCAAGTCAGA GCATCGACACCTATT TAAAT (SEQ ID NO: 134)	N=GCTGCATCCAA GTTGGAAGAC (SEQ ID NO: 136)	N=CAACAGAGTTACAG TCCCCCTCTCAC (SEQ ID NO: 138)
Li02	P=SGDKLGDKFAS (SEQ ID NO: 141)	P=QDRKRLS (SEQ ID NO: 143)	P=QAWDTNTVV (SEQ ID NO: 145)
	N=TCTGGAGATAAAT TGGGGGATAAATTTGCT TCC (SEQ ID NO: 140)	N=CAAGATAGGA AGCGTCTCTCA (SEQ ID NO: 142)	N=CAGGCGTGGGACA CCAACACTGTGGTC (SEQ ID NO: 144)
Li13	P=RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 386)	P=DASNRAT (SEQ ID NO: 387)	P=QQRSNWPMYT (SEQ ID NO: 388)
Li32	P=QASQDISYYLN (SEQ ID NO: 392)	P=DAFILEG (SEQ ID NO: 393)	P=QQSDQLPVT (SEQ ID NO: 394)
Li33	P=RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 398)	P=DASNRAT (SEQ ID NO: 399)	P=QQYDKWPLT (SEQ ID NO: 400)
Li34	P=HASQDISNYLS (SEQ ID NO: 404)	P=DAFNLET (SEQ ID NO: 405)	P=QHYDNLPTT (SEQ ID NO: 406)
1A7	P=SASSSVSYMH (SEQ ID NO: 146)	P=DTSKLAS (SEQ ID NO: 147)	P=QQWSSNPFT (SEQ ID NO: 148)
2F3	P=RASGNIYNYLA (SEQ ID NO: 149)	P=NAKTLPD (SEQ ID NO: 150)	P=QHFWAIPYT (SEQ ID NO: 151)
3P1D10. 2C3	P=KSSQSLNLSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 152)	P=WASTRES (SEQ ID NO: 153)	P=QNDYSYPLFT (SEQ ID NO: 154)

Nome do anticorpo	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
3P1E11.3B7	P=KSSQSLNLSGNQKSYLT (SEQ ID NO: 155)	P=WASTRES (SEQ ID NO: 156)	P=QNDYSYPLFT (SEQ ID NO: 157)
L1a.01	P=SGDSLPSKFVH (SEQ ID NO: 234)	P=RDNNRPS (SEQ ID NO: 235)	P=SSYDALTD (SEQ ID NO: 236)
L1a.02	P=RASQSITNSYL (SEQ ID NO: 237)	P=DASSRAT (SEQ ID NO: 238)	P=QQASDAPE (SEQ ID NO: 239)
L1a.03	P=RASQGINFWLN (SEQ ID NO: 240)	P=AGSNLQS (SEQ ID NO: 241)	P=MQDSDFPF (SEQ ID NO: 242)
L1a.04	P=TGSSSNIGAGYDVS (SEQ ID NO: 243)	P=RNNNRPS (SEQ ID NO: 244)	P=QTYDNSTD (SEQ ID NO: 245)
L1a.05	P=SGDNIRSYYVH (SEQ ID NO: 246)	P=EDSNRPS (SEQ ID NO: 247)	P=QSYDSAILLH (SEQ ID NO: 248)
L1a.06	P=RSSQSLVLRGTGYTLN (SEQ ID NO: 249)	P=LVSNRAS (SEQ ID NO: 250)	P=QQYYGMPL (SEQ ID NO: 251)
L1a.07	P=RASQSVSYQYLA (SEQ ID NO: 252)	P=GASSRAT (SEQ ID NO: 253)	P=QQYGSVPR (SEQ ID NO: 254)
L1a.08	P=SGDSLGSYYVH (SEQ ID NO: 255)	P=DDNDRPS (SEQ ID NO: 256)	P=SAYDYSART (SEQ ID NO: 257)
L1a.09	P=SGDNLGSKYVS (SEQ ID NO: 258)	P=DDDDRPS (SEQ ID NO: 259)	P=SSYDFLNIGL (SEQ ID NO: 260)
L1a.10	P=SGDSLGGKSVH (SEQ ID NO: 261)	P=EDSERPS (SEQ ID NO: 262)	P=SSYTNSVD (SEQ ID NO: 263)
L1a.11	P=SGDNLGKKYVG (SEQ ID NO: 264)	P=DDNDRPS (SEQ ID NO: 265)	P=QSYDDTSI (SEQ ID NO: 266)
L1a.12	P=SGDSLGNKYVH (SEQ ID NO: 267)	P=DDSDRPS (SEQ ID NO: 268)	P=QTDYVGY (SEQ ID NO: 269)
L1a.13	P=TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 270)	P=DVSNRPS (SEQ ID NO: 271)	P=QSYDRYRLKN (SEQ ID NO: 272)
3B5.2	P=SASSRVSYVH (SEQ ID NO: 413)	P=DTSNLAS (SEQ ID NO: 414)	P=QQWSTNPPT (SEQ ID NO: 415)
	N=AGTGCCAGCTCAC GTGTAAGTTACGTG CAC (SEQ ID NO: 427)	N=GACACATCCAAC CTGGCTTCT (SEQ ID NO: 428)	N=CAGCAGTGGAGTA CTAACCCACCCACG (SEQ ID NO: 429)
Li81	P= RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 442) N=AGGGCCAGTCAGA GTGTTAGCAGCTACT TAGCC (SEQ ID NO: 445)	P= DASNRAT (SEQ ID NO: 443) N=GATGCATCCAACAGGGC CACT (SEQ ID NO: 446)	P= QQRSNWPMYT (SEQ ID NO: 444) N=CAGCAGCGTAGCAACTG GC CGATGTACACT (SEQ ID NO: 447)

*Determinado pelo sistema de Kabat (vide *supra*).

N=sequência de nucleotídeo, **P**=sequência de polipeptídeo.

[00188] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreendendo a VL específica ou

preferencialmente codificada pelo polinucleotídeo se liga a Sp35.

[00189] Em uma modalidade adicional da invenção, a presente invenção fornece um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma região variável de cadeia leve da imunoglobulina (VL) em que as regiões CDR1, CDR2, e CDR3 são codificadas através de sequências de nucleotídeo são pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idênticas às regiões VL CDR1, CDR2 e CDR3 do polipeptídeo de cadeia leve da imunoglobulina produzido pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8106) ou às regiões VL CDR1, CDR2 e CDR3 do polipeptídeo de cadeia leve da imunoglobulina produzido pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8107).

[00190] Em outra modalidade, a presente invenção fornece um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma região variável de cadeia leve da imunoglobulina (VL) em que as regiões CDR1, CDR2, e CDR3 têm sequências de polipeptídeo que são idênticas aos grupos CDR1, CDR2, e CDR3 mostrados na Tabela 5. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreendendo a VL específica ou preferencialmente codificada pelo polinucleotídeo se liga a Sp35.

[00191] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma região variável de cadeia leve da imunoglobulina (VL) em que as regiões CDR1, CDR2, e CDR3 são codificadas por sequências de nucleotídeo que são idênticas às sequências de nucleotídeo que codificam os grupos CDR1, CDR2, e CDR3 mostrados na Tabela 5. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno

compreendendo a VL específica ou preferencialmente codificada pelo polinucleotídeo se liga a Sp35.

[00192] Em uma modalidade adicional da invenção, a presente invenção fornece um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma região variável de cadeia leve da imunoglobulina (VL) em que as regiões CDR1, CDR2, e CDR3 são codificadas através de sequências de nucleotídeo pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idênticas ao polinucleotídeo que codifica as regiões VL CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8106) ou o polinucleotídeo que codifica as regiões VL CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8107).

[00193] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma VL codificada por um ou mais dos polinucleotídeos descritos acima específica ou preferencialmente se liga ao mesmo epitopo como um anticorpo monoclonal selecionado do grupo que consiste em 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), 1968 (L1a.13), 7P1D5.1G9, 3B5.2 e Li81, ou competitivamente inibirá um tal anticorpo monoclonal de se ligar a Sp35.

[00194] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma VL codificada por um ou mais dos polinucleotídeos descritos acima específica ou preferencialmente se liga a um polipeptídeo de Sp35 ou fragmento do mesmo, ou um polipeptídeo de Sp35 variante, com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação (KD) não maior que 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, ou 10^{-15} M.

[00195] Em uma outra modalidade, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma VH pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idêntica a uma sequência de polipeptídeo de VH de referência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 158 a 172, 372, 376, 380, 384 e 416 mostrados na Tabela 6. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreendendo a VH específica ou preferencialmente codificada pelo polinucleotídeo se liga a Sp35.

[00196] Em outro aspecto, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma sequência de ácido nucleico que codifica uma VH que tem uma sequência de polipeptídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 158 a 172, 372, 376, 380, 384 e 416 mostradas na Tabela 6. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreendendo a VH específica ou preferencialmente codificada pelo polinucleotídeo se liga a Sp35.

TABELA 6 - Sequências de Polipeptídeo de V_H

VH	Sequência	SEQ ID NO:
Li02	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYEMIWVRQAPGKGLEWVSSIGP SGGLTWYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCVRIDDSSGW AFDIWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAP	158
Li09	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSMYMWVRQAPGKGLEWVSIIY PSGGKTMAYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSSRRY YDFWSGYHNYYYMDVWGKGTITVTVSSASTKGPSVFPLAP	159
Li06	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSEYPMWVRQAPGKGLEWVSSIIY SSGGSTVYADSIKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGDSDAF DIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP	160
Li05	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTF SAYAMGWVRQAPGKGLEWVSSIV SSGGYTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGDHNA FDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP	161
Li04	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTF SRYNMGWVRQAPGKGLEWVSIIY PSGGGTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASSIADDAF DIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP	162
Li08	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTF SHYEMWVRQAPGKGLEWVSSIRS SGGATKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKESPDYF DYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAP	163
Li11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMYWVRQAPGKGLEWVSSIST SGGYTGADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTSDNDY YYMDVWGKGTITVTVSSASTKGPSVFPLAP	164
Li10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYPMWVRQAPGKGLEWVSWIG PSGGVTAYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPYSSGW WDFDLWGRGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAP	165
Li01	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTF SKYQMTWVRQAPGKGLEWVSSIIY PSGGNTVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGTTEAV FDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAP	166
Li07	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTF SMYFMGWVRQAPGKGLEWVSSIS PSGGFTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRHAFD IWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP	167
Li03	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTF SQYPMWVRQAPGKGLEWVSGIY PSGGSTVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGQWL GDFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAP	168
Li12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTF SQYNMFVRQAPGKGLEWVSRIS SGGMTMYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREALRPY CSGGSCYSDYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAP	169
1A7	QVQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGW INTDTGEPTYTEDFQGRFAFSLETSASTVYLQFNNLKNEDTATYFCAREGVHF DYWGQGTITVTVSS	170
2F3	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSAASGFTTFSDAWLDWVRQSPEKGLEWVAEIR SKANNHATNYAESVKGRFTISRDDS KSSVYLQMNSLRAEDTGIYFCTPSFAYW GQGTITVTVSS	171
3P1D10 .2C3 e 3P1E11 .3B7	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCRASGYFTFTSSWTQWVKQRPQGGLWIGAIY PGDGDTRYTKFKFGKATLTADKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCARHNSYG MDYWGQGTISVTVSS	172
Li13	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTF SHYEMYWVRQAPGKGLEWVSRIVSS GGFTKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEGDNDAFDIW GQGTITVTVSS	372
Li32	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTF SAYMMQWVRQAPGKGLEWVSSISPS GGNTKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDYGYWFDPW GQGTITVTVSS	376

VH	Sequência	SEQ ID NO:
Li33	EVQLLES GGG LVQP GGS LRLS CAAS GFTFS IYPMFWVRQAPGKGLEWVSWIGPS GGITKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAREGHNDWYFDL WGRGTLTVSS	380
Li34	EVQLLES GGG LVQP GGS LRLS CAAS GFTFS NYEMYWVRQAPGKGLEWVSGIYSS GGITVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAAILDWYFDL WGRGTLTVSS	384
3B5.2	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLS CRASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVIDPS DSYTNYNQKFRGKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARPYGSHWFFD VWGTGTTVTSS	416
PlA7 var. 2	QVQLVQSGHEVVKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNVKQAPGQGLKWMGWINTD TGEPTYTEDFQGRFVFSIDTSASTVYLQISSLKAEDMAMYYCAREGVHFDYWGQ GTLTVSS	432
Li81	EVQLLES GGG LVQP GGS LRLS CAAS GFTFSAYEMKWVRQAPGKGLEWVSVIGPS GGFTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEGDNDADFIDW GQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHED DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEA LHNHYTQKSLSLSPG	433
Li81 (aglic osilad o)	EVQLLES GGG LVQP GGS LRLS CAAS GFTFSAYEMKWVRQAPGKGLEWVSVIGPS GGFTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEGDNDADFIDW GQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHED DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSAYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEA LHNHYTQKSLSLSPG	435

[00197] Em uma outra modalidade, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma V_H pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idêntica a uma sequência de polipeptídeo de V_H de referência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 158-172, 372, 376, 380, 384 e 416,. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreendendo a V_H específica ou preferencialmente codificada pelo polinucleotídeo se liga a Sp35.

[00198] Em outro aspecto, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma sequência de ácido nucleico que codifica

uma VH da invenção, selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 158-172, 372, 376, 380, 384 e 416,. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreendendo a VH específica ou preferencialmente codificada pelo polinucleotídeo se liga a Sp35.

[00199] Em uma modalidade adicional, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma VH pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica a uma sequência de polipeptídeo de VH de referência selecionada do grupo que consiste no polipeptídeo de cadeia pesada da imunoglobulina produzido pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8106) e o polipeptídeo de cadeia pesada da imunoglobulina produzido pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8107).

[00200] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma VH codificada por um ou mais dos polinucleotídeos descritos acima específica ou preferencialmente se liga ao mesmo epitopo como um anticorpo monoclonal selecionado do grupo que consiste em (201') 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), 1968 (L1a.13, 7P1D5.1G9 e 3B5.2, ou competitivamente inibirá um tal anticorpo monoclonal de se ligar a Sp35.

[00201] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma VH codificada por um ou mais dos polinucleotídeos descritos acima específica ou preferencialmente se liga a um polipeptídeo de Sp35 ou fragmento do mesmo, ou um polipeptídeo de Sp35 variante, com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação (KD) não maior que 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, ou 10^{-15} M.

[00202] Em modalidades adicionais, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado que codifica uma cadeia pesada da imunoglobulina, compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma cadeia pesada pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica ao polinucleotídeo da SEQ ID NO: 420 como mostrada abaixo. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreendendo a cadeia pesada específica ou preferencialmente codificada pelo polinucleotídeo se liga a Sp35 e/ou ao mesmo epitopo como o anticorpo monoclonal 3B5.2.

[00203] Sequência do polinucleotídeo de cadeia pesada da imunoglobulina para anticorpo monoclonal quimérico humano murino 3B5.2:

```
ATGGGATGGAGCTGTGTAATGCTCTTGGTATCAACAGCTACAGGTGTCCACT
CCCAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGACTTC
AGTGAAGTTGTCCTGCAGGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATG
CACTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAGTGATTG
ATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAATCAAAAGTTCAGGGGCAAGGCCAC
```

ATTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTG
ACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACCTTACTACGGTAGTC
ACTGGTTCTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGC
CTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACC
TCTGGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC
CGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT
CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC
GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA
AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
GACTCACACATGCCACCCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA
GTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC
TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
AGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA
ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT
CCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG
ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGA
(SEQ ID NO: 420) .

[00204] Em modalidades adicionais, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado que codifica uma região variável de cadeia pesada (V_H), onde o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico de V_H selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs 173 a 184, 370, 374, 378, 382 e 422, como mostradas na Tabela 7. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreendendo a V_H específica ou preferencialmente codificada pelo polinucleotídeo se liga a Sp35.

TABELA 7 - Sequências de Polinucleotídeo de V_H

VH	Sequência	SEQ ID NO:
Li02	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACCTTCTCTACTTACGA GATGATTTGGGTTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT TCTATCGGTCTTCTGGTGGCTTACTTGGTATGCTGACTCCGTAAAG GTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTAAGAATACTCTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGCCATGTATTACTGTGTACGG ATTGATGATAGTAGTGGTTGGGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACCA CGGTCAACCGTCTCAAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCT AGCACCC	173
Li09	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACCTTCTCTATGTA CT TATGGTTTGGGTTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT TATATCTCTCCTTCTGGTGGCAAGACTATGTATGCTGACTCCGTAAAG GTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTAAGAATACTTTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA GATTCGAGACGCCGTATTACGATTTTTGGAGTGGTTATCACAACTACT ACTACTACTACATGGACGTCTGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC AAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCC	174
Li06	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACCTTCTCTGAGTACCC TATGGATTGGGTTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT TCTATCTATTCTTCTGGTGGCTCTACTGTTTATGCTGACTCCATTAAAG GTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTAAGAATACTCTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGA GAGGGTGACTCTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCA CCGTCTCAAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACC C	175
Li05	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACCTTCTCTGCTTACGC TATGGTTTGGGTTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT TCTATCGTTTCTTCTGGTGGCTATACTGATTATGCTGACTCCGTAAAG GTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTAAGAATACTCTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCCAGA GAGGGTGACCATAATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCA CCGTCTCAAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACC C	176
Li04	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACCTTCTCTCGTTACAA TATGGTTTGGGTTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT GTTATCTATCCTTCTGGTGGCGGTACTCATTATGCTGACTCCGTAAAG GTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTAAGAATACTCTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGT TCTATAGCAGATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCA CCGTCTCAAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACC C	177

VH	Sequência	SEQ ID NO:
Li08	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTCATTACGA GATGGTTTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT TCTATCCGTTCTTCTGGTGGCGCTACTAAGTATGCTGACTCCGTAAAG GTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTAAGAATACTCTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAA GAGTCGCCAGACGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCA CCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACC C	178
Li11	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTTCTTACGC TATGTATTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT TCTATCTCTACTTCTGGTGGCTATACTGGTTATGCTGACTCCGTAAAG GTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTAAGAATACTCTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA GATACCAGCGATAATGACTACTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGA CCACGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC GCTAGCACCC	179
Li10	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTACTTACCC TATGGTTTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT TGGATCGGTCTTCTGGTGGCGTTACTGCTTATGCTGACTCCGTAAAG GTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTAAGAATACTCTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA CCCTATAGCAGTGGCTGGTGGGACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCC TGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCT AGCACCC	180
Li01	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTAAGTACCA GATGACTTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT TCTATCTATCCTTCTGGTGGCAATACTGTTTATGCTGACTCCGTAAAG GTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTAAGAATACTCTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGT GGGACTACAGAGGCAGTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCA CCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACC C	181
Li07	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTATGACTT TATGGGTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT TCTATCTCTCCTTCTGGTGGCTTTACTTCTTATGCTGACTCCGTAAAG GTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTAAGAATACTCTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTATTGTGCGAGA GATCGGCATGCTTTTGATATCTGGGGCCAGGGACAATGGTCACCGTCT CAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCC	182
Li03	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTCAGTACCC TATGGAGTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT GGTATCTATCCTTCTGGTGGCTCTACTGTTTATGCTGACTCCGTAAAG GTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTAAGAATACTCTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA GCGGGGCAGTGGCTGGGGGACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGG TCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGC ACCC	183

VH	Sequência	SEQ ID NO:
Li 12	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACCTTCTCTCAGTACAA TATGTTTTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT CGTATCTCTTCTTCTGGTGGCATGACTATGTATGCTGACTCCGTTAAAG GTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATACTCTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA GAAGCGTTACGGCCTTATTGTAGTGGTGGTAGCTGCTACTCCGACTACT ACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC AAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCC	184
Li 13	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACCTTCTCTCATTACGA GATGTATTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT CGTATCGTTCTTCTGGTGGCTTTACTAAGTATGCTGACTCCGTTAAAG GTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATACTCTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACA GAGGGTGATAATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA CCGTCTCAAGC	370
Li 32	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACCTTCTCTGCTTACAT GATGCAGTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT TCTATCTCTCCTTCTGGTGGCAATACTAAGTATGCTGACTCCGTTAAAG GTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATACTCTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA GGAGATTATGGATACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCA CCGTCTCAAGC	374
Li 33	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACCTTCTCTATTTACCC TATGTTTTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT TGGATCGGTCTCTTCTGGTGGCATTACTAAGTATGCTGACTCCGTTAAAG GTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATACTCTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCGAGA GAGGGGCATAACGACTGGTACTTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGG TCACCGTCTCAAGC	378
Li 34	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACCTTCTCTAATTACGA GATGTATTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT GGTATCTATTCTTCTGGTGGCATTACTGTTTATGCTGACTCCGTTAAAG GTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATACTCTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCTAGG GCAGCCATCCTCGACTGGTACTTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGG TCACCGTCTCAAGC	382
3B5.2	CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGACTT CAGTGAAGTTGTCCTGCAGGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTG GATGCACTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGA GTGATTGATCCTTCTGATAGTTATACTAATACTACAATCAAAAGTTCAAGG GCAAGGCCACATTGACTGTAGACACATCTCCAGCACAGCCTACATGCA GCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGA CCTTACTACGGTAGTCACTGGTTCTTCGATGCTCTGGGGCACAGGGACCA CGGTCACCGTCTCCTCA	422

VH	Sequência	SEQ ID NO:
Li81	GAAGTACAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTGCTTACGA GATGAAGTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT GTTATCGGTCCTTCTGGTGGCTTTACTTTTTATGCTGACTCCGTAAAG GTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTAAGAATACTCTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACA GAGGGTGATAATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA CCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACC CTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCC TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACT CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGAGACAAGACTCACACATGCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCCGGT	448

VH	Sequência	SEQ ID NO:
Li81 aglicos ilado	GAAGTACAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTGCTTACGA GATGAAGTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCT GTTATCGGTCTTCTGGTGGCTTTACTTTTTATGCTGACTCCGTAAAG GTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACA GAGGGTGATAATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA CCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACC CTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAATCAGGCGCCC TGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCCTACAGTCCTCAGGACT CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAGACTCACACATGCCACC GTGCCCAGCACCTGAATCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC CCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCGCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCCGGT	450

[00205] Em uma outra modalidade, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico de codificação de VH pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idêntica a uma sequência de ácido nucleico de referência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 173-184, 370, 374, 378, 382 e 422 da Tabela 7. Em certas modalidades, o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo de VH que específica ou preferencialmente se liga a Sp35.

[00206] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma VH codificada por um ou mais dos polinucleotídeos descritos acima específica ou preferencialmente se liga ao mesmo epítipo como um anticorpo monoclonal selecionado do grupo que consiste em (201') 3A3, 3A6,

1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), 1968 (L1a.13), 3B5.2 e Li81 ou competitivamente inibirá um tal anticorpo monoclonal de se ligar a Sp35.

[00207] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma VH codificada por um ou mais dos polinucleotídeos descritos acima específica ou preferencialmente se liga a um polipeptídeo de Sp35 ou fragmento do mesmo, ou um polipeptídeo de Sp35 variante, com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação (KD) não maior que 5 x 10⁻² M, 10⁻² M, 5 x 10⁻³ M, 10⁻³ M, 5 x 10⁻⁴ M, 10⁻⁴ M, 5 x 10⁻⁵ M, 10⁻⁵ M, 5 x 10⁻⁶ M, 10⁻⁶ M, 5 x 10⁻⁷ M, 10⁻⁷ M, 5 x 10⁻⁸ M, 10⁻⁸ M, 5 x 10⁻⁹ M, 10⁻⁹ M, 5 x 10⁻¹⁰ M, 10⁻¹⁰ M, 5 x 10⁻¹¹ M, 10⁻¹¹ M, 5 x 10⁻¹² M, 10⁻¹² M, 5 x 10⁻¹³ M, 10⁻¹³ M, 5 x 10⁻¹⁴ M, 10⁻¹⁴ M, 5 x 10⁻¹⁵ M, ou 10⁻¹⁵ M.

[00208] Em uma modalidade adicional, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma VH pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica a uma sequência de polinucleotídeo de VH de referência selecionada do grupo que consiste no polinucleotídeo que codifica a cadeia pesada da imunoglobulina produzido pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8106) e o polinucleotídeo que codifica a cadeia pesada da

imunoglobulina produzido pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8107).

[00209] Em uma outra modalidade, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma VL pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idêntica a uma sequência de polipeptídeo de VL de referência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381, 385 e 417 mostradas na Tabela 8. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreendendo a VL específica ou preferencialmente codificada pelo polinucleotídeo se liga a Sp35.

[00210] Em outro aspecto, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma sequência de ácido nucleico que codifica uma VL que tem uma sequência de polipeptídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381 385 e 417, mostradas na Tabela 8. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreendendo a VL específica ou preferencialmente codificada pelo polinucleotídeo se liga a Sp35.

TABELA 8 - Sequências de Polipeptídeo de V_L

VL	Sequência	SEQ ID NO:
Li02	FYSHSAQYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKFASWYQQKAGQ SPVLV IFQDRKRLSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTN TVVFGGGTKLTVLGQPKAAP	273
Li09	FYSHSAQDIQMTQSPSSLSAFVGDRAITCRASQSIDTYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASKLEDGVPSRFRSGSGTGDTFTLTIRSLQPEDFGTTY CQQSYSPPLTFGGGTKVEIKRTVAAP	274
Li06	FYSHSAQDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKP GKAPNLLIYAASSLRTGVPSRFRSGSGTGDTFTLTISLQPEDFATYY CLQDYSYPLTFGQGTKLEIKRTVAAP	275
Li05	FYSHSAQSVLTQPPSVSVAPGQTARISCGDNIGSKSVHWYQQRPGQ APVLVVDYDRPSGIPERFSGSNSGDTAILTITRVEVGDEADFYCQ VRDSRTEERVFGGGTKVTVLGQPKAAP	276
Li08	FYSHSAQDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISYYLNWYQQKP GKAPKVLIIYDVSNLQTVPSRFRSGSASATDFTLTISLQPEDIATYY CQQSDNLPLTFGGGTKVEIKRTVAAP	277

VL	Sequência	SEQ ID NO:
Li11	FYSHSAQDIQMTQSPSSVSAPIGDRVITITCRASQEIANYLAWYQQKP GKAPK LLIYDITYTLQTDVPPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDTATYFCQQAD IFPLSFG GGTKVEIKRTVAAP	278
Li10	FYSHSAQDIQMTQSPSSMSASVGDVTITCRASQGIGNWLAWYQQKP GKAP TLLIYAASSLESQVPSRFTGSGSSSGIDFTLTISDLHPEDLATYYCQ QAQTFPLTFGGGTRVDLKRRTVAAP	279
Li01	FYSHSAQDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQADRFPVTFGGGTKVEIKRTVAAP	280
Li07	FYSHSAQSELTQPPSVSVSPGQTAIITCSGDQLGDKHVAWYQQKPGQ SPVLVIYLDIKRPAGISERFSGSNSGNTATLTIRGTQAMDEADYYCQ AWDIKTVFGGGKLTVLSQPKAAP	281
Li03	FYSHSAQDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQSYSTPWTFGGQTKVEIKRTVAAP	282
1A7	QIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWI YDTSKLASGVPARFSGSGSGTYSYSLTISMEADAATYYCQQWSSNP FTFGSGTKLEIK	283
2F3	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIYNYLAWFQQKQKSPQLL VYNAKTLPDGVPSRFSGSGSGTQYFLKINSLQPEDFGSYCQHFQWAI PYTFGGGKLE IKR	284
3P1D10. 2C3	DIVMTQSPSSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTINSVQAEDLAVYYC QNDYSYPLFTFGSGTKLEIR	285
3P1E11. 3B7	DIVMTQSPSSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKSYLTWYQQKPG QPPK LLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTINSVQAEDLAVYYCQNDY SYPLF TFGSGTKLEIR	286
Li13	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLL IYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNW PMYTFGGGKLEIK	373
Li32	DIQMTQSPDLSASVGDRTITCQASQDISYLNWYQQKPGMAPKLL IYDAFILEGGAPSRFSGSGSGTDFSTISNLQPEDATYFCQQSDQL PVTFGGQTKVEIR	377
Li33	DIQMTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLL IYDASNRTGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYDKW PLTFGGGKVEIK	381
Li34	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCHASQDISNYLSWYQQKPGKAPKLL IYDAFNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDFATYYCQHYDNL PFTFGPGTRVAIR	385
3B5.2	QIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSRVSYVHWYQQKSGTSPKRWL YDTSNLASGVPARFGGNGSGTYSYSLTISMEADAATYYCQQWSTNP PTFGGKLEIK	417

VL	Sequência	SEQ ID NO:
P1A7 var. 1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHYQQKPGQAPRrLI YDTSKLGASGIPARFSGSGSDyTLTISSELPEDFAVYYCQWSSNP FTFGQGTKVEIK	430
P1A7 var. 2	qIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHYQQKPGQAPRrLI YDTSKLGASGIPARFSGSGSDyTLTISSELPEDFAVYYCQWSSNP FTFGQGTKVEIK	431
Li81	DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLI IYDASNRATGIPARFSGSGSDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNW PMYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	434

[00211] Em uma outra modalidade, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma VL pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idêntica a uma sequência de polipeptídeo de VL de referência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381 385 e 417, como mostradas na Tabela 8. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreendendo a VL específica ou preferencialmente codificada pelo polinucleotídeo se liga a Sp35.

[00212] Em outro aspecto, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma sequência de ácido nucleico que codifica uma VL da invenção, selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381, 385 e 417. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreendendo a VL específica ou preferencialmente codificada pelo polinucleotídeo se liga a Sp35.

[00213] Em uma modalidade adicional, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma VL pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica a uma sequência de polipeptídeo de VL de referência selecionada do grupo que consiste no polipeptídeo de cadeia leve da imunoglobulina produzido pelo hibridoma

2.P3B5.2 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8106) e o polipeptídeo de cadeia leve da imunoglobulina produzido pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8107).

[00214] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma VL codificada por um ou mais dos polinucleotídeos descritos acima específica ou preferencialmente se liga ao mesmo epitopo como um anticorpo monoclonal selecionado do grupo que consiste em 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), 1968 (L1a.13), 7P1D5.1G9, 3B5.2 e Li81, ou competitivamente inibirá um tal anticorpo monoclonal de se ligar a Sp35.

[00215] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma VL codificada por um ou mais dos polinucleotídeos descritos acima específica ou preferencialmente se liga a um polipeptídeo de Sp35 ou fragmento do mesmo, ou um polipeptídeo de Sp35 variante, com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação (KD) não maior que 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M,

ou 10-15 M.

[00216] Em modalidades adicionais, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado que codifica uma cadeia leve de imunoglobulina onde o polinucleotídeo é um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma cadeia leve pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica ao polinucleotídeo da SEQ ID NO: 421 como mostrada abaixo. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreendendo a cadeia leve específica ou preferencialmente codificada pelo polinucleotídeo se liga a Sp35 e ou ao mesmo epitopo como o anticorpo monoclonal 3B5.2.

[00217] Sequência de polinucleotídeo de cadeia leve da imunoglobulina para o anticorpo quimérico murino e humano 3B5.2:

ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCA
TAATATCCAGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGC
ATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCACGTGTAAGT
TACGTGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAGATGGCTTT
ATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCGGTGGCAATGG
GTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCT
GCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTACTAACCCACCCACGTTTCGGAGGGG
GGACCAAGCTGGAAATAAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT
CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTG
CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACG
CCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGA
CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG
AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG
TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 421).

[00218] Em modalidades adicionais, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado que codifica uma região variável de cadeia leve (V_L), onde o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico de V_L selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs 185

a 194, 371, 375, 379, 383 e 423 como mostradas na Tabela 9. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno compreendendo a V_L específica ou preferencialmente codificada pelo polinucleotídeo se liga a Sp35.

TABELA 9 - Sequências de Polinucleotídeo de V_L

VL	Sequência	SEQ ID NO:
Li02	TTCTATTCTCACAGTGCACAGTACGAATTGACTCAGCCACCCTCAGTGTC CGTGTCCTCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCTGGAGATAAATTGG GGGATAAATTTGCTTCCTGGTATCAGCAGAAGGCAGGCCAGTCCCTGTG CTGGTCATCTTTCAAGATAGGAAGCGTCTCTCAGGGATCCCTGAGCGATT CTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCC AGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTGAGCGTGGGACACCAACACT GTGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTAGGTGAGCCCAAGGC TGCCCCC	185
Li09	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATTTGTGGGAGACAGAGTCGCCATCACTTGCCGCGCAAGTC AGAGCATCGACACCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCC CCTAAACTCCTGATCTATGCTGCATCCAAGTTGGAAGACGGGGTCCCATC AAGATTGAGTGGCAGTGGAACTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGAA GTCTGCAACCTGAAGATTTTGGAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGT CCCCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGT GGCTGCACCA	186
Li06	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCAC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTC AGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCC CCTAACCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTACGAACTGGGGTCCCATC AAGATTGAGGGGAGTGGATCTGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGCA GCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCACGTATTACTGTCTACAAGATTACAGT TACCCCTCTCACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGT GGCTGCACCA	187
Li05	TTCTATTCTCACAGTGCACAGAGCGTCTTGACTCAGCCACCCTCGGTGTC AGTGGCCCCAGGCCAGACGGCCAGGATTTCTGTGGGGGAGACAACATTG GAAGTAAGAGTGTCCACTGGTACCAGCAGAGGCCAGGCCAGGCCCTGTG CTGGTCGTGTATGATGATTATGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATT CTCTGGCTCCAACCTCTGGGGACACGGCCATCCTGACCATCACCAGGGTCG AAGTCGGGGATGAGGCCGACTTTTATTGTGAGGTGAGGGACAGCCGTACT GAGGAACGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGACCGTCTTAGGTGAGCC CAAGGCTGCCCCC	188
Li08	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTC AGGACATTAGTTACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAGCCAGGGAAGCC CCTAAGGTCCTGATCTACGATGTATCCAATTTGCAAACAGGGGTCCCATC AAGGTTGAGTGGAACTGCGTCTGCGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCA GCCTGCAGCCTGAAGATATTGCGACATATTACTGTCAACAGTCTGATAAT CTCCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATTAAACGAACTGT GGCTGCACCA	189

VL	Sequência	SEQ ID NO:
Li11	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTC TGTGTCTGCACCTATAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGAGTC AGGAGATTGCCAACTACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC CCTAAGCTCCTGATCTATGATACATACTTTGCAGACTGACGTCCCACC GAGGTTTCAGCGGCAGTGGTTCGGGGACAGATTTCCTCTCACTATCAGCA GCCTGCAGCCTGAAGATACTGCACTTACTTTTGTCAACAGGCTGACATT TTCCCGCTCTCTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGT GGCTGCACCA	190
Li10	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTC CATGTCTGCTTCTGTAGGGGACACAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGAGTC AGGGTATTGGCAACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC CCAACCTCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATC AAGGTTACCGGCAGCGGCAGTTCCTCTGGGATAGATTTCACTCTCACCA TCAGCGACCTGCACCCTGAAGATTGGCAACTTACTATTGTCAACAGGCT CAGACTTTCCCGCTCACCTTCGGCGGAGGGACAGGGTGGACCTCAAGCG AACTGTGGCTGCACCA	191
Li01	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAGGCGAGTC AGGACATTAGCAACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC CCTAAGCTCCTGATCTACGATGCATCCAATTTGGAAACAGGGTCCCATC AAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCA GCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCACTTACTATTGTCAACAGGCTGACAGG TTCCCTGCGGTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAAC TGTGGCTGCACCA	192
Li07	TTCTATTCTCACAGTGCACAGAGCGAATTGACTCAGCCACCCTCAGTGTC CGTGTCCTCCAGGACAGACAGCCATCATCACCTGCTCTGGAGATCAGTTGG GTGACAAACATGTGGCTTGGTATCAACAGAAGCCAGGCCAGTCCCTGTG CTGGTCATCTATCTAGACATTAAGAGGCCCGCAGGGATTTCTGAGCGATT CTCTGGCTCCAACTCTGGAAATACAGCCACTCTGACCATCAGAGGGACCC AGGCTATGGATGAAGCTGACTATTACTGTCTAGGCGTGGGACATCAAGACG GTCTTCGGCGGGGGACCAAGCTGACCGTCTCTGAGTCAGCCCAAGGCTGC CCCC	193
Li03	TTCTATTCTCACAGTGCACAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCTGGGCAAGTC AGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC CCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAGAAAGTGGGGTCCCATC AAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCA GTCTGCAACCTGAAGATTTTGCACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGT ACCCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGT GGCTGCACCA	194
Li13	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAG CCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGAT GCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTC TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTG CAGTTTATTACTGTCTAGCAGCGTAGCAACTGGCCGATGTACACTTTTGGC CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	371

VL	Sequência	SEQ ID NO:
Li32	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGA CAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAAGACATTAGCTACTATTTAA ATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGATGGCCCCCTAACTCCTCATCTACGAT GCCTTCATTTTGGAAAGGAGGGGCCCCATCACGGTTCAGTGGGAGCGGCTC TGGGACAGATTTTCTTTTACCATCAGCAATCTACAGCCTGAGGATATTG CAACTTATTTCTGTCAACAGTCTGATCAACTGCCCGTGACCTTCGGCCAA GGGACCAAGGTGGAAATCAGA	375
Li33	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAG CCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGAT GCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTC TGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAGGATTTTG CAGTTTATTACTGTCAGCAGTATGATAAGTGGCCGCTCACTTTTCGGCGGA GGGACCAAGGTGGAGATCAAA	379
Li34	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA CAGAGTCACCATCACTTGCCATGCAGTCAGGACATTAGCAACTATTTAA GTTGGTATCAGCAGAAACCAGGTAAAGCCCCCTAACTCCTGATCTACGAT GCTTTCAATTTGGAGACAGGAGTCCCATCGAGGTTTCAGTGGAAAGTGGATC TGGCACAGATTTTACATTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTG CAACATATTACTGTCAGCACTATGATAATCTCCCATTCACCTTCGGCCCT GGGACCAGAGTGGCGATCAGA	383
3B5.2	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGA GAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCACGTGTAAGTTACGTGCACT GGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGCTTTATGACACA TCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCGGTGGCAATGGGTCTGG GACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCA CTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTACTAACCACCCACGTTTCGGAGGGGGG ACCAAGCTGGAAATAAAA	423
Li81	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAG CCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGAT GCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTC TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTG CAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCGATGTACACTTTTGGC CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG TGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAG GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCA GGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG	449

[00219] Em uma outra modalidade, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma VL pelo menos 80%, 85%, 90%, ou 95% idêntica a um polinucleotídeo de VL selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 185-194, 371, 375, 379, 383 e 423 da Tabela 9. Em certas modalidades, o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo de VL que especifica ou preferencialmente se

liga a Sp35.

[00220] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma VL codificada por um ou mais dos polinucleotídeos descritos acima específica ou preferencialmente se liga ao mesmo epitopo como um anticorpo monoclonal selecionado do grupo que consiste em 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), 1968 (L1a.13), 3B5.2 e Li81, ou competitivamente inibirá um tal anticorpo monoclonal de se ligar a Sp35.

[00221] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma VL codificada por um ou mais dos polinucleotídeos descritos acima específica ou preferencialmente se liga a um polipeptídeo de Sp35 ou fragmento do mesmo, ou um polipeptídeo de Sp35 variante, com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação (KD) não maior que 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, ou 10^{-15} M.

[00222] Em uma modalidade adicional, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente

em, ou consistindo em um ácido nucleico que codifica uma VL pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idêntica a uma sequência de polinucleotídeo de VL de referência selecionada do grupo que consiste no polinucleotídeo que codifica a cadeia leve de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8106) e o polinucleotídeo que codifica a cadeia leve de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8107).

[00223] Qualquer um dos polinucleotídeos descritos acima pode também incluir ácidos nucleicos adicionais, codificando, por exemplo, um peptídeo sinal para direcionar a secreção do polipeptídeo codificado, regiões constantes de anticorpo como descritas aqui, ou outros polipeptídeos heterólogos como descritos aqui.

[00224] Também, como descrito em outro lugar em mais detalhe aqui, a presente invenção inclui composições compreendendo os polinucleotídeos compreendendo um ou mais dos polinucleotídeos descritos acima. Em uma modalidade, a invenção inclui composições compreendendo um primeiro polinucleotídeo e segundo polinucleotídeo em que o dito primeiro polinucleotídeo codifica um polipeptídeo de VH como descrito aqui e em que o dito segundo polinucleotídeo codifica um polipeptídeo de VL como descrito aqui. Especificamente uma composição que compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em um polinucleotídeo de VH, como mostrado na Tabela 7, e um polinucleotídeo de VL, como mostrado na Tabela 9, em que o dito polinucleotídeo de VH e o dito polinucleotídeo de VL são selecionados do grupo que consiste em:

- i) SEQ ID NO: 173 e SEQ ID NO: 185;
- ii) SEQ ID NO: 174 e SEQ ID NO: 186;
- iii) SEQ ID NO: 175 e SEQ ID NO: 187;
- iv) SEQ ID NO: 176 e SEQ ID NO: 188;

- v) SEQ ID NO: 178 e SEQ ID NO: 189;
- vi) SEQ ID NO: 179 e SEQ ID NO: 190;
- vii) SEQ ID NO: 180 e SEQ ID NO: 191;
- viii) SEQ ID NO: 181 e SEQ ID NO: 192;
- ix) SEQ ID NO: 182 e SEQ ID NO: 193;
- x) SEQ ID NO: 183 e SEQ ID NO: 194;
- xi) SEQ ID NO: 370 e SEQ ID NO: 371;
- xii) SEQ ID NO: 374 e SEQ ID NO: 375;
- xiii) SEQ ID NO: 378 e SEQ ID NO: 379;
- xiv) SEQ ID NO: 382 e SEQ ID NO: 385;
- xv) SEQ ID NO: 422 e SEQ ID NO: 423;
- xvi) SEQ ID NO: 448 e SEQ ID NO: 449; e
- xvii) SEQ ID NO: 450 e SEQ ID NO: 449.

[00225] A presente invenção também inclui fragmentos dos polinucleotídeos da invenção, como descritos em outro lugar. Adicionalmente polinucleotídeos que codificam polinucleotídeos de fusão, fragmentos de Fab, e outros derivados, como descritos aqui, são também contemplados pela invenção.

[00226] Os polinucleotídeos podem ser produzidos ou fabricados por qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, se a sequência de nucleotídeo do anticorpo for conhecida, um polinucleotídeo que codifica o anticorpo pode ser montado de oligonucleotídeos quimicamente sintetizados (por exemplo, como descrito em Kutmeier et al., BioTechniques 17:242 (1994)) o que, brevemente, envolve a síntese de sobreposição dos oligonucleotídeos contendo porções da sequência que codifica o anticorpo, anelamento e ligação daqueles oligonucleotídeos, e depois amplificação dos oligonucleotídeos ligados por PCR.

[00227] Alternativamente, um polinucleotídeo que codifica um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou

derivado do mesmo pode ser gerado de ácido nucleico de uma fonte adequada. Se um clone contendo um ácido nucleico que codifica um anticorpo particular não estiver disponível, mas a sequência da molécula de anticorpo for conhecida, um ácido nucleico que codifica o anticorpo pode ser quimicamente sintetizado ou pode ser obtido de uma fonte adequada (por exemplo, uma biblioteca de cDNA de anticorpo, ou uma biblioteca de cDNA gerada de, ou ácido nucleico, preferivelmente poly A+RNA, isolado de, qualquer tecido ou células que expressam o anticorpo ou outro anticorpo de Sp35, tais como células de hibridoma selecionadas para expressar um anticorpo) por amplificação de PCR usando iniciadores sintéticos hidrolisáveis nas terminações 3' e 5' da sequência ou clonagem usando uma sonda de oligonucleotídeo específica para a sequência de gene particular para identificar, por exemplo, um clone de cDNA de uma biblioteca de cDNA que codifica o anticorpo ou outro anticorpo de Sp35. Ácidos nucleicos amplificados gerados por PCR podem ser depois clonados em vetores de clonagem replicáveis usando qualquer método bem-conhecido na técnica.

[00228] Uma vez que a sequência de nucleotídeo e a sequência de aminoácido correspondente do anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo seja determinada, sua sequência de nucleotídeo pode ser manipulada usando métodos bem-conhecidos na técnica pela manipulação de sequências de nucleotídeo, por exemplo, técnicas de DNA recombinante, mutagênese loco-dirigida, PCR, etc. (vide, por exemplo, as técnicas descritas em Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) e Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NI (1998) que são ambas incorporadas por referência aqui em suas totalidades), para gerar anticorpos tendo uma sequência de aminoácido diferente, por exemplo, para criar substituições, deleções, e/ou

inserções de aminoácidos.

[00229] Um polinucleotídeo que codifica um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo pode ser composto de qualquer polirribonucleotídeo ou polideoxirribonucleotídeo que pode ser RNA ou DNA inalterado ou RNA ou DNA modificado. Por exemplo, um polinucleotídeo que codifica anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo pode ser composto de DNA uni e bifilamentar, DNA sendo uma mistura de regiões uni e bifilamentares, RNA uni e bifilamentar, e RNA sendo mistura de regiões uni e bifilamentares, moléculas híbridas compreendendo o DNA e RNA que podem ser unifilamentares ou, mais tipicamente, bifilamentares ou uma mistura de regiões uni e bifilamentares. Além disso, um polinucleotídeo que codifica um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo pode ser composto de regiões trifilamentares compreendendo RNA ou DNA ou RNA e DNA. Um polinucleotídeo que codifica um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo pode também conter uma ou mais bases modificadas ou cadeias principais de DNA ou RNA modificadas para estabilidade ou por outras razões. Bases "modificadas" incluem, por exemplo, bases tituladas e bases incomuns tais como inosina. Uma variedade de modificações pode ser feita ao DNA e RNA; desse modo, "polinucleotídeo" abrange formas química, enzimática, ou metabolicamente modificadas.

[00230] Um polinucleotídeo isolado que codifica uma variante não-natural de um polipeptídeo derivado de uma imunoglobulina (por exemplo, uma porção de cadeia pesada ou porção de cadeia leve da imunoglobulina) pode ser criado introduzindo uma ou mais substituições, adições ou deleções de nucleotídeo na sequência de nucleotídeo da imunoglobulina de modo que uma ou mais substituições,

adições ou deleções de aminoácido sejam introduzidas na proteína codificada. Mutações podem ser introduzidas por técnicas-padrão, tais como mutagênese dirigida e mutagênese mediada por PCR. Preferivelmente, substituições de aminoácido conservadoras são feitas em um ou mais resíduos de aminoácido não-essenciais.

V. POLIPEPTÍDEOS DE SP35 ANTICORPO

[00231] A presente invenção é também direcionada a polipeptídeos isolados que compõem anticorpos de Sp35, fragmentos de ligação de antígeno, variantes ou derivados dos mesmos. Anticorpos de Sp35 da presente invenção compreendem polipeptídeos, por exemplo, sequências de aminoácido que codificam regiões de ligação de antígeno Sp35-específico derivadas das moléculas de imunoglobulina. Uma sequência de polipeptídeo ou de aminoácido "derivada de" uma proteína designada refere-se à origem do polipeptídeo. Em certos casos, a sequência de polipeptídeo ou de aminoácido que é derivada de um polipeptídeo de partida particular ou sequência de aminoácido tem uma sequência de aminoácido que é essencialmente idêntica à da sequência de partida, ou uma porção da mesma, em que a porção consiste em pelo menos 10-20 aminoácidos, pelo menos 20-30 aminoácidos, pelo menos 30-50 aminoácidos, ou que é do contrário identificável a alguém versado na técnica como tendo sua origem na sequência de partida.

[00232] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um polipeptídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma região variável de cadeia pesada da imunoglobulina (VH), onde pelo menos uma das CDRs da região variável de cadeia pesada ou pelo menos duas das CDRs da região variável de cadeia pesada são pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às sequências de aminoácido de CDR de cadeia pesada¹, CDR2 ou CDR3 de referência dos anticorpos de Sp35 monoclonais descritos aqui. Alternativamente, as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 da

VH são pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às sequências aminoácido de CDR de cadeia pesada1, CDR2 e CDR3 de referência dos anticorpos de Sp35 monoclonais descritos aqui. Desse modo, de acordo com esta modalidade uma região variável de cadeia pesada da invenção tem sequências de polipeptídeo de CDR1, CDR2, e CDR3 relacionadas aos grupos mostrados na Tabela 4, supra. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno que específica ou preferencialmente compreende o polipeptídeo de VH se liga a Sp35.

[00233] Em outra modalidade, a presente invenção fornece um polipeptídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma região variável de cadeia pesada da imunoglobulina (VH) em que as regiões CDR1, CDR2, e CDR3 têm sequências de polipeptídeo que são idênticas aos grupos CDR1, CDR2, e CDR3 mostrados na Tabela 4. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno que específica ou preferencialmente compreende o polipeptídeo de VH se liga a Sp35.

[00234] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um polipeptídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma região variável de cadeia pesada da imunoglobulina (VH), onde pelo menos uma das CDRs da região variável de cadeia pesada ou pelo menos duas das CDRs da região variável de cadeia pesada são pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idênticas às sequências de aminoácido de CDR de cadeia pesada1, CDR2 e CDR3 de referência selecionadas do grupo que consiste nas sequências de aminoácido de VH de CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8106) e as sequências de aminoácido CDR1, CDR2 e CDR3 de VH da cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9

(Designação de Depósito de ATCC PTA-8107).

[00235] Em uma outra modalidade, a presente invenção inclui um polipeptídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um polipeptídeo de VH pelo menos 80%, 85%, 90% 95% ou 100% idêntico a uma sequência de polipeptídeo de VH de referência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 158 a 172, 372, 376, 380, 384, 416 e 433, como mostradas na Tabela 6 e SEQ ID NO: 435. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno que específica ou preferencialmente compreende o polipeptídeo de VH se liga a Sp35.

[00236] Em outro aspecto, a presente invenção inclui um polipeptídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um polipeptídeo de VH selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 158 a 172, 372, 376, 380, 384, 416 e 433, como mostradas na Tabela 6 e SEQ ID NO: 435. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno que específica ou preferencialmente compreende o polipeptídeo de VH se liga a Sp35.

[00237] Em uma outra modalidade, a presente invenção inclui um polipeptídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um polipeptídeo de VH pelo menos 80%, 85%, 90% 95% ou 100% idêntico a uma sequência de polipeptídeo de VH de referência selecionada do grupo que consiste na cadeia pesada de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8106) e na cadeia pesada da imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8107).

[00238] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ou mais dos polipeptídeos

de VH descritos acima específica ou preferencialmente se liga ao mesmo epitopo como um anticorpo monoclonal selecionado do grupo que consiste em 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), 1968 (L1a.13), 7P1D5.1G9, 3B5.2 e Li81, ou competitivamente inibirá um tal anticorpo monoclonal de se ligar a Sp35.

[00239] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ou mais dos polipeptídeos de VH descritos acima específica ou preferencialmente se liga a um polipeptídeo de Sp35 ou fragmento do mesmo, ou um polipeptídeo de Sp35 variante, com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação (KD) não maior que 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, ou 10^{-15} M.

[00240] Em outra modalidade, a presente invenção fornece um polipeptídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma região variável de cadeia leve da imunoglobulina (VL), onde pelo menos uma das CDRs da região variável de cadeia leve ou pelo menos duas das CDRs da região variável de cadeia leve são pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às sequências de aminoácido de CDR1, CDR2, ou CDR3 de cadeia pesada de referência

de anticorpos de Sp35 monoclonais descritos aqui. Alternativamente, as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 da VL são pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idênticas às sequências de aminoácido de CDR1, CDR2, e CDR3 de cadeia leve de referência de anticorpos de Sp35 monoclonais descritos aqui. Desse modo, de acordo com esta modalidade uma região variável de cadeia leve da invenção tem sequências de polipeptídeo de CDR1, CDR2, e CDR3 relacionadas aos polipeptídeos mostrados na Tabela 5, supra. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno que específica ou preferencialmente compreende o polipeptídeo de VL se liga a Sp35.

[00241] Em outra modalidade, a presente invenção fornece um polipeptídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma região variável de cadeia leve da imunoglobulina (VL) em que as regiões CDR1, CDR2, e CDR3 têm sequências de polipeptídeo que são idênticas aos grupos CDR1, CDR2, e CDR3 mostrados na Tabela 5. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno que específica ou preferencialmente compreende o polipeptídeo de VL liga a Sp35.

[00242] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um polipeptídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em uma região variável de cadeia leve da imunoglobulina (VL), onde pelo menos uma das CDRs da região variável de cadeia leve ou pelo menos duas das CDRs da região variável de cadeia leve são pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% idênticas às sequências de aminoácido de CDR de cadeia leve1, CDR2 e CDR3 de referência selecionadas do grupo que consiste nas sequências aminoácido de VL de CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8106) e nas sequências de aminoácido de VL de CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9

(Designação de Depósito de ATCC PTA-8107).

[00243] Em uma outra modalidade, a presente invenção inclui um polipeptídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um polipeptídeo de VL pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idêntico a uma sequência de polipeptídeo de VL de referência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381, 385, 417 e 434, mostradas na Tabela 8. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno que específica ou preferencialmente compreende o polipeptídeo de VL se liga a Sp35.

[00244] Em outro aspecto, a presente invenção inclui um polipeptídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um polipeptídeo de VL selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 273 a 286, 373, 377, 381, 385, 417 e 434, mostradas na Tabela 8,. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno que específica ou preferencialmente compreende o polipeptídeo de VL se liga a Sp35.

[00245] Em uma outra modalidade, a presente invenção inclui um polipeptídeo isolado compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um polipeptídeo de VL pelo menos 80%, 85%, 90% 95% ou 100% idênticos a uma sequência de polipeptídeo de VL de referência selecionada do grupo que consiste na VL da cadeia leve de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8106) e na VL da cadeia leve de imunoglobulina produzida pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8107).

[00246] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreendendo, consistindo essencialmente em, um ou mais dos polipeptídeos de VL descritos acima específica ou preferencialmente se liga ao mesmo epitopo como

um anticorpo monoclonal selecionado do grupo que consiste em 201', 3A3, 3A6, 1A7, 1G7, 2B10, 2C11, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C6.3G10.2H7, 3P2C9.2G4, 3P4A6.1D9, 3P4A1.2B9, 3P4C2.2D2, 3P4C5.1D8, 3P4C8.2G9, 30-C12 (Li01), 38-D01 (Li02), 35-E04 (Li03), 36-C09 (Li04), 30-A11 (Li05), 34-F02 (Li06), 29-E07 (Li07), 34-G04 (Li08), 36-A12 (Li09), 28-D02 (Li10), 30-B01 (Li11), 34-B03 (Li12), Li13, Li32, Li33, Li34, 3383 (L1a.1), 3495(L1a.2), 3563 (L1a.3), 3564 (L1a.4), 3565 (L1a.5), 3566 (L1a.6), 3567 (L1a.7), 3568 (L1a.8), 3569 (L1a.9), 3570 (L1a.10), 3571 (L1a.11), 3582 (L1a.12), 1968 (L1a.13), 7P1D5.1G9, 3B5.2 e Li81, ou competitivamente inibirá um tal anticorpo monoclonal de se ligar a Sp35.

[00247] Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreendendo, consistindo essencialmente em, ou consistindo em um ou mais dos polipeptídeos de VL descritos acima específica ou preferencialmente se liga a um polipeptídeo de Sp35 ou fragmento do mesmo, ou um polipeptídeo de Sp35 variante, com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação (KD) não maior que 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, ou 10^{-15} M.

[00248] Em outras modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreende, consiste essencialmente em ou consiste em um polipeptídeo de VH, como mostrado na Tabela 6, e um polipeptídeo de VL, como mostrado na Tabela 8, selecionados do grupo que consiste em:

- i) SEQ ID NO: 170 e SEQ ID NO: 283;
- ii) SEQ ID NO: 171 e SEQ ID NO: 284;
- iii) SEQ ID NO: 172 e SEQ ID NO: 285;

- iv) SEQ ID NO: 172 e SEQ ID NO: 286;
- v) SEQ ID NO: 158 e SEQ ID NO: 273;
- vi) SEQ ID NO: 159 e SEQ ID NO: 274;
- vii) SEQ ID NO: 160 e SEQ ID NO: 275;
- viii) SEQ ID NO: 161 e SEQ ID NO: 276;
- ix) SEQ ID NO: 163 e SEQ ID NO: 277;
- x) SEQ ID NO: 164 e SEQ ID NO: 278;
- xi) SEQ ID NO: 165 e SEQ ID NO: 279;
- xii) SEQ ID NO: 166 e SEQ ID NO: 280;
- xiii) SEQ ID NO: 167 e SEQ ID NO: 281;
- xiv) SEQ ID NO: 168 e SEQ ID NO: 282;
- xv) SEQ ID NO: 372 e SEQ ID NO: 373;
- xvi) SEQ ID NO: 376 e SEQ ID NO: 377;
- xvii) SEQ ID NO: 380 e SEQ ID NO: 381;
- xviii) SEQ ID NO: 384 e SEQ ID NO: 385;
- xix) SEQ ID NO: 416 e SEQ ID NO: 417;
- xx) SEQ ID NO: 433 e SEQ ID NO: 434;
- xxi) SEQ ID NO: 435 e SEQ ID NO: 434.

[00249] Em outras modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreende, consiste essencialmente em ou consiste em um polipeptídeo de VH e um polipeptídeo de VL selecionado do grupo que consiste no polipeptídeo de VH e polipeptídeo de VL produzidos pelo hibridoma 2.P3B5.2 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8106) e no polipeptídeo de VH e polipeptídeo de VL produzidos pelo hibridoma 7.P1D5.1.G9 (Designação de Depósito de ATCC PTA-8107).

[00250] Qualquer um dos polipeptídeos descritos acima pode também incluir polipeptídeos adicionais, por exemplo, um peptídeo sinal para direcionar a secreção do polipeptídeo codificado, regiões constantes de anticorpo como descritas aqui, ou outros polipeptídeos

heterólogos como descritos aqui. Adicionalmente, polipeptídeos da invenção incluem fragmentos de polipeptídeo como descritos em outro lugar. Adicionalmente polipeptídeos da invenção incluem polipeptídeo de fusão, fragmentos de Fab, e outros derivados, como descritos aqui.

[00251] Também, como descrito em outro lugar em mais detalhe aqui, a presente invenção inclui composições compreendendo os polipeptídeos descritos acima.

[00252] Também será entendido por alguém versado na técnica que polipeptídeo do anticorpo de Sp35 como descrito aqui pode ser modificado de modo que eles variem em sequência de aminoácido do polipeptídeo de ligação de ocorrência natural do qual eles eram derivados. Por exemplo, uma sequência de polipeptídeo ou de aminoácido derivada de uma proteína designada pode ser similar, por exemplo, ter uma certa identidade percentual à sequência de partida, por exemplo, pode ser 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% idêntica à sequência de partida.

[00253] Além disso, substituições, deleções, ou inserções de nucleotídeo ou de aminoácido que levam às substituições ou alterações conservadoras nas regiões de aminoácido "não-essenciais" podem ser feitas. Por exemplo, uma sequência de polipeptídeo ou de aminoácido derivada de uma proteína designada pode ser idêntica à sequência de partida com exceção de uma ou mais substituições, inserções, ou deleções de aminoácido individuais, por exemplo, uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, quinze, vinte ou mais substituições de aminoácido, inserções, ou deleções individuais. Em certas modalidades, uma sequência de polipeptídeo ou de aminoácido derivada de uma proteína designada tem uma a cinco, uma a dez, uma a quinze, ou uma a vinte substituições, inserções, ou deleções de aminoácido individuais com relação à sequência de partida.

[00254] Certos polipeptídeos de anticorpo de Sp35 da presente

invenção compreendem, consistem essencialmente em, ou consistem em uma sequência de aminoácido derivada de uma sequência de aminoácido humana. Porém, certos polipeptídeos de anticorpos de Sp35 compreendem um ou mais aminoácidos contíguos derivados de outras espécies mamíferas. Por exemplo, um anticorpo de Sp35 da presente invenção pode incluir uma porção de cadeia pesada primata, porção de dobradiça, ou região de ligação de antígeno. Em outro exemplo, um ou mais aminoácidos derivados de murino podem estar presentes em um polipeptídeo de anticorpo não-murino, por exemplo, em um sítio de ligação de antígeno de um anticorpo de Sp35. Em certas aplicações terapêuticas, anticorpos Sp35-específicos, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou análogos dos mesmos são projetados para não serem imunogênicos no animal ao qual o anticorpo é administrado.

[00255] Em certas modalidades, um polipeptídeo de anticorpo de Sp35 compreende uma sequência de aminoácido ou uma ou mais porções não normalmente associadas a um anticorpo. Modificações exemplares são descritas em mais detalhe abaixo. Por exemplo, um fragmento de anticorpo de fv de cadeia simples da invenção pode compreender uma sequência ligante flexível, ou pode ser modificado para adicionar uma porção funcional (por exemplo, PEG, um fármaco, uma toxina, ou uma marcação).

[00256] Um polipeptídeo de anticorpo de Sp35 da invenção pode compreender, consistir essencialmente em, ou consistir em uma proteína de fusão. Proteínas de fusão são moléculas quiméricas que compreendem, por exemplo, um domínio de ligação de antígeno da imunoglobulina com pelo menos um sítio de ligação-alvo, e pelo menos uma porção heteróloga, isto é, uma porção à qual não está naturalmente ligado na natureza. As sequências de aminoácido podem normalmente existir em proteínas separadas que são reunidas no polipeptídeo de

fusão ou elas podem normalmente existir na mesma proteína mas são colocadas em um arranjo novo no polipeptídeo de fusão. Proteínas de fusão podem ser criadas, por exemplo, através de síntese química, ou criando e transladando um polinucleotídeo em que as regiões de peptídeo são codificadas na relação desejada.

[00257] O termo "heterólogo", como aplicado a um polinucleotídeo ou um polipeptídeo, significa que o polinucleotídeo ou polipeptídeo é derivado de uma entidade distinta daquela do resto da entidade à qual está sendo comparado. Por exemplo, como aqui usado, um "polipeptídeo heterólogo" que é fundido a um anticorpo de Sp35, ou um fragmento de ligação de antígeno, variante, ou análogo do mesmo é derivado de um polipeptídeo de não-imunoglobulina das mesmas espécies, ou um polipeptídeo de imunoglobulina ou de não-imunoglobulina de uma espécie diferente.

[00258] Uma "substituição de aminoácido conservadora" é uma em que o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos de aminoácido que têm cadeias laterais similares foram definidas na técnica, incluindo cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais acídicas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares descarregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não-polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Desse modo, um resíduo de aminoácido não-essencial em um polipeptídeo de imunoglobulina é preferivelmente substituído com outro resíduo de aminoácido da mesma família de cadeia lateral. Em outra modalidade, uma cadeia de aminoácidos pode ser substituída com

uma cadeia estruturalmente similar que difere em ordem e/ou composição dos membros da família de cadeia lateral.

[00259] Alternativamente, em outra modalidade, mutações podem ser introduzidas fortuitamente ao longo de toda ou parte da sequência de codificação de imunoglobulina, tal como através de mutagênese de saturação, e os mutantes resultantes podem ser incorporados nos anticorpos de Sp35 para o uso nos métodos de diagnóstico e de tratamento descritos aqui e triados quanto à sua capacidade de se ligar ao antígeno desejado, por exemplo, Sp35.

VI. PROTEÍNAS DE FUSÃO E CONJUGADOS DE ANTICORPO

[00260] Como debatido em outro lugar em mais detalhe aqui, anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser também recombinantemente fundidos em um polipeptídeo heterólogo ao término N ou C ou quimicamente conjugados (incluindo conjugações covalentes e não-covalentes) para polipeptídeos ou outras composições. Por exemplo, anticorpos de Sp35 Sp35-específicos podem ser recombinantemente fundidos ou conjugados em moléculas úteis como marcações em ensaios de detecção e moléculas efetoras tais como polipeptídeos heterólogos, fármacos, radionuclídeos, ou toxinas. Vide, por exemplo, Publicações de PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; patente U.S. 5.314.995; e EP 396.387 que são incorporadas aqui por referência em suas totalidades.

[00261] Anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção incluem derivados que são modificados, isto é, pela ligação covalente de qualquer tipo de molécula ao anticorpo de modo que ligação covalente não impeça o anticorpo de se ligar a Sp35. Por exemplo, mas não por via de limitação, os derivados de anticorpo incluem anticorpos que foram modificados, por exemplo, através de glicosilação, acetilação, peguilação, fosfilação,

fosforilação, amidação, derivatização através de grupos de proteção/bloqueio conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligante celular ou outra proteína, etc. Quaisquer de numerosas modificações químicas podem ser realizadas através de técnicas conhecidas, incluindo, mas não-limitadas à clivagem química específica, acetilação, formilação, síntese metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, o derivado pode conter um ou mais aminoácidos não-clássicos.

[00262] Anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser compostos de aminoácidos unidos um ao outro por ligações de peptídeo ou ligações de peptídeo modificadas, isto é, isósteres de peptídeo, e podem conter aminoácidos diferentes dos 20 aminoácidos codificados com gene. Anticorpos Sp35-específicos podem ser modificados por processos naturais, tais como processamento pós-translacional, ou por técnicas de modificação química que são bem-conhecidas na técnica. Tais modificações são bem descritas nos textos básicos e em monografias mais detalhadas, como também em uma literatura de investigação volumosa. Modificações podem ocorrer em qualquer lugar no anticorpo Sp35-específico, incluindo na cadeia principal do peptídeo, nas cadeias laterais de aminoácido e nos terminos amino ou carboxila, ou nas porções tais como carboidratos. Será apreciado que o mesmo tipo de modificação possa estar presente nos mesmos graus ou variados em vários sítios em um anticorpo Sp35-específico dado. Também, um anticorpo Sp35-específico dado pode conter muitos tipos de modificações. Anticorpos Sp35-específicos podem ser ramificados, por exemplo, como resultado da ubiquitinação, e podem ser cíclicos, com ou sem ramificação. Anticorpos Sp35-específicos cíclicos, ramificados, e ramificados cíclicos podem ser o resultado dos processos de pós-tradução natural ou podem ser feitos através de métodos

sintéticos. Modificações incluem acetilação, acilação, PAD-ribosilação, amidação, ligação covalente de flavina, ligação covalente de uma porção de heme, ligação covalente de um nucleotídeo ou derivado de nucleotídeo, ligação covalente de um lipídio ou derivado de lipídio, ligação covalente de fosfatidilinositol, reticulação, ciclização, formação de ligação de dissulfeto, demetilação, formação de reticulações covalentes, formação de cisteína, formação de piroglutamato, formilação, gama-carboxilação, glicosilação, formação de ancora de GPI, hidroxilação, iodação, metilação, miristoilação, oxidação, peguilação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, racemização, selenoilação, sulfatação, adição mediada por RNA de transferência de aminoácidos às proteínas tais como arginilação, e ubiquitinação. (Vide, por exemplo, *Proteins - Structure And Molecular Properties*, T., E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nova Iorque 2ª Ed., (1993); *Posttranslational Covalent Modification Of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nova Iorque, págs. 1-12 (1983); Seifter et al., *Meth Enzymol* 182:626-646 (1990); Rattan et al., *Ann NI Acad Sci* 663:48-62 (1992)).

[00263] A presente invenção também provê proteínas de fusão compreendendo um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo, e um polipeptídeo heterólogo. O polipeptídeo heterólogo ao qual o anticorpo é fundido pode ser útil para função ou útil para direcionar o polipeptídeo de Sp35 que expressa as células. Em uma modalidade, uma proteína de fusão da invenção compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma ou mais das regiões de VH de um anticorpo da invenção ou a sequência de aminoácido de qualquer uma ou mais das regiões de VL de um anticorpo da invenção ou fragmentos ou variantes do mesmo, e uma sequência de polipeptídeo heteróloga. Em outra modalidade, uma

proteína de fusão para o uso nos métodos de diagnóstico e de tratamento descritos aqui compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma, duas, três das CDRs de VH de um anticorpo Sp35-específico, ou fragmentos, variantes, ou derivados do mesmo, ou a sequência de aminoácido de qualquer uma, duas, três das CDRs de VL de um anticorpo Sp35-específico, ou fragmentos, variantes, ou derivados do mesmo, e uma sequência de polipeptídeo heteróloga. Em uma modalidade, a proteína de fusão compreende um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de uma CDR3 de VH de um anticorpo Sp35-específico da presente invenção, ou fragmento, derivado, ou variante do mesmo, e uma sequência de polipeptídeo heteróloga para a que proteína de fusão especificamente ligue pelo menos um epitopo de Sp35. Em outra modalidade, uma proteína de fusão compreende um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de pelo menos uma região de VH de um anticorpo Sp35-específico da invenção e a sequência de aminoácido de pelo menos uma região de VL de um anticorpo Sp35-específico da invenção ou fragmentos, derivados ou variantes do mesmo, e uma sequência de polipeptídeo heteróloga. Preferivelmente, as regiões de VH e VL da proteína de fusão correspondem a um anticorpo de fonte simples (fragmento de scFv ou de Fab) que especificamente liga pelo menos um epitopo de Sp35. Em ainda outra modalidade, uma proteína de fusão para o uso nos métodos de diagnóstico e de tratamento descritos aqui compreende um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma, duas, três ou mais das CDRs de VH de um anticorpo Sp35-específico e a sequência de aminoácido de qualquer uma, duas, três ou mais das CDRs de VL de um anticorpo Sp35-específico, ou fragmentos ou variantes do mesmo, e uma sequência de polipeptídeo heteróloga. Preferivelmente, duas, três, quatro, cinco, seis, ou mais das VHCDR(s) ou VLCDR(s)

correspondem a anticorpo de fonte simples (gragmento de scFv ou de Fab) da invenção. Moléculas de ácido nucleico que codificam estas proteínas de fusão são também abrangidas pela invenção.

[00264] Proteínas de fusão exemplares relatadas na literatura incluem fusões do receptor de célula T (Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936-2940 (1987)); CD4 (Capon et al., Nature 337:525-531 (1989); Traunecker et al., Nature 339:68-70 (1989); Zettmeissl et al., DNA Cell Biol. USA 9:347-353 (1990); e Byrn et al., Nature 344:667-670 (1990)); L-selectina ("homing" do receptor) (Watson et al., J. Cell. Biol. 110:2221-2229 (1990); e Watson et al., Nature 349:164-167 (1991)); CD44 (Aruffo et al., Cell 61:1303-1313 (1990)); CD28 e B7 (Linsley et al., J. Exp. Med. 173:721-730 (1991)); CTLA-4 (Lisley et al., J. Exp. Med. 174:561-569 (1991)); CD22 (Stamenkovic et al., Cell 66:1133-1144 (1991)); receptor de TNF (Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 (1991); Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 27:2883-2886 (1991); e Peppel et al., J. Exp. Med. 174:1483-1489 (1991)); e receptor de IgE a (Ridgway e Gorman, J. Cell. Biol. Vol. 115, Resumo No. 1448 (1991)).

[00265] Em certas modalidades, anticorpos de Sp35, fragmentos de anticorpo, derivados e variantes dos mesmos também compreendem uma porção de direcionamento. Porções de direcionamento incluem uma proteína ou um peptídeo que direciona a localização para uma certa parte do corpo, por exemplo, para o cérebro ou compartimentos dentro dele. Em certas modalidades, anticorpos de Sp35, fragmentos de anticorpo, derivados e variantes dos mesmos são ligados ou fundidos em uma porção de direcionamento do cérebro. As porções de direcionamento do cérebro são ligadas covalentemente (por exemplo, fusão translacional, direta, ou através de ligação química ou diretamente ou através de uma molécula espaçadora que pode ser opcionalmente clivável) ou não-covalentemente ligadas (por exemplo, através de

interações reversíveis tais como avidina, biotina, proteína A, IgG, etc.). Em outras modalidades, os anticorpos de Sp35, fragmentos de anticorpo, derivados e variantes dos mesmos são ligados a mais porções de direcionamento do cérebro. Em modalidades adicionais, a porção de direcionamento do cérebro é ligada a uma pluralidade de anticorpos de Sp35, fragmentos de anticorpo, derivados e variantes dos mesmos.

[00266] Uma porção de direcionamento do cérebro associada a um anticorpo de Sp35, fragmento de anticorpo, derivado ou variante do mesmo intensifica a liberação no cérebro de tais anticorpos de Sp35, fragmentos de anticorpo, derivados e variantes dos mesmos. Vários polipeptídeos foram descritos que, quando fundidos em uma proteína ou agente terapêutico, liberam a proteína ou agente terapêutico através da barreira hematoencefálica (β). Exemplos não-limitativos incluem o anticorpo de domínio simples FC5 (Abulrob et al. (2005) J. Neurochem. 95, 1201-1214); mAB 83-14, um anticorpo monoclonal para o receptor de insulina humana (Pardridge et al. (1995) Pharmacol. Res. 12, 807-816); os peptídeos B2, B6 e B8 que se ligam ao receptor de transferrina humana (hTfR) (Xia et al. (2000) J. Virol. 74, 11359-11366); o anticorpo monoclonal OX26 para o receptor de transferrina (Pardridge et al. (1991) J. Pharmacol. Exp. Ther. 259, 66-70); e as SEQ ID NOs: 1-18 da patente U.S. 6.306.365. Os conteúdos das referências acima são incorporados aqui por referência em sua totalidade.

[00267] Liberação de cérebro intensificada de um anticorpo de Sp35, fragmento de anticorpo, derivado ou variante do mesmo é determinada por vários meios bem-estabelecidos na técnica. Por exemplo, administrar a um animal um anticorpo de Sp35 radioativa, enzimática ou fluorescentemente marcado, fragmento de anticorpo, derivado e variante do mesmo ligado a um porção de direcionamento do cérebro; determinar a localização no cérebro; e comparar a localização com um

anticorpo de Sp35 radioativa, enzimática ou fluorescentemente marcado equivalente, fragmento de anticorpo, derivado ou variante do mesmo que está associado a uma porção de direcionamento do cérebro. Outros meios de determinar direcionamento intensificado são descritos nas referências acima.

[00268] Como debatido em outro lugar aqui, anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser fundidos a polipeptídeos heterólogos para aumentar a meia-vida in vivo dos polipeptídeos ou para o uso em imunoenaios usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, em uma modalidade, PEG pode ser conjugado aos anticorpos de Sp35 da invenção para aumentar sua meia-vida in vivo. Leong, S. R., et al., *Cytokine* 16:106 (2001); *Adv. in Drug Deliv. Rev.* 54:531 (2002); ou Weir et al., *Biochem. Soc. Transactions* 30:512 (2002).

[00269] Além disso, anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser fundidos às sequências marcadoras, tais como um peptídeo para facilitar sua purificação ou detecção. Em modalidades preferidas, a sequência de aminoácido marcadora é um peptídeo de hexa-histidina, tal como o marcador fornecido em um vetor de pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre outros muitos dos quais estão comercialmente disponíveis. Como descrito em Gentz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824 (1989), por exemplo, hexa-histidina provê purificação conveniente da proteína de fusão. Outros marcadores de peptídeo úteis para purificação incluem, mas não são limitados a, o marcador "HA" que corresponde a um epitopo derivado da proteína de hemaglutinina de influenza (Wilson et al., *Cell* 37:767 (1984)) e o marcador "flag".

[00270] Proteínas de fusão podem ser preparadas usando métodos que são bem-conhecidos na técnica (vide por exemplo, patentes US

5.116.964 e 5.225.538). O sítio preciso ao que a fusão é feita pode ser empiricamente selecionado para otimizar a secreção ou características de ligação da proteína de fusão. DNA codificando a proteína de fusão é depois transfeccionado em uma célula hospedeira para expressão.

[00271] Anticorpos de Sp35 ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da presente invenção podem ser usados na forma não-conjugada ou conjugados com pelo menos uma de uma variedade de moléculas, por exemplo, para melhorar as propriedades terapêuticas da molécula, facilitar detecção alvo, ou para imageamento ou terapia do paciente. Anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser marcados ou conjugados antes ou após purificação, quando purificação for executada.

[00272] Em particular, anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser conjugados a agentes terapêuticos, profármacos, peptídeos, proteínas, enzimas, vírus, lipídios, modificadores de resposta biológicos, agentes farmacêuticos, ou PEG.

[00273] Aqueles versados na técnica apreciarão que conjugados possam ser também montados usando uma variedade de técnicas dependendo do agente selecionado a ser conjugado. Por exemplo, conjugados com biotina são preparados por exemplo, reagindo um polipeptídeo de ligação com um éster ativado de biotina tal como o éster de N-hidroxissuccinimida de biotina. Similarmente, conjugados com um marcador fluorescente podem ser preparados na presença de um agente de acoplamento, por exemplo, aqueles listados aqui, ou por reação com um isotiocianato, preferivelmente isotiocianato de fluoresceína. Conjugados dos anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção são preparados de uma maneira análoga.

[00274] A presente invenção também abrange anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção conjugados com um agente de diagnóstico ou terapêutico. Os anticorpos de Sp35 podem ser usados de forma diagnóstica para, por exemplo, monitorar o desenvolvimento ou progressão de uma doença neurológica como parte de um procedimento de testagem clínica para, por exemplo, determinar a eficácia de um tratamento dado e/ou regime de prevenção. Detecção pode ser facilitada acoplando o anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo com uma substância detectável. Exemplos de substâncias detectáveis incluem várias enzimas, grupos protéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes, materiais radioativos, metais de emissão de positron usando várias tomografias de emissão de positron, e íons de metal paramagnético não-radioativo. Vide, por exemplo, Patente U.S. 4.741.900 para íons de metal que podem ser conjugados com anticorpos para o uso como diagnósticos de acordo com a presente invenção. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina, β -galactosidase, ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos do grupo protético adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloreto de dansila ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina, e equorina; e exemplos de material radioativo adequado incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In ou ^{99}Tc .

[00275] Um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo também pode ser detectavelmente marcado acoplando-o a um composto quimioluminescente. A presença

do anticorpo de Sp35 quimioluminescente marcado é depois determinada detectando a presença da luminescência que surge durante o curso de uma reação química. Exemplos de compostos de marcação quimioluminescentes particularmente úteis são luminol, isoluminol, éster de acridínio teromático, imidazol, sal de acridínio e éster de oxalato.

[00276] Um dos modos em que um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo pode ser detectavelmente marcado é ligando o mesmo a uma enzima e usando o produto ligado em um imunoensaio de enzima (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2:1-7 (1978)); Voller et al., J. Clin. Pathol. 31:507-520 (1978); Butler, J. E., Meth. Enzymol. 73:482-523 (1981); Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. et al., (eds.), Enzyme Immunoassay, Kaku Shoin, Tokyo (1981). A enzima que é ligada ao anticorpo de Sp35 reagirá com um substrato apropriado, preferivelmente um substrato cromogênico, em um tal maneira a produzir uma porção química que pode ser detectada, por exemplo, por meios espectrofotométricos, fluorimétricos ou visuais. Enzimas que podem ser usadas para a marcação detectável do anticorpo incluem, mas não são limitadas a, malato desidrogenase, nuclease estafilocócica, delta-5-esteroide isomerase, levedura álcool desidrogenase, alfa-glicerofosfato, desidrogenase, triose fosfato isomerase, peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina, asparaginase, glicose oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glicose-6-fosfato desidrogenase, glucoamilase e acetilcolinesterase. Adicionalmente, a detecção pode ser realizada por métodos colorimétricos empregando um substrato cromogênico para a enzima. Detecção pode ser também realizada por comparação visual

da extensão de reação enzimática de um substrato comparado com padrões similarmente preparados.

[00277] Detecção pode ser também realizada usando qualquer de uma variedade de outros imunoensaios. Por exemplo, marcando radioativamente o anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo, é possível detectar o anticorpo através do uso de um radioimunoensaio (RIA) (vide, por exemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, (março, 1986)) que é incorporada por referência aqui). O isótopo radioativo pode ser detectado através de meios incluindo, mas não-limitados a, contador gama, contador de cintilação, ou autorradiografia.

[00278] Um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo pode ser também detectavelmente marcado usando metais emissores de fluorescência tais como ^{152}Eu , ou outros da série de lantanídeos. Estes metais podem ser ligados ao anticorpo usando tais grupos quelantes de metal como ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) ou ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

[00279] Técnicas para conjugar várias porções para um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo são bem-conhecidas, vide, por exemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", em Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", em Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., págs. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", em Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications,

Pinchera et al. (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), Academic Press págs. 303-16 (1985), e Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62:119-58 (1982).

VII. EXPRESSÃO DE POLIPEPTÍDEOS DE ANTICORPO

[00280] Como é bem-conhecido, RNA pode ser isolado das células de hibridoma originais ou de outras células transformadas através de técnicas-padrão, tais como extração de isotiocianato de guanidínio e precipitação seguidas por centrifugação ou cromatografia. Onde desejável, mRNA pode ser isolado de RNA total através de técnicas-padrão tais como cromatografia em celulose de oligo dT. Técnicas adequadas são familiares na técnica.

[00281] Em uma modalidade, cDNAs que codificam as cadeias leve e pesada do anticorpo podem ser feitos, simultânea ou separadamente, usando transcriptase reversa e DNA polimerase de acordo com os métodos bem-conhecidos. PCR pode ser iniciada através de iniciadores de região constante de consenso ou através de iniciadores mais específicos com base no DNA e sequências de aminoácido de cadeia pesada e leve publicadas. Como debatido acima, PCR também pode ser usada para isolar os clones de DNA codificando as cadeias leves e pesadas do anticorpo. Neste caso, as bibliotecas podem ser triadas por iniciadores de consenso ou sondas homólogas maiores, tais como sondas de região constante de camundongo.

[00282] DNA, tipicamente DNA de plasmídeo, pode ser isolado das células usando técnicas conhecidas na técnica, mapeado por restrição e sequenciado de acordo com as técnicas-padrão bem-conhecidas expostas em detalhes, por exemplo, nas referências anteriores relativas às técnicas de DNA recombinante. Claro que o DNA pode ser sintético

de acordo com a presente invenção em qualquer ponto durante o processo de isolamento ou análise subsequente.

[00283] Seguindo manipulação do material genético isolado para fornecer anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção, os polinucleotídeos que codificam os anticorpos de Sp35 são tipicamente inseridos em um vetor de expressão para introdução nas células hospedeiras que podem ser usadas para produzir a quantidade desejada de anticorpo de Sp35.

[00284] Expressão recombinante de um anticorpo, ou fragmento, derivado ou análogo do mesmo, por exemplo, uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo que liga a uma molécula alvo descrita aqui, por exemplo, Sp35, requer construção de um vetor de expressão contendo um polinucleotídeo que codifica o anticorpo. Uma vez um polinucleotídeo que codifica uma molécula de anticorpo ou uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo, ou porção do mesmo (preferivelmente contendo o domínio variável de cadeia pesada ou leve), da invenção foi obtido, o vetor para a produção da molécula de anticorpo pode ser produzido através de tecnologia de DNA recombinante usando técnicas bem-conhecidas na técnica. Desse modo, métodos para preparar uma proteína expressando um polinucleotídeo que contém um anticorpo que codifica a sequência de nucleotídeo são descritos aqui. Métodos que são bem-conhecidos àqueles versados na técnica podem ser usados para a construção de vetores de expressão contendo as sequências de codificação de anticorpo e sinais de controle transcricionais e translacionais apropriados. Estes métodos incluem, por exemplo, técnicas de DNA recombinante in vitro, técnicas sintéticas, e recombinação genética in vivo. A invenção, desse modo, fornece vetores replicáveis compreendendo uma sequência de nucleotídeo que codifica uma molécula de anticorpo da invenção, ou uma cadeia pesada ou leve do mesmo, ou um domínio variável de cadeia pesada ou leve,

operavelmente ligado a um promotor. Tais vetores podem incluir a sequência de nucleotídeo que codifica a região constante da molécula de anticorpo (vide, por exemplo, Publicação de PCT WO 86/05807; Publicação de PCT WO 89/01036; e Patente U.S. 5.122.464) e o domínio variável do anticorpo pode ser clonado em um tal vetor para expressão da cadeia pesada ou leve inteira.

[00285] A célula hospedeira pode ser cotransfeccionada com dois vetores de expressão da invenção, o primeiro vetor codificando um polipeptídeo derivado de cadeia pesada e o segundo vetor codificando um polipeptídeo derivado de cadeia leve. Os dois vetores podem conter marcadores selecionáveis idênticos que permitem expressão igual dos polipeptídeos de cadeia pesada e leve. Alternativamente, um vetor simples pode ser usado que codifica ambos polipeptídeos de cadeia pesada e leve. Em tais situações, a cadeia leve é vantajosamente colocada antes da cadeia pesada para evitar um excesso de cadeia pesada livre tóxica (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980)). As sequências de codificação para as cadeias pesadas e leves podem compreender cDNA ou DNA genômico.

[00286] O termo "vetor" ou "vetor de expressão" é aqui usado para significar vetores usados de acordo com a presente invenção como um veículo para introduzir e expressar um gene desejado em uma célula hospedeira. Como conhecido àqueles versados na técnica, tais vetores podem ser facilmente selecionados do grupo que consiste em plasmídeos, fagos, vírus e retrovírus. Em geral, vetores compatíveis com a invenção imediata compreenderão um marcador de seleção, sítios de restrição apropriados para facilitar a clonagem do gene desejado e a capacidade para entrar e/ou replicar em células eucarióticas ou procarióticas.

[00287] Para o propósito desta invenção, numerosos sistemas de vetor de expressão podem ser empregados. Por exemplo, uma classe

de vetor utiliza elementos de DNA que são derivados de vírus animais tais como vírus de papiloma bovino, vírus de polioma, adenovírus, vírus de vacínia, baculovírus, retrovírus (RSV, MMTV ou MOMLV) ou vírus de SV40. Outros envolvem o uso de sistemas poliestrônicos com sítios de ligação de ribossoma internos. Adicionalmente, células que integraram o DNA em seus cromossomos podem ser selecionadas introduzindo um ou mais marcadores que permitem a seleção de células hospedeiras transfeccionadas. O marcador pode prover prototrofia a um hospedeiro auxotrófico, resistência a biocida (por exemplo, antibióticos) ou resistência a metais pesados tais como cobre. O gene marcador selecionável ou pode ser ligado diretamente às sequências de DNA a ser expressadas, ou introduzidos na mesma célula através de cotransformação. Elementos adicionais podem ser também necessários para síntese de mRNA ótima. Estes elementos podem incluir sequências sinais, sinais de splice, como também promotores transcricionais, intensificadores, e sinais de terminação.

[00288] Em modalidades particularmente preferidas, os genes de região variável clonados são inseridos em um vetor de expressão juntos com os genes de região constante de cadeia pesada e leve (preferivelmente humanos) sintéticos como debatido acima. Em uma modalidade, isto é realizado usando um vetor de expressão particular de Biogen IDEC, Inc., referido como NEOSPLA (patente U.S. 6.159.730). Este vetor contém o promotor/intensificador de citomegalovírus, o promotor principal de globina beta de camundongo, a origem de SV40 da replicação, a sequência de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino, neomicina fosfotransferase éxon 1 e éxon 2, o gene de di-hidrofolato reductase e sequência líder. Este vetor foi observado resultar em expressão de nível muito alta dos anticorpos sob incorporação de genes de regiões variável e constante, transfecção em células CHO, seguido por seleção em meio contendo G418 e

amplificação de metotrexato. Claro que, qualquer vetor de expressão que é capaz de suscitar expressão em células eucarióticas pode ser usado na presente invenção. Exemplos de vetores adequados incluem, mas não são limitados a, plasmídeos pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, e pZeoSV2 (disponíveis de Invitrogen, San Diego, CA), e plasmídeo pCI (disponível de Promega, Madison, WI). Em geral, triar números grandes de células transformadas para aquelas que expressam níveis adequadamente altos se cadeias pesadas e leves de imunoglobulina são experimentação rotineira que pode ser realizada, por exemplo, através de sistemas robóticos. Sistemas de vetor são também ensinados nas Patentes U.S. 5.736.137 e 5.658.570, cada um destes é incorporado por referência em sua totalidade aqui. Este sistema provê níveis de expressão altos, por exemplo, > 30 pg/célula/dia. Outros sistemas de vetor exemplares são descritos, por exemplo, na patente U.S. 6.413.777.

[00289] Em outras modalidades preferidas, os anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser expressados usando constructos policistrônicos tais como aqueles descritos na Publicação do Pedido de Patente dos Estados Unidos 2003-0157641 A1, depositado em 18 de novembro de 2002 e incorporado aqui em sua totalidade. Nestes sistemas de expressão novos, múltiplos produtos de gene de interesse tais como cadeias pesadas e leves de anticorpos podem ser produzidas de um construto policistrônico simples. Estes sistemas vantajosamente usam um sítio de entrada de ribossoma interno (IRES) para fornecer níveis relativamente altos de anticorpos de Sp35, por exemplo, polipeptídeos de ligação, por exemplo, anticorpos Sp35-específicos ou fragmentos imuno-específicos dos mesmos em células hospedeiras eucarióticas. Sequências de IRES compatíveis são descritas na Patente

U.S. 6.193.980 que é também incorporada aqui. Aqueles versados na técnica apreciarão que tais sistemas de expressão podem ser usados para efetivamente produzir a faixa total de anticorpos de Sp35 descrita na aplicação imediata.

[00290] Mais em geral, uma vez o vetor ou sequência de DNA que codifica uma subunidade monomérica do anticorpo de Sp35 foi preparada, o vetor de expressão pode ser introduzido em uma célula hospedeira apropriada. Introdução do plasmídeo na célula hospedeira pode ser realizada por várias técnicas bem-conhecidas àqueles versados na técnica. Estas incluem, mas não são limitadas à transfecção (incluindo eletroforese e eletroporação), fusão de protoplasto, precipitação de fosfato de cálcio, fusão de célula com DNA envelopado, microinjeção, e infecção com vírus intacto. Vide, Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Vectors, Rodriguez e Denhardt, Eds., Butterworths, Boston, Mass., Capítulo 24.2, páginas. 470-472 (1988). Tipicamente, introdução de plasmídeo no hospedeiro é por meio de eletroporação. As células hospedeiras que abrigam a constructo de expressão são cultivadas sob condições apropriadas para a produção das cadeias leves e cadeias pesadas, e ensaiadas para síntese de proteína de cadeia pesada e/ou leve. Técnicas de ensaio exemplares incluem ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA), ou análise de separador de célula ativada por fluorescência (FACS), imuno-histoquímica e outros.

[00291] O vetor de expressão é transferido para uma célula hospedeira por técnicas convencionais e as células transfeccionadas são depois cultivadas através de técnicas convencionais para produzir um anticorpo para o uso nos métodos descritos aqui. Desse modo, a invenção inclui células hospedeiras contendo um polinucleotídeo que codifica um anticorpo da invenção, ou uma cadeia pesada ou leve do mesmo, operavelmente ligado a um promotor heterólogo. Em

modalidades preferidas para a expressão de anticorpos de cadeia dupla, vetores que codificam ambas as cadeias pesada e leve podem ser coexpressados na célula hospedeira para expressão da molécula de imunoglobulina inteira, como detalhado abaixo.

[00292] Como aqui usado, "células hospedeiras" refere-se às células que abrigam vetores construídos usando técnicas de DNA recombinante e codificando pelo menos um gene heterólogo. Nas descrições dos processos para isolamento de anticorpos de hospedeiros recombinantes, os termos "célula" e "cultura de célula" são usados alternadamente para denotar a fonte de anticorpo a menos que do contrário seja claramente especificado. Em outras palavras, restabelecimento de polipeptídeo das "células" pode significar tanto de células inteiras giradas, como da cultura de célula contendo o meio e as células suspensas.

[00293] Uma variedade de sistemas de vetor de expressão de hospedeiro pode ser utilizada para expressar moléculas de anticorpo para o uso nos métodos descritos aqui. Tais sistemas de expressão de hospedeiro representam veículos pelos quais as sequências de codificação de interesse podem ser produzidas e subsequentemente purificadas, mas também representam células que podem, quando transformadas ou transfeccionadas com as sequências de codificação de nucleotídeo apropriadas, expressar uma molécula de anticorpo da invenção in situ. Estes incluem, mas não são limitados a, microorganismos tais como bactérias (por exemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas com vetores de expressão de DNA recombinante de bacteriófago, DNA de plasmídeo ou DNA de cosmídeo contendo as sequências de codificação de anticorpo; levedura (por exemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada com vetores de expressão de levedura recombinante contendo as sequências de codificação de anticorpo; sistemas de célula de inseto infetados com vetores de

expressão de vírus recombinante (por exemplo, baculovírus) contendo as sequências de codificação de anticorpo; sistemas de célula de planta infectados com vetores de expressão de vírus recombinante (por exemplo, vírus do mosaico de couve-flor, CaMV; vírus do mosaico de tabaco, TMV) ou transformados com vetores de expressão de plasmídeo recombinante (por exemplo, Plasmídeo Ti) contendo as sequências de codificação de anticorpo; ou sistemas de célula mamífera (por exemplo, células COS, CHO, BLK, 293, 3T3) abrigando constructos de expressão recombinante contendo os promotores derivados do genoma de células mamíferas (por exemplo, promotor de metalotioneína) ou de vírus mamíferos (por exemplo, o promotor tardio de adenovírus; o promotor do vírus de vacínia 7,5K). Preferivelmente, células bacterianas tais como *Escherichia coli*, e mais preferivelmente, células eucarióticas, especialmente para a expressão da molécula inteira de anticorpo recombinante, são usadas para a expressão de uma molécula de anticorpo recombinante. Por exemplo, células mamíferas tais como células de ovário de hamster chinês (CHO), juntamente com um vetor tal como o elemento de promotor de gene precoce intermediário principal do citomegalovírus humano é um sistema de expressão efetivo para anticorpos (Foecking et al., *Gene* 45:101 (1986); Cockett et al., *Bio/Technology* 8:2 (1990)).

[00294] A linhagem de célula hospedeira usada para expressão da proteína é frequentemente de origem mamífera; aqueles versados na técnica são creditados com habilidade para determinar preferencialmente as linhagens de células hospedeiras particulares que são melhor adaptadas para o produto de gene desejado a ser expressado nelas. Linhagens de células hospedeiras exemplares incluem, mas não são limitadas a, CHO (Ovário de Hamster Chinês), DG44 e DUXB11 (linhagens de Ovário de Hamster Chinês, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (linhagem de rim de

macaco), COS (um derivado de CVI com antígeno de SV40 T), VERY, BHK (rim de hamster filhote), MDCK, 293, WI38, R1610 (fibroblasto de hamster chinês) BALBC/3T3 (fibroblasto de camundongo), HAK (linhagem de rim de hamster), SP2/O (mieloma de camundongo), P3x63-Ag3.653 (mieloma de camundongo), BFA-1c1BPT (células endoteliais bovinas), RAJI (linfócito humano) e 293 (rim humano). Células CHO são particularmente preferidas. Linhagens de célula hospedeira estão tipicamente disponíveis de serviços comerciais, da American Tissue Culture Collection ou da literatura publicada.

[00295] Além disso, uma cepa de célula hospedeira pode ser selecionada que modula a expressão das sequências inseridas, ou modifica e processa o produto de gene na maneira específica desejada. Tais modificações (por exemplo, glicosilação) e processamento (por exemplo, clivagem) dos produtos de proteína podem ser importantes para a função da proteína. Células hospedeiras diferentes têm mecanismos característicos e específicos para o processamento pós-translacional e modificação das proteínas e produtos de gene. Linhagens celulares apropriadas ou sistemas de hospedeiro podem ser selecionadas para assegurar a modificação correta e processamento da proteína estranha expressada. Para este fim, células hospedeiras eucarióticas que possuem a maquinaria celular podem ser usadas para processamento apropriado da transcrição primária, glicosilação, e fosforilação do produto de gene.

[00296] Para produção de rendimento alto a longo prazo das proteínas recombinantes, expressão estável é preferida. Por exemplo, linhagens celulares que estavelmente expressam a molécula de anticorpo podem ser engenheiradas. Ao invés de usar vetores de expressão contendo origens virais de replicação, as células hospedeiras podem ser transformadas com DNA controlado por elementos de controle de expressão apropriados (por exemplo, promotor,

intensificador, sequências, terminadores de transcrição, sítios de poliadenilação, etc.), e um marcador selecionável. Seguindo a introdução do DNA estranho, as células engenheiradas podem ser deixadas crescer durante 1-2 dias em um meio enriquecido, e depois são trocadas por um meio seletivo. O marcador selecionável no plasmídeo recombinante confere resistência à seleção e permite que as células estavelmente integrem-se ao plasmídeo em seus cromossomos e cresçam para formar focos que por sua vez podem ser clonados e expandidos em linhagens celulares. Este método pode ser vantajosamente usado para criar linhagens celulares que estavelmente expressam a molécula de anticorpo.

[00297] Vários sistemas de seleção podem ser usados, incluindo mas não-limitados aos genes de timidina cinase do vírus do herpes simples (Wigler et al., Cell 11:223 (1977)), de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)), e de adenina fosforribosiltransferase (Lowy et al., Cell 22:817 1980) podem ser empregados em células tk, hgprt ou aprt, respectivamente. Também, resistência a antimetabólitos pode ser usada como a base de seleção para os genes a seguir: dhfr conferindo resistência ao metotrexato (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); gpt conferindo resistência ao ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); neo conferindo resistência ao aminoglicosídeo G-418 Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu e Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); e Morgan e Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); TIB TECH 11(5):155-215 (maio, 1993); e higo conferindo resistência à higromicina (Santerre et al., Gene 30:147 (1984). Métodos comumente conhecidos na técnica de tecnologia de DNA recombinante que podem ser usados

são descritos em Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NI (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NI (1990); e nos Capítulos 12 e 13, Dracopoli et al. (eds), *Current Prolocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NI (1994); Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981), que são incorporados por referência aqui em suas totalidades.

[00298] Os níveis de expressão de uma molécula de anticorpo podem ser aumentados por amplificação de vetor (para uma revisão, vide Bebbington and Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Academic Press, Nova Iorque, Vol. 3. (1987)). Quando um marcador no sistema de vetor que expressa anticorpo for amplificável, aumento no nível de inibidor presente em cultura de célula hospedeira aumentará o número de cópias do gene marcador. Considerando que a região amplificada é associada ao gene de anticorpo, a produção do anticorpo também aumentará (Crouse et al., *Mol. Cell. Biol.* 3:257 (1983)).

[00299] Produção in vitro permite escalonar para dar quantidades grandes dos polipeptídeos desejados. Técnicas para cultivo de célula mamífera sob condições de cultura de tecido são conhecidas na técnica e incluem cultura de suspensão homogênea, por exemplo, em um reator de transporte aéreo ou em um reator de agitador contínuo, ou cultura de célula imobilizada ou capturada, por exemplo, em fibras ocas, microcápsulas, em microcontas de agarose ou cartuchos de cerâmica. Se necessário e/ou desejado, as soluções de polipeptídeos podem ser purificadas pelos métodos de cromatografia habituais, por exemplo, filtração em gel, cromatografia de permuta iônica, cromatografia em DEAE-celulose ou cromatografia de (imuno)afinidade, por exemplo, após biossíntese preferencial de um polipeptídeo sintético da região de

dobradiça ou antes ou subsequente à etapa cromatografia de HIC descrita aqui.

[00300] Genes que codificam anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser também células não-mamíferas expressadas tais como bactérias ou células de levedura ou de planta. Bactérias que facilmente carregam ácidos nucleicos incluem os membros da Enterobacteriaceae, tais como cepas de *Escherichia coli* ou *Salmonella*; Bacillaceae, tal como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, e *Haemophilus influenzae*. Também será apreciado que, quando expressos em bactérias, os polipeptídeos heterólogos tipicamente se tornam parte de corpos de inclusão. Os polipeptídeos heterólogos devem ser isolados, purificados e depois montados em moléculas funcionais. Onde forma tetravalente de anticorpos for desejada, as subunidades então se autorrearranjam em anticorpos tetravalentes (WO02/096948A2).

[00301] Em sistemas bacterianos, vários vetores de expressão podem ser vantajosamente selecionados dependendo do uso intencionado para a molécula de anticorpo que é expressada. Por exemplo, quando uma quantidade grande de uma tal proteína deve ser produzida para a geração de composições farmacêuticas de uma molécula de anticorpo, vetores que direcionam a expressão de níveis altos dos produtos de proteína de fusão que são facilmente purificados podem ser desejáveis. Tais vetores incluem, mas não são limitados ao vetor de expressão de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., EMBO J. 2:1791 (1983)) em que a sequência de codificação de anticorpo pode ser ligada individualmente no vetor na estrutura com a região de codificação de lacZ de forma que uma proteína de fusão seja produzida; vetores pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)); e outros vetores de pGEX podem ser também usados para expressar polipeptídeos

estranhos como proteínas de fusão com glutathione S-transferase (GST). Em geral, tais proteínas de fusão são solúveis e podem ser facilmente purificadas de células lisadas por adsorção e ligação a esferas de matriz de glutathione-agarose seguido por eluição na presença de glutathione livre. Os vetores pGEX são projetados para incluir sítios de clivagem de protease de trombina ou de Fator Xa de forma que o produto de gene alvo clonado possa ser liberado da porção de GST.

[00302] Além de procariotos, micróbios eucarióticos podem ser também usados. *Saccharomyces cerevisiae*, ou levedura de padeiro comum, é o comumente usado entre micro-organismos eucarióticos embora várias outras cepas estejam comumente disponíveis, por exemplo, *Pichia pastoris*.

[00303] Para expressão em *Saccharomyces*, o plasmídeo YRp7, por exemplo, (Stinchcomb et al., *Nature* 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene* 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene* 10:157 (1980)) é comumente usado. Este plasmídeo já contém o gene TRP1 que provê um marcador de seleção para uma cepa mutante de levedura que carece da habilidade para crescer em triptofano, por exemplo, ATCC No. 44076 ou PEP4-1 (Jones, *Genetics* 85:12 (1977)). A presença da lesão de *trp1* como uma característica do genoma de célula hospedeira de levedura depois provê um ambiente efetivo para detectar transformação através do crescimento na ausência de triptofano.

[00304] Em um sistema de inseto, vírus de poli-hedrose nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) é tipicamente usado como um vetor para expressar genes estranhos. O vírus cresce em células de *Spodoptera frugiperda*. A sequência de codificação de anticorpo pode ser clonada individualmente em regiões não-essenciais (por exemplo, o gene de poli-hedrina) do vírus e colocada sob controle de um promotor de AcNPV (por exemplo, o promotor de poli-hedrina).

[00305] Uma vez uma molécula de anticorpo da invenção tenha sido

recombinantemente expressada, pode ser purificada por qualquer método conhecido na técnica por purificação de uma molécula de imunoglobulina, por exemplo, através de cromatografia (por exemplo, permuta de íons, afinidade, particularmente por afinidade ao antígeno específico após Proteína A, e cromatografia de coluna por tamanho), centrifugação, solubilidade diferencial, ou por qualquer outra técnica-padrão para a purificação de proteínas. Alternativamente, um método preferido para aumentar a afinidade dos anticorpos da invenção é descrito na US 2002 0123057 A1.

VIII. MÉTODOS DE TRATAMENTO USANDO ANTICORPOS DE Sp35 TERAPÊUTICOS

[00306] Como descrito aqui, anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem aliviar a inibição mediada por NgR1 de extensão axonal que normalmente acontece nos neurônios do SNC. Este é benéfico em situações onde extensão axonal ou brotamento de neurite são necessários no cérebro ou espinha dorsal. Lesão da espinha dorsal, incluindo esmagamento parcial ou completo ou separação, exemplifica uma situação em que extensão axonal é necessária, mas é normalmente inibida por operação da via de Nogo. Exemplos de doenças ou distúrbios em que extensão axonal e/ou brotamento de neurite no cérebro seriam benéficas incluem acidente vascular, esclerose múltipla, e outras doenças neurodegenerativas ou distúrbios tais como esclerose múltipla (MS), leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), encefalomielite (EPL), mielólise pontina central (CPM), adrenoleucodistrofia, doença de Alexander, doença de Pelizaeus Merzbacher (PMZ), Leucodistrofia de Célula Globoide (doença de Krabbe) e degeneração Walleriana, neurite ótica, mielite transversal, esclerose lateral amiotrófica (ALS), doença de Huntington, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, lesão da espinha dorsal,

lesão traumática do cérebro, lesão pós radiação, complicações neurológicas de quimioterapia, acidente vascular, neuropatia, neuropatia ótica isquêmica aguda, deficiência de vitamina E, síndrome de deficiência de vitamina E isolada, AR, síndrome de Bassen-Kornzweig, síndrome de Marchiafava-Bignami, leucodistrofia metacromática, neuralgia trigeminal, paralisia de Sino, lesão da espinha dorsal e todas as doenças neurológicas relacionadas à morte de célula neuronal.

[00307] Os inventores também descobriram que Sp35 é expressado em oligodendrócitos, e contribui para a biologia dos oligodendrócitos. Derivados solúveis de Sp35, certos polinucleotídeos (por exemplo, RNAi), como também certos anticorpos que especificamente ligam a Sp35, como descritos aqui, atuam como antagonistas para função de Sp35 em oligodendrócitos, promovendo a proliferação, diferenciação e sobrevivência dos oligodendrócitos e promovendo a mielinização dos neurônios in vitro e in vivo. Isto é benéfico para doenças, distúrbios ou condições que envolvem desmielinização e dismielinização. Exemplos de doenças ou distúrbios em que proliferação, diferenciação e sobrevivência dos oligodendrócitos, e/ou mielinização ou remielinação seriam benéficos incluem esclerose múltipla (MS), leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), encefalomielite (EPL), mielinólise pontina central (CPM), adrenoleucodistrofia, doença de Alexander, doença de Pelizaeus Merzbacher (PMZ), Leucodistrofia de Célula Globoide (doença de Krabbe), Degeneração Walleriana, neurite ótica, mielite transversal, esclerose lateral amiotrófica (ALS), doença de Huntington, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, lesão de espinha dorsal, lesão traumática do cérebro, lesão pós radiação, complicações neurológicas de quimioterapia, acidente vascular, neuropatia ótica isquêmica aguda, deficiência de vitamina E, síndrome de deficiência de vitamina E isolada, AR, síndrome de Bassen-Kornzweig, síndrome de

Marchiafava-Bignami, leucodistrofia metacromática, neuralgia trigeminal, e paralisia de Sino.

[00308] Consequentemente, uma modalidade da presente invenção provê métodos para tratar lesão de espinha dorsal, doenças ou distúrbios associados à inibição do crescimento neuronal no SNC, doenças ou distúrbios associados à inibição do crescimento ou diferenciação de oligodendrócitos, e doenças que envolvem desmielinização ou dismielinização dos neurônios do SNC em um animal sofrendo de tal lesão ou doença ou predisposto a contrair tal doença, o método compreendendo, que consiste essencialmente em, ou consistindo em administrar ao animal uma quantidade efetiva de um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo. Anticorpos da invenção são descritos aqui, e incluem os anticorpos monoclonais listados na Tabela 3A e 3B, anticorpos que especificamente ligam ao mesmo epitopo como os anticorpos monoclonais listados na Tabela 3A e 3B, anticorpos que competitivamente inibem a ligação dos anticorpos monoclonais listados na Tabela 3A e 3B para Sp35, e anticorpos que compreendem polipeptídeos derivados dos anticorpos monoclonais listados na Tabela 3A e 3B.

[00309] Um anticorpo de Sp35 terapêutico a ser usado nos métodos de tratamento descritos aqui pode ser preparado e usado como um agente terapêutico que promove desenvolvimento de neurite do SNC, sobrevivência neuronal, orientação de axônio e regeneração de axônio promovendo sobrevivência, crescimento, e/ou diferenciação de oligodendrócito, e que promove mielinização ou remielinização dos neurônios do SNC. Características de anticorpos de Sp35 terapêuticos adequados incluem: ligar a epitopos de Sp35 resultando no bloqueio da atividade de Sp35, ligar a Sp35 com afinidade suficiente para suscitar um efeito terapêutico, e ligar a Sp35 preferencialmente a pares de

ligação normais, por exemplo, receptor Nogo.

[00310] Anticorpos de Sp35 terapêuticos podem ser anticorpos monoclonais, quiméricos ou humanizados, ou fragmentos de anticorpos que especificamente se ligam a Sp35. Os anticorpos podem ser monovalentes, bivalentes, polivalentes, ou anticorpos bifuncionais. Fragmentos de anticorpo incluem sem limitação Fab F(ab')₂, e fragmentos Fv.

[00311] Anticorpos de Sp35 terapêuticos, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes ou derivados dos mesmos de acordo com a invenção podem ser usados na forma não-marcada ou não-conjugada, ou pode ser acoplado ou ligado a fármacos, marcações ou agentes de estabilização que podem ou não exercer efeitos terapêuticos adicionais.

[00312] Uma dosagem específica e regime de tratamento para qualquer paciente particular dependerão de uma variedade de fatores, incluindo do anticorpo de Sp35 particular, ou fragmento de ligação de antígeno, variante ou derivado do mesmo usado, da idade do paciente, peso do corpo, saúde geral, sexo, e dieta, e do tempo de administração, taxa de excreção, combinação de fármaco, e da severidade da doença particular sendo tratada. Julgamento de tais fatores através de cuidadores profissionais de saúde está dentro da versatilidade na técnica. A quantidade também dependerá do paciente individual a ser tratado, da rota de administração, do tipo de formulação, das características do composto usado, da severidade da doença, e do efeito desejado. A quantidade usada pode ser determinada por princípios farmacológicos e farmacocinéticos bem-conhecidos na técnica.

[00313] Nos métodos da invenção, os anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes ou derivados dos mesmos podem ser administrados diretamente ao sistema nervoso, intracerebroventricular, ou intratecalmente, por exemplo, em uma lesão

crônica de MS, como debatido em mais detalhe abaixo.

[00314] Em várias modalidades, um anticorpo de Sp35 como descrito acima é antagonista da atividade de Sp35. Em certas modalidades, por exemplo, ligação de um anticorpo de Sp35 de antagonista a Sp35, como expresso nos neurônios, bloqueia inibição associada à mielina de desenvolvimento de neurite ou morte de célula neuronal. Em outras modalidades, ligação do anticorpo de Sp35 a Sp35, como expresso em oligodendrócitos, bloqueia a inibição de crescimento ou diferenciação de oligodendrócito, ou bloqueia desmielinação ou dismielinação dos neurônios de SNC.

[00315] Em métodos da presente invenção, um anticorpo de Sp35, ou um fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo, em particular os anticorpos de Sp35 descritos aqui, pode ser administrado diretamente como um polipeptídeo pré-formado, ou indiretamente através de um vetor de ácido nucleico, para permitir desenvolvimento axonal benéfico, promover proliferação, diferenciação, e sobrevivência de oligodendrócitos, e/ou promover mielinização ou remielinação.

[00316] Em certas modalidades, um sujeito pode ser tratado com uma molécula de ácido nucleico que codifica um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou análogo do mesmo, por exemplo, em um vetor. Doses para ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos variam de cerca de 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 µg a 10 mg, ou 30-300 µg de DNA por paciente. Doses para vetores virais infecciosos variam de 10-100, ou mais, virions por dose.

[00317] Em algumas modalidades da presente invenção um anticorpo de Sp35, ou um fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo é administrado em um método de tratamento que inclui: (1) transformar ou transfeccionar uma célula hospedeira implantável com um ácido nucleico, por exemplo, um vetor que expressa

um anticorpo de Sp35 ou um fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo; e (2) implantar a célula hospedeira transformada em um mamífero, no sítio de uma doença, distúrbio ou lesão. Por exemplo, a célula hospedeira transformada pode ser implantada no sítio de uma lesão de espinha dorsal ou em um sítio de dismielinação. Em algumas modalidades da invenção, a célula hospedeira implantável é removida de um mamífero, temporariamente cultivada, transformada ou transfeccionada com um ácido nucleico isolado que codifica um anticorpo de Sp35, e implantada de volta no mesmo mamífero do qual foi removida. A célula pode ser, mas não é requerido que seja, removida do mesmo sítio ao qual implantou-se. Tais modalidades, às vezes conhecidas como terapia de gene ex vivo, podem fornecer uma provisão contínua do polipeptídeo de Sp35, localizada no sítio do sítio de ação, durante um período limitado de tempo.

[00318] Os métodos para tratar lesão de espinha dorsal, doenças ou distúrbios associados à inibição do crescimento neuronal no SNC, doenças ou distúrbios associados à inibição do crescimento ou diferenciação de oligodendrócitos, e doenças que envolvem desmielinação ou dismielinação dos neurônios do SNC compreendendo administração de um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo da invenção são tipicamente testados in vitro, e depois in vivo em um modelo de animal aceitável, para a atividade terapêutica ou profiláctica desejada, antes do uso em seres humanos. Modelos animais adequados, incluindo animais transgênicos, serão conhecidos àqueles versados na técnica. Por exemplo, ensaios in vitro para demonstrar a utilidade terapêutica do anticorpo de Sp35 descrito aqui incluem o efeito de um anticorpo de Sp35 em uma linhagem celular ou uma amostra de tecido de paciente. O efeito do anticorpo de Sp35 na linhagem celular e/ou amostra de

tecido utilizando técnicas conhecidas pode ser determinado daqueles versados na técnica, tais como os ensaios descritos em outro lugar aqui. De acordo com a invenção, ensaios in vitro que podem ser usados para determinar se administração de um anticorpo de Sp35 específico é indicada, incluem ensaios de cultura de célula in vitro em que uma amostra de tecido de paciente é crescida na cultura, e exposta ou do contrário administrado um composto, e o efeito de tal composto na amostra de tecido é observado.

[00319] Compostos ativos adicionais também podem ser incorporados nas composições da invenção. Por exemplo, um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo da invenção pode ser coformulado e/ou coadministrado com um ou mais agentes terapêuticos adicionais.

[00320] A invenção abrange qualquer método de liberação adequado para um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo da invenção para um tecido alvo selecionado, incluindo injeção de bolo de uma solução aquosa ou implantação de um sistema de liberação controlada. Uso de um implante de liberação controlada reduz a necessidade por injeções repetidas.

IX. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO

[00321] Métodos de preparar e administrar anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção a um sujeito em necessidade dos mesmos são bem-conhecidos ou são facilmente determinados por aqueles versados na técnica. A rota de administração do anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo pode ser, por exemplo, oral, parenteral, por inalação ou tópica. O termo parenteral como aqui usado inclui, por exemplo, administração intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, retal ou vaginal.

Embora todas estas formas de administração sejam contempladas claramente como estando dentro do escopo da invenção, uma forma para administração seria uma solução para injeção, em particular para injeção intravenosa ou intra-arterial ou gotejamento. Usualmente, uma composição farmacêutica adequada para injeção pode compreender um tampão (por exemplo, tampão de acetato, fosfato ou citrato), um tensoativo (por exemplo, polissorbato), opcionalmente um agente estabilizante (por exemplo, albumina humana), etc. Porém, em outros métodos compatíveis com os ensinamentos aqui, anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser liberados diretamente ao sítio da população celular adversa assim aumentando a exposição do tecido doente ao agente terapêutico.

[00322] Como previamente debatido, anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser administrados em uma quantidade farmacologicamente efetiva para o tratamento in vivo de lesão da espinha dorsal mamífera, doenças ou distúrbios associados à inibição do crescimento neuronal no SNC, doenças ou distúrbios associados à inibição do crescimento ou diferenciação de oligodendrócitos, e doenças que envolvem desmielinização ou dismielinização do SNC. Nesta consideração, será apreciado que os anticorpos descritos serão formulados para facilitar administração e promover estabilidade do agente ativo. Preferivelmente, as composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção compreendem um veículo farmacologicamente aceitável, não-tóxico, estéril tal como tampões salinos, não-tóxicos fisiológicos, conservantes e outros. Para o propósito do presente pedido de patente, uma quantidade farmacologicamente efetiva de um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo, conjugado ou não-conjugado, será mantido para significar uma

quantidade suficiente para alcançar ligação efetiva a um alvo e alcançar um benefício, por exemplo, para melhorar os sintomas de uma doença ou distúrbio ou detectar uma substância ou uma célula.

[00323] As composições farmacêuticas usadas nesta invenção compreende veículos farmaceuticamente aceitáveis, incluindo, por exemplo, permutador de íons, alumina, estearato de alumínio, lecitina, proteínas de soro, tal como albumina de soro humano, substâncias de tampão tais como fosfato, glicina, ácido sórbico, sorbato de potássio, misturas de glicerídeo parciais de ácidos graxos vegetais saturados, água, sais ou eletrólitos, tais como sulfato de protamina, fosfato de hidrogênio de dissódio, fosfato de hidrogênio de potássio, cloreto de sódio, sais de zinco, sílica coloidal, trissilicato de magnésio, polivinil pirrolidona, substâncias com base em celulose, polietileno glicol, carboximetilcelulose de sódio, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloco de polietileno-polioxipropileno, polietileno glicol e lanolina.

[00324] Preparações para administração parenteral incluem soluções, suspensões, e emulsões aquosas ou não-aquosas estéreis. Exemplos de solventes não-aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleos vegetais tais como azeite de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis tais como oleato de etila. Veículos aquosos incluem água, soluções, emulsões ou suspensões alcoólicas/aquosas, incluindo solução salina e meios tamponados. Na invenção em questão, veículos farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não são limitados a, 0,01-0,1 M e preferivelmente 0,05 M de tampão de fosfato ou 0,8% de solução salina. Outros veículos parenterais comuns incluem soluções de fosfato de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, Ringer lactado, ou óleos fixos. Veículos intravenosos incluem fluido e repositores de nutrientes, repositores de eletrólitos, tais como aqueles com base na dextrose de Ringer, e outros. Conservantes e outros aditivos podem estar também presentes tais como por exemplo,

antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, e gases inertes e outros.

[00325] Mais particularmente, composições farmacêuticas adequadas para o uso injetável incluem soluções aquosas estéreis (onde solúvel em água) ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. Em tais casos, a composição deve ser estéril e deveria ser fluida ao ponto que siringabilidade fácil exista. Deveria ser estável sob as condições de fabricação e armazenamento e deveria ser preferivelmente preservada contra a ação contaminante de microorganismos, tais como bactérias e fungos. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido, e outros), e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. Formulações adequadas para o uso nos métodos terapêuticos descritos aqui são descritas em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., 16ª ed. (1980).

[00326] Prevenção da ação de microorganismos pode ser alcançada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal e outros. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoóis, tais como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio na composição. Absorção prolongada das composições injetáveis pode ser provocada incluindo na composição um agente que tarda a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[00327] Em todo caso, soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando um composto ativo (por exemplo, um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou

derivado do mesmo, por si só ou em combinação com outros agentes ativos) na quantidade requerida em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados aqui, como requeridos, seguido por esterilização filtrada. Em geral, dispersões são preparadas incorporando o composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos que aqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem a vácuo e secagem por congelação que rende um pó de um ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional de uma solução previamente filtrada estéril do mesmo. As preparações para injeções são processadas, enchidas em recipientes tais como ampolas, sacos, garrafas, seringas ou frascos, e vedadas sob condições assépticas de acordo com os métodos conhecidos na técnica. Também, as preparações podem ser empacotadas e vendidas na forma de um kit tal como aqueles descritos em U.S.S.N copendente. 09/259.337 (US-2002-0102208 A1) que é incorporada aqui por referência em sua totalidade. Tais artigos de fabricação terão preferivelmente rótulos ou bulas indicando que as composições associadas são úteis para tratar um sujeito sofrendo, ou predisposto a distúrbios autoimunes ou neoplásticos.

[00328] Formulações parenterais podem ser uma dose de bolo simples, uma infusão ou uma dose de bolo de carga seguida com uma dose de manutenção. Estes composições podem ser administradas em intervalos fixos ou variáveis específicos, por exemplo, uma vez ao dia, ou em uma base "quando necessárias".

[00329] Certas composições farmacêuticas usadas nesta invenção podem ser administradas oralmente em uma forma de dosagem aceitável incluindo, por exemplo, cápsulas, comprimidos, suspensões ou soluções aquosas. Certas composições farmacêuticas podem

também ser administradas por aerossol nasal ou inalação. Tais composições podem ser preparadas como soluções em solução salina, empregando álcool benzílico ou outros conservantes adequados, promotores de absorção para intensificar a biodisponibilidade, e/ou outros agentes solubilizantes ou dispersantes convencionais.

[00330] A quantidade de um anticorpo de Sp35, ou fragmento, variante, ou derivado do mesmo que pode ser combinado com os materiais de veículo para produzir uma forma de dosagem simples variará, dependendo do hospedeiro tratado e do modo particular de administração. A composição pode ser administrada como uma dose simples, doses múltiplas ou em um período estabelecido de tempo em uma infusão. Regimes de dosagem também podem ser ajustados para fornecer a resposta desejada ótima (por exemplo, uma resposta terapêutica ou profiláctica).

[00331] De acordo com o escopo da presente descrição, anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser administrados a um animal humano ou outro de acordo com os métodos de tratamento mencionados acima em uma quantidade suficiente para produzir um efeito terapêutico. Os anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser administrados a tal animal humano ou outro em uma forma de dosagem convencional preparada combinando o anticorpo da invenção com um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável convencional de acordo com as técnicas conhecidas. Será reconhecido por alguém versado na técnica que a forma e caráter do veículo ou diluente farmacologicamente aceitável são ditados pela quantidade de ingrediente ativo com que será combinado, a rota de administração e outras variáveis bem-conhecidas. Aqueles versados na técnica também apreciarão que um coquetel compreendendo uma ou mais espécies de

anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem provar ser particularmente efetivas.

[00332] Doses efetivas das composições da presente invenção, para tratamento de lesão de espinha dorsal, doenças ou distúrbios associados à inibição do crescimento neuronal no SNC, doenças ou distúrbios associados à inibição do crescimento ou diferenciação de oligodendrócitos, e doenças que envolvem desmielinação ou dismielinação do SNC variam, dependendo de muitos fatores diferentes, incluindo meios de administração, sítio alvo, estado fisiológico do paciente, se o paciente é ser humano ou um animal, outras medicações administradas, e se tratamento é profilático ou terapêutico. Usualmente, o paciente é um ser humano mas mamíferos não-humanos incluindo mamíferos transgênicos podem ser também tratados. Dosagens de tratamento podem ser tituladas usando métodos rotineiros conhecidos àqueles de versado na técnica para otimizar a segurança e eficácia.

[00333] Para tratamento de lesão de espinha dorsal, doenças ou distúrbios associados à inibição do crescimento neuronal no SNC, doenças ou distúrbios associados à inibição do crescimento ou diferenciação de oligodendrócitos, e doenças que envolvem desmielinação ou dismielinação do SNC com um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo, a dosagem pode variar, por exemplo, de cerca de 0,0001 a 100 mg/kg, e mais usualmente 0,01 a 5 mg/kg (por exemplo, 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), do peso do corpo do hospedeiro. Por exemplo, as dosagens podem ser 1 mg/kg peso do corpo ou 10 mg/kg peso do corpo ou dentro da faixa de 1-10 mg/kg, preferivelmente pelo menos 1 mg/kg. Doses intermediárias nas faixas acima são também intencionadas estar dentro do escopo da invenção.

Os sujeitos podem ser administrados com tais doses diariamente, em dias alternativos, semanalmente ou de acordo com qualquer outro programa determinado por análise empírica. Um tratamento exemplar requer administração em dosagens múltiplas em um período prolongado, por exemplo, de pelo menos seis meses. Regimes de tratamento exemplares adicionais requerem administração uma vez a cada duas semanas ou uma vez ao mês ou uma vez a cada 3 a 6 meses. Programas de dosagem exemplares incluem 1-10 mg/kg ou 15 mg/kg em dias sucessivos, 30 mg/kg em dias alternados ou 60 mg/kg semanalmente. Em alguns métodos, dois ou mais anticorpos monoclonais com especificidades de ligação diferentes são administrados simultaneamente em cujo caso a dosagem de cada anticorpo administrado cai dentro das faixas indicadas.

[00334] Anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser administrados em ocasiões múltiplas. Intervalos entre as dosagens simples podem ser diários, semanalmente, mensal ou anualmente. Intervalos podem ser também irregulares como indicado medindo os níveis sanguíneos do polipeptídeo-alvo ou molécula alvo no paciente. Em alguns métodos, a dosagem é ajustada para alcançar uma concentração de polipeptídeo do plasma de 1-1000 µg/ml e em alguns métodos 25-300 µg/ml. Alternativamente, anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser administrados como uma formulação de liberação contínua em cujo caso administração menos frequente é requerida. Dosagem e frequência variam, dependendo da meia-vida do anticorpo no paciente. A meia-vida de um anticorpo de Sp35 pode ser também prolongada por meio de fusão a um polipeptídeo estável ou metade, por exemplo, albumina ou PEG. Em geral, anticorpos humanizados apresentam a meia-vida mais longa, seguidos por

anticorpos quiméricos e anticorpos não-humanos. Em uma modalidade, os anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser administrados em forma não-conjugada. Em outra modalidade, os anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser administrados múltiplas vezes em forma conjugada. Em ainda outra modalidade, anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser administrados em forma não-conjugadas, depois em forma conjugada, ou vice-versa.

[00335] As composições da presente invenção podem ser administradas por qualquer método adequado, por exemplo, parenteral, intraventricular, oral, por pulverização de inalação, tópica, retal, nasal, bucal, vaginalmente ou por meio de um reservatório implantado. O termo "parenteral" como aqui usado inclui técnicas de injeção ou de infusão subcutânea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intrassinovial, intraesternal, intratecal, intra-hepática, intralesional e intracraniana. Como previamente descrito, anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção atuam no sistema nervoso para promover sobrevivência, proliferação e diferenciação de oligodendrócitos e mielinização de neurônios e sobrevivência neuronal, regeneração de axônios e orientação axonal. Consequentemente, nos métodos da invenção, os anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos são administrados em um tal modo que eles cruzam a barreira hematoencefálica. Este cruzamento pode resultar das propriedades físicoquímicas inerente na própria molécula de anticorpo de Sp35, de outros componentes em uma formulação farmacêutica, ou do uso de um dispositivo mecânico tal como uma agulha, cânula ou instrumentos cirúrgicos para quebrar a barreira hematoencefálica. Onde

o anticorpo de Sp35 for uma molécula que não inerentemente cruza a barreira hematoencefálica, por exemplo, uma fusão a uma metade que facilita o cruzamento, rotas adequadas de administração são, por exemplo, intratecal ou intracranianas, por exemplo, diretamente em uma lesão crônica de SRA. Onde o anticorpo de Sp35 for uma molécula que inerentemente cruza a barreira hematoencefálica, a rota de administração pode ser antes de uma ou mais das várias rotas descritas abaixo. Em alguns métodos, os anticorpos são administrados como uma composição de liberação contínua ou dispositivo, tal como um dispositivo Medipad®. Liberação ao longo da barreira hematoencefálica pode ser intensificada por uma molécula de carga, tal como receptor anti-Fc, transferrina, receptor anti-insulina ou um conjugado de toxina ou intensificador de penetração.

[00336] Os anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos usados nos métodos da invenção podem ser infundidos diretamente no cérebro. Vários implantes para infusão cerebral direta dos compostos são conhecidos e efetivos na liberação dos compostos terapêuticos para pacientes humanos que sofrem de distúrbios neurológicos. Estes incluem infusão crônica no cérebro usando uma bomba, estereotaticamente implantada, cateteres intersticiais temporários, implantações de cateter intracraniano permanente, e implantes biodegradáveis cirurgicamente implantados. Vide, por exemplo, Gill et al., "Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease," *Nature Med.* 9: 589-95 (2003); Scharfen et al., "High Activity Iodine-125 Interstitial Implant For Gliomas," *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 24(4):583-91 (1992); Gaspar et al., "Permanent 125I Implants for Recurrent Malignant Gliomas," *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 43(5):977-82 (1999); capítulo 66, páginas 577-580, Bellezza et al., "Stereotactic Interstitial Brachytherapy," em Gildenberg et al., *Textbook of*

Stereotactic and Functional Neurosurgery, McGraw-Hill (1998); e Brem et al., "The Safety of Interstitial Chemotherapy with BCNU-Loaded Polymer Followed by Radiation Therapy in the Treatment of Newly Diagnosed Malignant Gliomas: Phase I Trial," J. Neuro-Oncology 26:111-23 (1995).

[00337] As composições podem também compreender um anticorpo de Sp35 dispersado em um material de veículo biocompatível que funciona como uma liberação adequada ou sistema de suporte para os compostos. Exemplos adequados de veículos de liberação contínua incluem matrizes poliméricas semipermeáveis na forma de artigos moldados tais como supositórios ou cápsulas. Matrizes de liberação sustentada implantáveis ou microcapsulares incluem polilactídeos (patente U.S. 3.773.319; EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama-etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers 22:547-56 (1985)); poli(2-hidroxietil-metacrilato), acetato de etileno vinila (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 (1981); Langer, Chem. Tech. 12:98-105 (1982)) ou ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988).

[00338] Em algumas modalidades da invenção, um anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo da invenção é administrado a um paciente através de infusão direta em uma região apropriada do cérebro. Vide, por exemplo, Gill et al., supra. Técnicas alternativas estão disponíveis e podem ser aplicadas para administrar um anticorpo de Sp35 de acordo com a invenção. Por exemplo, colocação estereotática de um cateter ou implante pode ser realizada usando a unidade de Riechert-Mundinger e a unidade de localização de multipropósitos ZD (Zamorano-Dujovny). Uma varredura de tomografia computadorizada de contraste intensificado (CT), injetando 120 ml de omnipaque, 350 mg de iodo/ml, com 2 mm de espessura de fatia pode permitir plano de tratamento multiplanar tridimensional (STP, Fischer, Friburgo, Alemanha). Este

equipamento permite planejamento com base nos estudos de imageamento de ressonância magnética, fundindo a informação alvo de CT e MRI para confirmação alvo clara.

[00339] O sistema estereotático de Leksell (Down Surgical, Inc., Decatur, GA) modificado para o uso com um escâner GE CT (General Electric Company, Milwaukee, WI) como também o sistema estereotático de Brown-Roberts-Wells (BRW) (Radionics, Burlington, MA) podem ser usados para este propósito. Desse modo, na manhã do implante, o anel de base anular da estrutura estereotática de BRW pode ser prendido ao crânio do paciente. Seções de CT em série podem ser obtidas em intervalos de 3 mm entretanto a região (tecido alvo) com uma estrutura de localizador de haste de grafita prendida à placa de base. Um programa de planejamento de tratamento computadorizado pode ser operado em um computador VAX 11/780 (Digital Equipment Corporation, Maynard, Mass.) usando coordenadas de CT das imagens da haste de grafita para mapear entre o espaço de CT e o espaço de BRW.

[00340] Anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser opcionalmente administrados em combinação com outros agentes que são efetivos em tratar distúrbio ou condição em necessidade de tratamento (por exemplo, profilático ou terapêutico).

X. DIAGNÓSTICOS

[00341] A invenção também fornece um método de diagnóstico útil durante a diagnose de distúrbios ou lesões neuronais que envolvem medir o nível de expressão da proteína de Sp35 ou transcrição em tecido ou outras células ou fluido do corpo de um indivíduo e comparar o nível de expressão medido com níveis de expressão de Sp35 padrões em tecido normal ou fluido do corpo por meio do qual um aumento no nível de expressão comparado ao padrão é indicativo de um distúrbio.

[00342] Anticorpos Sp35-específicos podem ser usados para ensaiar níveis de proteína em uma amostra biológica usando métodos imunohistológicos clássicos conhecidos àqueles versados na técnica (por exemplo, vide Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, et al., J. Cell Biol. 105:3087-3096 (1987)). Outros métodos com base em anticorpo úteis para detectar a expressão de proteína incluem imunoenaios, tais como o ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), imunoprecipitação, ou western blot. Ensaio adequados são descritos em outro lugar em mais detalhe aqui.

[00343] Para "ensaiar o nível de expressão de polipeptídeo de Sp35" é intencionado qualitativa ou quantitativamente medir ou estimar o nível de polipeptídeo de Sp35 em uma primeira amostra biológica ou diretamente (por exemplo, determinando ou estimando o nível de proteína absoluto) ou relativamente (por exemplo, comparando ao nível de polipeptídeo de câncer associado por uma segunda amostra biológica). Preferivelmente, o nível de expressão do polipeptídeo de Sp35 na primeira amostra biológica é medido ou estimado e comparado a um nível de polipeptídeo de Sp35 padrão, o padrão sendo ocupado de uma segunda amostra biológica obtida de um indivíduo não tendo o distúrbio ou sendo determinado ponderando os níveis de uma população de indivíduos não tendo o distúrbio. Como será apreciado na técnica, uma vez o nível de polipeptídeo de Sp35 "padrão" é conhecido, pode ser usado repetidamente como um padrão para comparação.

[00344] Por "amostra biológica" é intencionado qualquer amostra biológica obtida de um indivíduo, linhagem celular, cultura de tecido, ou outra fonte de células que potencialmente expressam Sp35. Métodos para obter biópsias de tecido e fluidos do corpo de mamíferos são bem conhecidos na técnica.

[00345] Anticorpos de Sp35 para o uso nos métodos diagnósticos descritos acima incluem qualquer anticorpo de Sp35 que

especificamente liga a um produto de gene de Sp35, como descrito em outro lugar aqui.

XI. IMUNOENSAIOS

[00346] Anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção podem ser ensaiados para ligação imuno específica por qualquer método conhecido na técnica. Os imunoenaios que podem ser usados incluem mas não são limitados a sistemas de ensaio competitivos e não-competitivos usando técnicas tais como western blot, radioimunoenaios, ELISA (ensaio imunoabsorvente ligado a enzima), imunoenaios em "sanduíche", ensaios de imunoprecipitação, reações de precipitina, reações de precipitina de difusão em gel, ensaios de imunodifusão, ensaios de aglutinação, ensaios de fixação de complemento, ensaios imunorradiométricos, imunoenaios fluorescentes, imunoenaios de proteína A, para nomear alguns. Tais ensaios são rotineiros e bem-conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Ausubel et al., eds, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, Vol. 1 (1994) que é incorporada por referência aqui em sua totalidade). Imunoenaios exemplares são brevemente descritos abaixo (mas não são intencionados por via de limitação).

[00347] Protocolos de imunoprecipitação em geral compreendem lisar uma população de células em um tampão de lise tal como tampão de RIPA (1% de NP-40 ou Triton X-100, 1% de deoxicolato de sódio, 0,1% de SDS, 0,15 M de NaCl, 0,01 M de fosfato de sódio em pH 7,2, 1% de Trasylol) suplementado com inibidores de proteína fosfatase e/ou de protease (por exemplo, EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sódio), acrescentando o anticorpo de interesse ao lisado de célula, incubando durante um período de tempo (por exemplo, 1-4 horas) a 4 graus, adicionando esferas de sefarose de proteína A e/ou proteína G ao lisado celular, incubando durante cerca de uma hora ou mais a 4 graus,

lavando as esferas em tampão de lise e ressuspensando as esferas em tampão de SDS/amostra. A habilidade do anticorpo de interesse para imunoprecipitar um antígeno particular pode ser avaliada, por exemplo, por análise de western blot. Alguém versado na técnica seria instruído sobre os parâmetros que podem ser modificados para aumentar a ligação do anticorpo a um antígeno e diminuir a base (por exemplo, pré-clareando a célula lisada com esferas de sefarose). Para debate adicional com relação aos protocolos de imunoprecipitação vide, por exemplo, Ausubel et al., eds, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, Vol. 1 (1994) em 10.16.1.

[00348] Análise de western blot em geral compreende preparar as amostras de proteína, eletroforese das amostras de proteína em um gel de poliacrilamida (por exemplo, 8%-20% de SDS-PAGE dependendo do peso molecular do antígeno), transferir a amostra de proteína do gel de poliacrilamida para uma membrana tal como nitrocelulose, PVDF ou náilon, bloquear a membrana em solução de bloqueio (por exemplo, PBS com 3% de BSA ou leite sem gordura), lavar a membrana em tampão de lavagem (por exemplo, PBS-Tween 20), bloquear a membrana com anticorpo primário (anticorpo de interesse) diluído em tampão de bloqueio, lavar a membrana em tampão de lavagem, bloquear a membrana com um anticorpo secundário (que reconhece o anticorpo primário, por exemplo, um anticorpo anti-humano) conjugado com um substrato enzimático (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre ou fosfatase alcalina) ou molécula radioativa (por exemplo, ³²P ou ¹²⁵I) diluída em tampão de bloqueio, lavar a membrana em tampão de lavagem, e detectar a presença do antígeno. Alguém versado na técnica seria instruído sobre os parâmetros que podem ser modificados para aumentar o sinal detectado e reduzir o ruído de fundo. Para mais debate com relação aos protocolos de western blot vide, por exemplo, Ausubel et al., eds, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley

& Sons, Inc., Nova Iorque Vol. 1 (1994) em 10.8.1.

[00349] ELISAs compreendem preparar o antígeno, revestir o poço de uma placa de microtitulação de 96 poços com o antígeno, acrescentar o anticorpo de interesse conjugado com um composto detectável tal como um substrato enzimático (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre ou fosfatase alcalina) ao poço e incubar durante um período de tempo, e detectar a presença do antígeno. Em ELISAs, o anticorpo de interesse não tem que ser conjugado com um composto detectável; do contrário, um segundo anticorpo (que reconhece o anticorpo de interesse) conjugado com um composto detectável pode ser acrescentado ao poço. Também, em vez de revestir o poço com o antígeno, o anticorpo pode ser revestido no poço. Neste caso, um segundo anticorpo conjugado para um composto detectável seguinte pode ser acrescentado à adição do antígeno de interesse ao poço revestido. Alguém versado na técnica seria instruído sobre os parâmetros que podem ser modificados para aumentar o sinal detectado como também outras variações de ELISAs conhecidas na técnica. Para mais debate com relação a ELISAs vide, por exemplo, Ausubel et al., eds, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, Vol. 1 (1994) em 11.2.1.

[00350] A afinidade de ligação de um anticorpo para um antígeno e a taxa de dissociação de uma interação de anticorpo-antígeno pode ser determinada através de ensaios de ligação competitivos. Um exemplo de um ensaio de ligação competitivo é um radioimunoensaio compreendendo a incubação do antígeno marcado (por exemplo, ^3H ou ^{125}I) com o anticorpo de interesse na presença de quantidades crescentes de antígeno não-marcado, e a detecção do anticorpo ligado ao antígeno marcado. A afinidade do anticorpo de interesse para um antígeno particular e as taxas de dissociação de ligação podem ser determinadas dos dados através de análise gráfica scatchard.

Competição com um segundo anticorpo pode ser também determinada usando radioimunoensaios. Neste caso, o antígeno é incubado com anticorpo de interesse conjugado com um composto marcado (por exemplo, ^3H ou ^{125}I) na presença de quantidades crescentes de um segundo anticorpo não-marcado.

[00351] Anticorpos de Sp35, ou fragmentos de ligação de antígeno, variantes, ou derivados dos mesmos da invenção, adicionalmente, são empregados histologicamente, como em imunofluorescência, microscopia de imunoelêtron ou ensaios não-imunológicos, para detecção in situ de produtos de gene de antígeno de câncer ou variantes conservadas ou fragmentos de peptídeo dos mesmos. Detecção in situ pode ser realizada removendo um espécime histológico de um paciente, e aplicando um anticorpo de Sp35 marcado a este, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo, preferivelmente aplicado revestindo o anticorpo marcado (ou fragmento) sobre uma amostra biológica. Através do uso de tal procedimento, é possível não só determinar a presença de proteína de Sp35, ou variantes conservadas ou fragmentos de peptídeo, mas também sua distribuição no tecido examinado. Usando a presente invenção, aqueles versado facilmente perceberão que qualquer um de uma ampla variedade de métodos histológicos (tais como procedimentos de manchamento) podem ser modificados para alcançar tal detecção in situ.

[00352] Imunoensaios e não-imunoensaios para produtos de gene de Sp35 ou variantes conservadas ou fragmentos de peptídeo dos mesmos tipicamente compreenderão incubar uma amostra, tal como um fluido biológico, um extrato de tecido, células recentemente colhidas, ou lisados de células que foram incubados em cultura de célula, na presença de um anticorpo detectavelmente marcado capaz de ligar a Sp35 ou variantes conservadas ou fragmentos de peptídeo do mesmo, e detectar o anticorpo ligado por quaisquer de várias técnicas bem-

conhecidas na técnica.

[00353] A amostra biológica pode ser colocada em contato e imobilizada sobre um suporte de fase sólida ou veículo tal como nitrocelulose, ou outro suporte sólido que é capaz de imobilizar células, partículas de célula ou proteínas solúveis. O suporte pode ser depois lavado com tampões adequados seguido por tratamento com o anticorpo de Sp35 detectavelmente marcado, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo. O suporte de fase sólida pode ser depois lavado com o tampão uma segunda vez para remover o anticorpo não-ligado. Opcionalmente o anticorpo é subsequentemente marcado. A quantidade de marcação ligada no suporte sólido pode ser depois detectada por meios convencionais.

[00354] Por "suporte de fase sólida ou veículo" é intencionado qualquer suporte capaz de ligar um antígeno ou um anticorpo. Suportes ou veículos bem-conhecidos incluem vidro, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrana, náilon, amilases, celulosas naturais e modificadas, poliacrilamidas, gabros, e magnetita. A natureza do veículo pode ser até certo ponto solúvel ou insolúvel para o propósito da presente invenção. O material de suporte pode ter virtualmente qualquer possível configuração estrutural desde que a molécula acoplada seja capaz de ligação a um antígeno ou anticorpo. Desse modo, a configuração de suporte pode ser esférica, como em uma esfera, ou cilíndrico, como na superfície de dentro de um tubo de teste, ou a superfície externa de uma haste. Alternativamente, a superfície pode ser plana tal como uma folha, tira de teste, etc. Suportes preferidos incluem esferas de poliestireno. Aqueles versados na técnica conhecerão muitos outros veículos adequados para ligar anticorpo ou antígeno, ou poderão apurar o mesmo mediante o uso de experimentação rotineira.

[00355] A atividade de ligação de um lote dado de anticorpo de Sp35, ou fragmento de ligação de antígeno, variante, ou derivado do mesmo

pode ser determinada de acordo com métodos bem-conhecidos. Aqueles versados na técnica poderão determinar operação e condições ótimas de ensaio para cada determinação empregando experimentação rotineira.

[00356] Há uma variedade de métodos disponíveis para medir a afinidade de uma interação de anticorpo-antígeno, mas relativamente poucos para determinar constantes de taxa. A maioria dos métodos esfera com anticorpo ou antígeno de marcação que inevitavelmente complicam as medições rotineiras e introduzem incertezas nas quantidades medidas.

[00357] Ressonância de plasmon de superfície (SPR) como executada em BIAcore oferece várias vantagens sobre os métodos convencionais de medir a afinidade das interações de anticorpo-antígeno: (i) nenhum requerimento para marcação anticorpo ou antígeno; (ii) anticorpos não necessitam ser purificados com antecedência, sobrenadante de cultura de célula pode ser usado diretamente; (iii) medições de tempo real, permitindo comparação semiquantitativa rápida das interações de anticorpos monoclonais diferentes, são permitidas e são suficientes para muitos propósitos de avaliação; (iv) superfície bioespecífica pode ser regenerada de forma que uma série de anticorpos monoclonais diferentes pode ser facilmente comparada sob condições idênticas; (v) procedimentos analíticos são completamente automatizada e uma série extensiva de medições pode ser executada sem intervenção do usuário. BIAapplications Handbook, versão AB (reimpresso em 1998), código de BIACORE No. BR-1001-86; BIAtechnology Handbook, versão AB (reimpresso em 1998), código de BIACORE No. BR-1001-84.

[00358] Estudos de ligação com base em SPR requerem que o membro de um par de ligação seja imobilizado em uma superfície de sensor. O par de ligação imobilizado é referido como o ligante. O par de

ligação na solução é referido como o analito. Em alguns casos, o ligante está indiretamente ligado à superfície ligando a outra molécula imobilizada, que é referida como a molécula capturadora. Resposta de SPR reflete uma alteração na concentração de massa na superfície do detector conforme os analitos se ligam ou se dissociam.

[00359] Com base em SPR, medições de BIAcore de tempo real monitoram diretamente as interações à medida que elas ocorrem. A técnica é bem adaptada para a determinação de parâmetros cinéticos. Classificação por afinidade comparativa é extremamente simples de executar, e ambas constantes cinéticas e de afinidade podem ser derivadas dos dados de sensorgrama.

[00360] Quando analito estiver injetado em um pulso distinto ao longo de uma superfície de ligante, o sensorgrama resultante pode ser divididos em três fases essenciais: (i) Associação de analito com ligante durante injeção da amostra; (ii) Estado de equilíbrio ou fixo durante a injeção da amostra onde a taxa de ligação do analito é equilibrada através de dissociação do complexo; (iii) Dissociação do analito da superfície durante o fluxo do tampão.

[00361] As fases de associação e de dissociação fornecem informação sobre a cinética de interação de analito-ligante (k_a e k_d , as taxas de formação complexa e dissociação, $k_d/k_a = K_D$). A fase de equilíbrio fornece informação sobre a afinidade da interação de analito-ligante (K_D).

[00362] Software de BIAevaluation provê recursos inclusivos para ajuste de curva usando integração numérica e algoritmos de ajuste globais. Com análise adequada dos dados, taxa separada e constantes de afinidade para interação podem ser obtidas de investigações de BIAcore simples. A faixa de afinidades mensuráveis por esta técnica é muito vasta variando de mM a pM.

[00363] Especificidade do epítopo é uma característica importante de

um anticorpo monoclonal. Mapeamento de epitopo com BIAcore, em contraste com as técnicas convencionais usando radioimunoensaio, ELISA ou outros métodos de adsorção de superfície, não requerem anticorpos de marcação ou purificação, e permitem testes de especificidade de sítios múltiplos usando uma sequência de vários anticorpos monoclonais. Adicionalmente, números grandes de análises podem ser automaticamente processados.

[00364] Experimentos de ligação em pares testam a habilidade dos dois MAbs para ligar simultaneamente ao mesmo antígeno. MAbs direcionados contra epitopos separados se ligarão independentemente, enquanto que os MAbs direcionados contra epitopos idênticos ou estritamente relacionados interferirão com a ligação um ao outro. Estes experimentos de ligação com BIAcore são objetivos.

[00365] Por exemplo, pode-se usar uma molécula de captura para ligar o primeiro Mab, seguido sequencialmente por adição de antígeno e segundo MAb. Os sensorgramas revelarão: 1. quanto do antígeno liga ao primeiro Mab, 2. até que ponto o segundo MAb liga ao antígeno ligado à superfície, 3. se o segundo MAb não se liga, se inverter a ordem do teste em pares altera os resultados.

[00366] Inibição de peptídeo é outra técnica usada para mapeamento de epitopo. Este método pode complementar os estudos de ligação de anticorpo em pares de complemento, e pode relatar epitopos funcionais às características estruturais quando a sequência primária do antígeno for conhecida. Peptídeos ou fragmentos de antígeno são testados para inibição da ligação de MAbs diferentes ao antígeno imobilizado. Peptídeos que interferem com a ligação de um MAb dado são assumidos ser estruturalmente relacionados ao epitopo definido por aquele MAb.

[00367] A prática da presente invenção empregará, a menos que do contrário indicado, técnicas convencionais de biologia de célula, cultura

de célula, biologia molecular, biologia transgênica, microbiologia, DNA recombinante, e imunologia que estão dentro da habilidade da técnica. Tais técnicas são explicadas completamente na literatura. Vide, por exemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª Ed., Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., ed., Cold Springs Harbor Laboratory, Nova Iorque (1992), DNA Cloning, D. N. Glover ed., Volumes I e II (1985); Oligonucleotide Synthesis, M. J. Gait ed., (1984); Mullis et al. Patente U.S. 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization, B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); Transcription And Translation, B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); Culture Of Animal Cells, R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., (1987); Immobilized Cells And Enzymes, IRL Press, (1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); o tratado, Methods In Enzymology, Academic Press, Inc., N.Y.; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, J. H. Miller e M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1987); Methods In Enzymology, Vols. 154 e 155 (Wu et al. eds.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology, Mayer e Walker, eds., Academic Press, Londres (1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV, D. M. Weir e C. C. Blackwell, eds., (1986); Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); e em Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).

[00368] Princípios gerais de engenheirar anticorpo estão expostos em Antibody Engineering, 2ª edição, C.A.K. Borrebaeck, Ed., Oxford Univ. Press (1995). Princípios gerais de engenheirar proteína estão expostos em Protein Engineering, A Practical Approach, Rickwood, D., et al., Eds., IRL Press na Oxford Univ. Press, Oxford, Ing. (1995). Princípios gerais de ligação de anticorpos e anticorpo-hapteno estão expostos em: Nisondissociação, A., Molecular Immunology, 2ª ed.,

Sinauer Associates, Sunderland, MA (1984); e Steward, M. W., Antibodies, Their Structure and Function, Chapman and Hall, Nova Iorque, NY (1984). Adicionalmente, métodos padrões em imunologia conhecidos na técnica e não especificamente descritos são em geral seguidos como em Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nova Iorque; Stites et al. (eds), Basic and Clinical Immunology (8ª ed.), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) e Mishell and Shiigi (eds), Selected Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., Nova Iorque (1980).

[00369] Trabalhos de referência padrões expondo os princípios gerais de imunologia incluem Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nova Iorque; Klein, J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1982); Kennett, R., et al., eds., Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Nova Iorque (1980); Campbell, A., "Monoclonal Antibody Technology" em Burden, R., et al., eds., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13, Elsevier, Amsterdam (1984), Kuby Immunology 4ª ed. Ed. Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt e Barbara A. Osborne, H. Freeman & Co. (2000); Roitt, I., Brostoff, J. e Male D., Immunology 6ª ed. Londres: Mosby (2001); Abbas A., Abul, A. e Lichtman, A., Cellular and Molecular Immunology Ed. 5, Elsevier Health Sciences Division (2005); Kontermann e Dubel, Antibody Engineering, Springer Verlag (2001); Sambrook e Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press (2001); Lewin, Genes VIII, Prentice Hall (2003); Harlow e Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988); Dieffenbach e Dveksler, PCR Primer Cold Spring Harbor Press (2003).

[00370] Todas as referências citadas acima, como também todas as referências citadas aqui, são incorporadas aqui por referência em suas

totalidades.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Sp35 está envolvido em biologia de oligodendrócitos

[00371] Oligodendrócitos amadurecem através de vários estágios de desenvolvimento de células progenitoras de A2B5 (que expressam A2B5), diferenciando em oligodendrócitos pré-mielinizantes (que expressam O1 e O4) e por fim em oligodendrócitos mielinizantes maduros (que expressam O1, O4 e MBP). Desse modo, monitorando a presença e ausência dos marcadores de A2B5, O1, O4 e MBP, é possível para determinar o estágio de desenvolvimento de uma célula dada e avaliar o papel de Sp35-Fc em biologia de oligodendrócitos. Para uma revisão geral de biologia de oligodendrócitos, vide, por exemplo, Baumann e Pham-Dinh, *Physiol. Rev.* 81: 871-927 (2001).

[00372] Anticorpos monoclonais contra O4, MBP e CNPase foram de Sternberger Monoclonals; anticorpo para APC (clone CC-1; ref. 29) foi de Calbiochem. Outros anticorpos foram a β III tubulina (Covance), Sp35 (Biogen Idec), Fyn (Santa Cruz Biotechnology) e fosfo-Fyn (Biosource). Anticorpos monoclonais contra A2B5 são disponíveis de Chemicon.

Sp35 é expressado em oligodendrócitos

[00373] A expressão de Sp35 em culturas de rato purificadas de neurônio de P13 CG, oligodendrócito de P2, e astrócito de P4 foi analisada através de reação em cadeia de polimerase após transcrição reversa (RT-PCR). Um kit de Ambion, Inc. foi usado para extrair o mRNA das células cerebrais de rato de acordo com as instruções do fabricante. RT-PCR semiquantitativa foi realizada usando iniciador direto 5' AGAGACATGCGATTGGTGA 3' (SEQ ID NO: 344), e iniciador reverso 5' AGAGATGTAGACGAGGTCATT 3' (SEQ ID NO: 345) mostrou expressão alta em neurônios, expressão inferior em oligodendrócitos, e nenhuma expressão em astrócitos.

[00374] A expressão de Sp35 em oligodendrócitos foi confirmada por hibridação in situ em seções derivadas do nervo ótico de rato adulto. Seções do nervo ótico de rato foram preparadas e processadas como descrito em Mi et al., "Sp35 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex", Nat. Neurosci. 7: 221-28 (2004) e sondadas com RNAs antissentido ou sentido de Sp35 marcado com digoxigenina usando os primeiros 500 nucleotídeos da sequência de codificação de Sp35. As seções foram tingidas de acordo com as instruções do fabricante usando um kit de Amplificação de Sinal Tyramide (Amersham Biosciences) e um kit de anticorpo conjugado de anti-digoxigenina fluorescente (Perkin Elmer). Para análises combinadas in situ e de imunofluorescência, as seções foram primeiro sondadas com RNA marcados com digoxigenina e depois com anticorpos, por exemplo, anticorpo de CC1 (Calbiochem; um marcador de oligodendrócitos maduros) ou anticorpo anti-Sp35. Observou-se que os oligodendrócitos que hibridaram com a uma sonda de Sp35 antissentido também cotingiram com um anticorpo para CC1 (dados não mostrados). Nenhuma marcação específica foi observada usando uma sonda de Sp35 sentido. Expressão de Sp35 em oligodendrócitos foi também confirmada por estudos de imunoistoquímica das seções de tecido da região do ventrículo lateral do córtex de rato de P7. Uma maior parte das células corticais que marcaram com anticorpo de CC1 também marcaram com anticorpo anti-Sp35. Dados não mostrados. A especificidade da interação foi confirmada por pré-adsorção do anticorpo anti-Sp35 com Sp35-Fc (vide Exemplo 2) que eliminou o sinal.

Knockdown de RNAi Sp35-específico de expressão de Sp35 promove crescimento e diferenciação dos oligodendrócitos

[00375] RNAi Sp35-específico foi usado para ablação da expressão de Sp35 em células de precursor de oligodendrócitos para examinar como Sp35 contribui para o crescimento e diferenciação de

oligodendrócitos. 50.000 células de precursor de oligodendrócito de A2B5 foram infectadas com lentivírus carregando a sequência de RNAi Sp35-específica ou controle RNAi preparado como segue.

[00376] Sequências de DNA de Sp35 murino e de rato foram comparadas para encontrar regiões homólogas para usar RNAs candidatos de hairpin pequeno (shRNA). CH324, para expressão de lentivírus de RNAi de Sp35, foi construído anelando os oligonucleotídeos LV1-035 e LV1-036 e ligado a pLL3.7 digerido com HpaI e XhoI. A metodologia de vetor de pLL3.7 adicional, e produção de vírus foram como descritas em Robinson et al., Nat. Genet. 33, 401-06 (2003). Os oligonucleotídeos de RNAi de Sp35 foram comprados de MWG e têm as sequências a seguir: LV1-035 (oligo de sentido) LV1-035 (oligo de sentido) 5' - TGA TCG TCA TCC TGC TAG ACT TCA AGA GAG TCT AGC AGG ATG ACG ATC TTT TTT C - 3' (SEQ ID NO: 346) e LV1-036 (oligo de antissentido) 5' - TCG AGA AAA AAG ATC GTC ATC CTG CTA GAC TCT CTT GAA GTC TAG CAG GAT GAC GAT CA - 3' (SEQ ID NO: 347).

[00377] RNAi de controle foi projetado com as mesmas sequências de oligonucleotídeo com exceção das alterações de nucleotídeo indicadas em letras minúsculas: 5' - TGA TCG TCA TCC TGC TAG ACT TCA AGA GAG TCT AGC AGG ATG ACG ATC TTT TTT C - 3' (SEQ ID NO: 348) e 5' - TCG AGA AAA AAG ATC GTC ATC CTG CTA GAC TCT CTT GAA GTC TAG CAG GAT GAC GAT CA - 3' (SEQ ID NO: 347).

[00378] Antes de produzir o lentivírus, DNA de pLL3.7 ou shRNA candidato em pLL3.7 foram cotransfectados com plasmídeo de Sp35-HA murino marcado em uma razão de 5 a 1 em células CHO em um formato de 6 poços. Knockdown foi analisado por detecção de western blot de marcador de Sp35-HA de lisados de células CHO transfeccionados como também por northern blot de RNA total preparado de poços duplicados. O borrão foi sondado com um

fragmento de cDNA de Sp35. Ensaios foram executados 48 horas pós-transfecção. Como esperado, houve uma redução de 10 vezes do mRNA de Sp35 em células CHO tratadas com RNAi de CH324 com relação às células tratadas com controle. Dados não mostrados. Lentivírus de RNAi carregando a proteína fluorescente verde (GFP) foi gerado como descrito em Robinson et al. Em culturas tratadas com controle ou RNAi de Sp35, aproximadamente 80% dos oligodendrócitos eram positivos de GFP. Número de células total não foi alterado pelos tratamentos de RNAi. Para quantificar os efeitos de RNAi na diferenciação, apenas oligodendrócitos expressando GFP foram contados.

[00379] Populações enriquecidas de oligodendrócitos foram crescidas de ratas de P2 Long Evans como descrito por Conn, Meth. Neurosci. 2:1-4 (Academic Press; 1990) com modificações como segue. Brevemente, o cérebro anterior foi o ditocado e colocado na solução salina tamponada de Hank (HBSS; Invitrogen). O tecido foi cortado em fragmentos de 1 mm e foi incubado a 37°C por 15 min em 0,01% de tripsina e 10 µg/ml de DNase. Células dissociadas foram banhadas em frascos de cultura de tecido de T75 revestidos com poli-L-lisina e foram crescidas às 37°C por 10 d em meio de DMEM com 20% de soro de bezerro fetal (Invitrogen). Precursores de oligodendrócitos (A2B5+) foram colhidos agitando o frasco durante a noite a 200 rpm a 37°C, resultando em uma população 95% pura. As culturas foram mantidas em glicose alta em meio de Eagle modificados de Dulbecco (DMEM) com FGF/PDGF (10 ng/ml; Peprotech) durante 1 semana. Remoção de FGF/PDGF permitiu as células de A2B5+ diferenciarem em oligodendrócitos pré-mielinizantes de O4+ após 3-7 d, e diferenciarem em oligodendrócitos maduros de O4+ e MBP+ após 7-10 d. Estes estados de diferenciação são facilmente evidentes das alterações na morfologia: células de A2B5+ são bipolares em forma, oligodendrócitos

premielinizantes de O4+ têm processos muito mais demorados e ramificados e oligodendrócitos maduros de MBP+ contêm estruturas de folha de mielina entre os processos.

[00380] Células de precursor de oligodendrócitos de A2B5 foram infectadas com o lentivírus contendo RNAi de CH324. As células resultantes foram cultivadas por 3 dias e o número de oligodendrócitos O4-positivos (um marcador para diferenciação de oligodendrócito) foi contado. Expressão de Sp35 endógeno foi reduzida através de infecção com lentivírus de RNAi de Sp35 e foi confirmada por RT-PCR. Redução de Sp35 resultou em oligodendrócitos maduros mais altamente diferenciados quando comparado com células infectadas com controle, como foi evidente pelos aumentos no comprimento dos processos de célula e pela presença de estruturas de folha de mielina abundantes (dados não mostrados). Em células que expressaram RNAi de Sp35, houve oligodendrócitos três vezes mais maduros (O4-positivos) que nas culturas de controle. Estes dados indicam que Sp35 pode negativamente regular a diferenciação de oligodendrócitos.

Sp35 dominante-negativo promove crescimento e diferenciação de oligodendrócitos

[00381] Vetores lentivirais que expressam o tipo selvagem e uma forma dominante-negativa de Sp35 foram construídos. Sequência de DNA que codifica Sp35 de camundongo de comprimento total (FL-Sp35, resíduos de aminoácido 34-614 da SEQ ID NO: 2) foram amplificadas por PCR usando iniciadores 5' - GAG GAT CTC GAC GCG GCC GCA TGG AGA CAG ACA CAC TCC TG - 3' (SEQ ID NO: 350) e 5' - GGG GCG GAA TTG GAT CCT CAC AGA TCC TCT TCT GAG ATG AG - 3' (SEQ ID NO: 351) e inseridos no vetor lentiviral de HRST-IRES-eGFP nos sítios NotI e BamHI. Similarmente, a sequência de DNA que codifica Sp35 dominante negativo (DN-Sp35, resíduos de aminoácido 34-581 da SEQ ID NO: 2) foi amplificada por PCT usando iniciadores 5' -GAG GAT

CTC GAC GCG GCC GCA TGG AGA CAG ACA CAC TCC TG - 3' (SEQ ID NO: 352) e 5' - GAT ACG GAT CCT CAG CCT TTG CCC CGG CTC CAT AGA AAC AGC - 3' (SEQ ID NO: 353). Os plasmídeos FL-Sp35 e DN-Sp35 foram transfeccionados para células 293 para produzir lentivírus como descrito por Robinson 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: 401-06 (2003). Oligodendrócitos foram infectados com lentivírus a 2 MOI por célula e expressão confirmada de FL-Sp35 e DN-Sp35 através de western blot. [00382] DN-Sp35 promoveu diferenciação de oligodendrócitos, produzindo um aumento no número de oligodendrócitos maduros. Em contraste, supraexpressão de Sp35 de comprimento total (FL-Sp35) teve o efeito oposto e inibiu a diferenciação, como foi evidente por uma redução no número de oligodendrócitos maduros quando comparado com o controle (dados não mostrados).

EXEMPLO 2

Construção e purificação de proteína de fusão de Sp35-Fc

[00383] Uma construção foi feita fundindo a porção extracelular de Sp35 humano (resíduos 1-532) para a região de dobradiça e de Fc de IgG1 humana para estudar a função biológica de Sp35. Uma sequência de codificação parcial para Sp35 humano foi obtida por PCR do clone 227.2 usando o iniciador direto 5' - CAG CAG GTC GAC GCG GCC GCA TGC TGG CGG GGG GCG T -3' (SEQ ID NO: 354) e iniciador reverso 5' - CAG CAG GTC GAC CTC GCC CGG CTG GTT GGC CAA CCA GCC GGG CGA GGT CGA CCT CGA GG - 3' (SEQ ID NO: 355).

[00384] O produto de PCR de extremidade cega foi subclonado no sítio de SrfI do vetor PCR SCRIPT AMP (Stratagene) para criar PCR SCRIPT AMP-Sp35. Um fragmento de Sall foi isolado de PCR SCRIPT AMP-Sp35 e subclonado no vetor de Ig PCRCAMP (derivado do vetor de Stratagene PCR SCRIPT AMP). No vetor de Ig PCRCAMP, a

sequência de dobradiça e de Fc gama é subclonada como um fragmento de Sall(5') para NotI(3'). O fragmento de Sp35 de Sall foi subclonado no sítio de Sall do vetor de Ig PCRCAMP assim fundindo a sequência sinal de Sp35 e o domínio extracelular (códon 1-532) dentro da estrutura com as sequências que codificam a região de dobradiça e de Fc de Ig1 humano. Isolamento correto foi identificado, e um fragmento de NotI abrangendo o fragmento de Sp35-Fc foi subclonado no sítio de clonagem de NotI simples do vetor de expressão de CHO, PV90 (Biogen Idec). O plasmídeo resultante foi confirmado por sequenciação de DNA e designado GT123.

[00385] Linhagens celulares estáveis que expressam a proteína de fusão de Sp35-Fc foram geradas por eletroporação de células hospedeiras de CHO DG44 com plasmídeo GT123. Células CHO transfeccionadas foram cultivadas em menos MEM alfa na presença de 10% de soro dializado e 4 mM de glutamina para selecionar o crescimento independente de nucleosídeo. Quatorze dias pós-transfecção, células foram alimentadas com meios frescos. Para triar as células que expressam Sp35-Fc, as células CHO foram marcadas com IgG anti-humana de cabra marcada com ficoeritrina (PE) (Jackson Lab) e submetida à classificação de citometria de fluxo de velocidade alta em um FACS Mo-Flo (Cytomation). As células que expressaram os níveis mais altos de Sp35-Fc foram selecionadas. Estas células foram expandidas em cultura durante 7 dias, depois remarcadas e reclassificadas. Células que expressam os níveis mais altos de Sp35-Fc foram isoladas como clones de indivíduo em placas de 96 poços. Estes clones foram crescidos durante duas semanas e depois alimentados com meios frescos um dia antes da análise de FACS para verificar os níveis de expressão. Os clones que expressaram os níveis mais altos de Sp35-Fc foram expandidos, e bancos de célula congelados foram estabelecidos. As linhagens celulares foram

adaptadas para crescer em cultura de suspensão nos meios livres de soro BCM16. A titulação de Sp35-Fc produzida por estes clones foi determinada cultivando as linhagens celulares a 37°C por 4-5 passagens, depois cultivando as células a 50% de densidade celular máxima e cultivando-as durante 10-15 dias a 28°C até que a densidade celular viável caísse para 75%. Neste momento, os meios de cultura foram colhidos, limpidos das células e restos através de centrifugação, e os sobrenadantes da cultura titulados para níveis de Sp35-Fc por análise de western blot usando um anticorpo de Ig anti-humano (Jackson Lab) como a sonda.

[00386] Proteína de fusão de Sp35-Fc foi purificada do meio de cultura clarificado como segue: 9 ml de 1M de HEPES pH 7,5 foram acrescentados a 900 ml de meio condicionado. O meio foi carregado em bateladas por 3 h a 4°C sobre 3 ml de Proteína A Sepharose (Amersham Bioscience). A resina foi colhida em uma coluna de 1,5 cm (RG), e lavada quatro vezes com 3 ml de PBS, duas vezes com 4 ml de PBS contendo 800 mM de NaCl, e depois novamente com 3 ml de PBS. O Sp35-Fc foi eluído da coluna com 25 mM de NaH₂PO₄, pH 2,8 e 100 mM de NaCl em frações de 1,5 ml e neutralizado adicionando 75 µl de 0,5 M de NaH₂PO₄, pH 8,6. Frações contendo proteína de pico foram identificadas através de absorbância a 280 nm, agrupadas, e submetidas à outra purificação em uma coluna de 1 ml de Proteína A. Antes de carregar, NaCl foi acrescentado a 600 mM e HEPES, pH 7,5 a 50 mM. A coluna foi lavada duas vezes com 600 µl de 10 mM pH de HEPES 7,5 e 1 M NaCl, e depois com 1 ml de PBS. Sp35-Fc foi eluído da coluna com 25 mM de NaH₂PO₄, pH 2,8 e 100 mM de NaCl, colhendo 0,5 ml de frações, e neutralizado adicionando 25 µl de 0,5 M de NaH₂PO₄, pH 8,6. Frações contendo proteína de pico foram identificadas através de absorbância a 280 nm e agrupadas. Reduzindo SDS-PAGE, a proteína de Sp35-Fc migrou como uma banda simples

(>95% pura) com uma massa evidente de 90 kDa. Sob condições não-redutoras, a proteína correu como um dímero com uma massa aproximada de 180 kDa. A proteína de Sp35-Fc purificada foi alíquotada e armazenada a -70°C.

EXEMPLO 3

Produção de Anticorpos Monoclonais Sp35-específicos

[00387] Anticorpos de Anti-Sp35 que especificamente ligam um polipeptídeo de Sp35 da invenção foram feitos usando os métodos e procedimentos a seguir.

A. Ensaios de Triagem de Anticorpo

1. Ensaio de ELISA

[00388] Sp35-Fc (0,5 µg em 50 µl de 0,1 M de tampão de bicarbonato de sódio, pH 9,0) foi adicionado a cada poço das placas de 96 poços de MaxiSorp® (Nunc®). As placas foram depois incubadas a 37°C durante 1 hora ou 4°C durante 16 horas. Os sítios de ligação não-específicos nas placas foram bloqueados usando 25 mM de HEPES, pH 7,4 contendo 0,1% de BSA, 0,1% de ovalbumina, 0,1% (5% (p/v) de leite seco sem gordura em 150 mM de NACE) e 0,001% de azida. Diluições de soro ou sobrenadantes de hibridoma (por exemplo, diluições de três vezes seriais) foram adicionados ao longo de cada fileira da placa, e incubadas a 25°C durante 1 hora. Após lavar três vezes com PBS, 50 µl de uma diluição de 1:10.000 de anticorpo secundário anticomumungo de cabra conjugado com peroxidase rábano silvestre (Jackson ImmunoResearch Inc.) foi adicionada a cada poço e incubada também durante 1 hora. Após três lavagens, a cor foi descrita por TMB (Pierce) e parada com 2 M de ácido sulfúrico. A intensidade da cor foi monitorada em um espectrofotômetro a 450 nm.

2. Ensaio de FACS

[00389] Células COS-7 ou células CHO foram marcadas com 0,1 µM de CellTracker® CMFDA Green (Molecular Probes, Eugene, OR) como

descrito pelo vendedor. Volumes iguais de células de controle marcadas com CellTracker® foram misturados com Sp35-células COS-7 ou Sp35-células CHO lavadas (produzidas por transfecção transitória de vetor de expressão de Sp35) antes da incubação com soros de teste de anti-Sp35 ou sobrenadantes de hibridoma. Cinquenta microlitros da mistura de célula foram dispensados em cada poço de umas placas de poliestireno de 96 poços de fundo V (Costar® 3877, Corning, NI) e 100 µl de soro de camundongo, sobrenadante de hibridoma, ou um anticorpo anti-Sp35 de controle foram adicionados. Após incubação a 4°C durante 30 minutos, as células foram lavadas e incubadas com 50 µl do segundo anticorpo específico de Fc gama de IgG de anticamundongo de cabra de fragmento F(ab'2) puro de afinidade conjugado com ficoeritrina (1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA) em PBS. Ao término da incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e suspensas em 200 µl de PBS contendo 1% de soro bovino fetal (FBS), e submetidas a análises de FACS. Alternadamente, as células Sp35-COS-7 ou células Sp35-CHO foram misturadas com soro de camundongo ou sobrenadante de hibridoma e depois tratadas com anticorpo secundário de anticamundongo de cabra conjugado com R-ficoeritrina e diretamente submetidas a análises de FACS padrões.

B. Produção de Hibridoma de Anticorpos de Anti-Sp35 Monoclonais Murinos

[00390] Camundongos RBF fêmeas de oito semanas de idade (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) foram imunizados intraperitonealmente com emulsão contendo 50 µg de Sp35-Fc (aminoácidos 34 a 532 da SEQ ID NO: 2 fundidos na região de dobradiça e de Fc de IgG1 humano), produzida como descrita no Exemplo 2 ou foram imunizados intraperitonealmente com uma emulsão contendo 50 µg de Sp35-Fc humano, e 50 µl do adjuvante de Freund completo (Sigma® Chemical Co., St. Louis, MO) uma vez a cada duas

semanas. Os soros dos camundongos imunizados foram colhidos antes da primeira imunização e 1 semana após as segunda e terceira imunizações, e as titulações do anticorpo anti-Sp35 foram medidas através de ensaio de FACS em células COS-7 de expressão de Sp35 como descrito acima. Uma dose final reforçada foi dada após a terceira imunização e três dias antes quando foram iniciadas as fusões de hibridoma.

[00391] Soros de camundongos imunizados com os vários peptídeos de Sp35 foram triados por ELISA como descritos acima. Camundongos que eram positivos para anticorpos que especificamente ligaram células CÓS-7 de expressão de Sp35 foram identificados através de citometria de fluxo (FACS) como descrito acima, e foram sacrificados. Esplenócitos foram isolados dos camundongos e fundidos ao mieloma de FL653 (um derivado de APRT de um mieloma de camundongo Balb/c de Ig-/HGPRT, mantido em DMEM contendo 10% de FBS, 4500 mg/L de glicose, 4 mM de L-glutamina, e 20 mg/ml de 8-azaguanina) como descrito em Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, ed. Kennett, R. H., McKearn, T. J. e Bechtol, K. B. Nova Iorque: Plenum Press (1982). As células fundidas foram banhadas em placas de 24 ou 48 poços (Corning Glass Works, Corning, NI), e alimentadas com adenina, aminopterin e timidina (AAT, disponível de Sigma® Chemical Co., St. Louis, MO) contendo meio de cultura. Culturas resistentes a AAT foram triadas por ELISA ou citometria de fluxo como descrita acima para ligar às Sp35-células COS-7 ou Sp35-Fc. Hibridomas positivos foram também subclonados limitando a diluição.

[00392] Dezessete linhagens celulares de hibridoma que produzem anticorpos monoclonais produzidos de camundongos imunizados com Sp35-Fc foram isoladas. As propriedades dos anticorpos monoclonais derivados de hibridoma são mostradas nas Tabelas 3A e 3B.

[00393] Polinucleotídeos que codificam os domínios variáveis (VH e VL) de anticorpos monoclonais 1A7, 2F3, 3P1D10.2C3 e 3P1E11.3B7 foram isolados por PCR, clonados e submetidos a análise de sequência pelo método a seguir. RNA total foi extraído das células de hibridoma usando kit de Qiagen® RNeasy® Mini e cDNA foi gerado do RNA isolado através de RT PCR, usando condições padrões. Um coquetel de iniciadores foi usado para a RT-PCR. Um conjunto de iniciadores preferidos incluiu um iniciador com a 5' do iniciador hibridando com a sequência sinal e a terminação 3' do iniciador hibridando com ao domínio constante 3' da junção de FR4/domínio constante. Isto permite a amplificação de um domínio variável intacto sem ambiguidades a cerca do término N do anticorpo monoclonal e da junção de V/C. Alguém versado na técnica reconhecerá que conjuntos de iniciador necessitam ser modificados para amplificar modelos diferentes e para condições de PCR diferentes. Ocasionalmente, a presença de mensagens não-produtivas altamente abundantes (por exemplo, a cadeia leve não-produtiva alterada na estrutura de CDR3-FR4 do par de fusão) ou mensagens produtivas não-específicas pode ser produzida e complicar a clonagem das cadeias variáveis. Uma solução é usar dados de sequência N-terminais do anticorpo purificado autêntico para projetar um iniciador degenerado para permitir a clonagem. Alternativamente, pode-se usar iniciadores de "estrutura universal", tais como aqueles descritos em Orlandi et al, PNAS 86:3833 (1989) que "fixam" os termos N e C dos domínios variáveis (isto é, o término N de FR1 e o término C de FR4 são determinado pelo iniciador).

[00394] Adicionalmente, dados de sequência, para projetar iniciadores mais efetivos, podem ser obtidos dos produtos de RT-PCR de volume que foram purificados em gel e depois sequenciados. O produto de PCR pode ser também subclonado usando, por exemplo, o kit TOPO Cloning (Invitrogen) depois seqüenciado. Dados de sequência

são depois obtidos de múltiplos subclones independente ou fragmentos purificados em gel para firmemente estabelecer a sequência de consenso.

[00395] A sequência da cadeia leve do P1E11.3B7 foi determinada usando um coquetel de iniciadores de sequência sinal de cadeia leve capa murinos de 5': (i) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GGA TTT TCA GGT GCA GAT TTT CAG 3' (SEQ ID NO: 356), (ii) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GRA GTC ACA KAC YCA GGT CTT YRT A 3' (SEQ ID NO: 357), (iii) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GAA GTT GCC TGT TAG GCT GTT G 3' (SEQ ID NO: 358), e (iv) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GAG GKC CCC WGC TCA GYT YCT KGG A 3' (SEQ ID NO: 359), com um iniciador de domínio constante capa murino de 3': 5' GCG TCT AGA ACT GGA TGG TGG GAG ATG GA 3' (SEQ ID NO: 4), onde K=G/T, R=A/G, W=A/T e Y=C/T. O produto de PCR resultante foi subclonado e múltiplos subclones independente foram sequenciados. A sequência de consenso deduzida foi consistente com os dados de sequenciação de degradação de Edman. Sequenciação indicou que o iniciador 5' de sequência sinal degenerada 5' GGG GAT ATC CAC CAT GRA GTC ACA KAC YCA GGT CTT YRT A 3' (SEQ ID NO: 357) foi o que tinha dado o domínio variável de cadeia leve de 3P1E11.3B7 durante a amplificação.

[00396] A sequência de cadeia pesada de 3P1E11.3B7 foi determinada usando um coquetel de iniciadores de PCR de sequência sinal de cadeia pesada murina de 5': (i) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GGR ATG SAG CTG KGT MAT SCT CTT 3', (SEQ ID NO: 360) (ii) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GRA CTT CGG GYT GAG CTK GGT TTT 3' (SEQ ID NO: 361), e (iii) 5' GGG GAT ATC CAC CAT GGC TGT CTT GGG GCT GCT CTT CT 3' (SEQ ID NO: 362), com um iniciador de 3' de domínio constante de CH1 de IgG murino degenerado 5' AGG TCT AGA AYC TCC ACA CAC AGG RRC CAG TGG ATA GAC 3' (SEQ ID

NO: 363), onde K=G/T, M = A/C, R=A/G, e Y=C/T. PCR usando este coquetel de iniciadores, com uma variedade de condições de ciclagem diferentes, não rendeu uma sequência de domínio variável de cadeia pesada em que o término N deduzido foi consistente com o determinado por sequência de degradação Edman do anticorpo de 3P1E11.3B7 purificado. Portanto, usamos iniciadores de cadeia pesada universais: FR1 5' AGG TSM ARC TGC AGS AGT CWG G 3' (SEQ ID NO: 364) e FR4 5' TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CCA G 3' (SEQ ID NO: 365), onde M = A/C, R=A/G, S=C/G, e W=A/T. Este conjunto rendeu um domínio variável de cadeia pesada murino cuja sequência deduzida foi consistente com os dados empíricos de 3P1E11.3B7.

[00397] Para verificar que os termos N e C de domínio variável de cadeia pesada eram autênticos e não determinados pelo iniciador, outra reação de PCR foi executada com um iniciador de sequência sinal degenerado 5' ATG GAR TGY AAY TGG ATH CTN CCN TTY A 3' (SEQ ID NO: 366) e o iniciador 3' de domínio constante acima mencionado 5' AGG TCT AGA AYC TCC ACA CAC AGG RRC CAG TGG ATA GAC 3' (SEQ ID NO: 367), onde H=A/C/T, N=A/C/G/T, R=A/G, e Y=C/T. O projeto do iniciador de sequência sinal degenerado foi com base nas sequências sinais das melhores repetições derivadas de uma pesquisa de TFASTA da base de dados de sequências de roedores de Genbank consultada com a sequência de FR1 deduziu de consenso de 3P1E11.3B7 da reação de PCR com o "iniciador universal" descrito acima. Esta PCR deu um produto com um domínio variável de cadeia pesada murina completa.

[00398] Os domínios variáveis murinos de 3P1E11.3B7 completos foram usados (com mutagênese silenciosa quando necessário para introduzir sítios de restrição) juntamente com cDNAs de IgG1 humana e de domínio constante capa para construção de cDNAs quiméricos de

cadeia pesada e leve, respectivamente. Os cDNAs de imunoglobulina de comprimento total foram subclonados em um vetor de expressão chamado pNE001, um derivado do vetor de expressão episomal de células mamíferas de EBV comercial pCEP4. Os vetores de expressão de cadeia pesada e leve (chamados pXW372 e pXW363, respectivamente) foram co-transfeccionados em células 293-EBNA. Análise de western blot (sondada com reagentes específicos para IgG humana) de meio condicionado de células transientemente transfeccionadas confirmou a expressão de 3P1E11.3B7-hulgG1 quimérico, mAb capa. As sequências polipeptídeo VH e VL de 3P1E11.3B7 resultantes estão mostradas nas Tabelas 6 e 8 e são SEQ ID NOs: 173 e 209, respectivamente. As sequências de cadeia pesada e leve para os anticorpos monoclonais 1A7, 2F3, e 3P1D10.2C3 foram determinadas através de métodos similares.

C. Identificação de Anticorpos Monoclonais Anti-Sp35 através de Exibição de Fago

[00399] Fragmentos Fab de anticorpo monoclonal de anti-Sp35 foram identificados e isolados de bibliotecas de exibição de fago como descritos em Hoet *et al.*, *Nat. Biotech.* 23:344-348 (2005); Rauchenberger, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278:194-205 (2003); e Knappik, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 296:57-86 (2000) todas estas são incorporadas aqui por referência em suas totalidades.

[00400] A biblioteca de exibição de Fab-fago de MorphoSys HuCAL® GOLD ("Biblioteca de Exibição de Fago 2" na Tabela 3B) compreendendo regiões variáveis de anticorpo sintético humanizado foi triado contra proteína de Sp35-Fc solúvel humana recombinante por métodos de triagem padrões de ELISA E IHC. Vide, por exemplo, Ostendorp, R., Frisch, C. e Urban M, "Generation, engineering and production of human antibodies using HuCAL®". *Antibodies, Volume 2 Novel Technologies and Therapeutic Use*. Nova Iorque: Kluwer

Academic/Plenum 13-52 (2004). Fagos de Fab que especificamente ligaram a Sp35 foram purificados e caracterizados. Propriedades destes fragmentos Fab de anticorpo monoclonal derivado de exibição de fato são mostradas na Tabela 3B como "Fragmentos Fab monoclonais derivados da biblioteca exibição de fago 2". Fab-fago isolado 1968 foi selecionado para outra análise.

EXEMPLO 4

Imunoprecipitação de Sp35 por Anti - Anticorpos Monoclonais de Sp35

[00401] Para executar a imunoprecipitação, células COS-1 que expressam Sp35, fundidas em um marcador de hemaglutinina (HA) no término N, foram produzidas transientemente transfeccionando células COS-1 com uma construção de DNA que expressa a proteína de Sp35 de comprimento total com um marcador de HA. As células foram colhidas 48 h após transfecção e lisadas em 1 ml de tampão de lise (50 mM de HEPES, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1,5 mM de MgCl₂, 1 mM de EGTA, 1% de Triton X-100 e 10% de glicerol) por 30 min a 4°C. Após centrifugação a 14.000xg por 15 min, os sobrenadantes foram incubados com esferas de Proteína A/G-Sefarose (Santa Cruz) a 4°C por 1 h, e depois incubadas a 4°C durante 1 h com os anticorpos anti-Sp35 monoclonais murinos 1A7 ou 2F3. As esferas foram lavadas 3 vezes com tampão de lise, fervidas em tampão de amostra de Laemmli, submetidas a 4-20% de SDS-PAGE, e analisadas por western blot usando um anticorpo que reconhece o marcador de HA. Como mostrado no gel de SDS-PAGE, anticorpos monoclonais 1A7 e 2F3, humano de immunoprecipitated e Sp35 murino (Figura 1). Como mostrado em Figura 1, anticorpo 2F3 monoclonal fortemente imunoprecipitaram Sp35 humano e murino, enquanto o anticorpo monoclonal 1A7 que fortemente imunoprecipitou Sp35 humano, apenas fracamente reconheceu a proteína de Sp35 murina. Similarmente, anticorpos monoclonais 1G7, 2B10, 2F3, 3P4C2.2D2, 3P4C8.2G9, Li01, Li03, Li05, Li06, Li07, Li08,

Li11, Li12, 7P1D5.1G9 e 3B5.2 imunoprecipitaram Sp35 humano ou de camundongo ou humano e de camundongo (Vide Tabela 3B e 3C). Adicionalmente, Li08 imunoprecipita AP-Sp35 e anticorpos monoclonais 1B6.4 e 3E3.1 imunoprecipita Sp35 endógeno (Vide Tabela 3B).

EXEMPLO 5

Anticorpo Anti-Sp35 que Especificamente Liga a Sp35 determinado por ELISA

[00402] A fim de determinar quais regiões do polipeptídeo de Sp35 foram ligadas pelos vários anticorpos monoclonais derivados de exibição de hibridoma e de fago produzidos no Exemplo 2, um ensaio de ELISA foi executado usando um painel de polipeptídeos de Sp35 truncado, cada fundido nas regiões de dobradiça e de Fc de IgG1 pelos métodos descritos no Exemplo 1. O painel consistiu nos fragmentos de Sp35 a seguir: aminoácidos 34-425 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos 417-532 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos 417-493 da SEQ ID NO: 2, e aminoácidos 34-532 da SEQ ID NO: 2. Ovalbumina e BSA foram usados como controles. Como mostrado na Tabela 3B, mAbs derivados de hibridoma 2F3, 2B10, 3A3, 3P4c2,2d2, e 3P4c8,2g9, e mAbs derivados de Fab-fago 3383, 3563, 3564, 3565, 3568, 3569, 3570, e 3582 todos especificamente ligaram aos fragmentos de Sp351-417 e 1-534, sugerindo que estes anticorpos ligam a epitopos na região de LRR de Sp35. Mabs derivados de hibridoma 1A7, 3P1B11F9, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 3P2C63G10.2H7, 2P2C9.2G4, 3P4A61D9, e 394C51D8, e Mabs derivados de Fab-fago 3495, 3566, 3567, e 1968 especificamente ligaram ao fragmento de Sp35 34-532 e fracamente ligaram ao Sp35417-532, sugerindo que estes anticorpos provavelmente ligam a epitopos que pelo menos incluem uma porção de Sp35 C-terminal na região de LRR. Em experimentos similares, estes anticorpos posteriores também especificamente ligaram um polipeptídeo de Sp35 que consiste em aminoácidos 34-534 de Sp35

humano e afinidade baixa a Sp35 de camundongo e rato. A afinidade destes anticorpos posteriores para Sp35 de camundongo e rato foi restabelecida para o nível visto usando Sp35 humano quando o aminoácido 419 do Sp35 de camundongo ou rato é alterado de histidina (H) para arginina (R). Arginina é o aminoácido na posição 419 em Sp35 humano. A K_D para anticorpo monoclonal 1A7 foi determinada ser 10 nM (1×10^{-9} M) para ligar Sp35 humano e 20 μ M (2×10^{-5} M) para ligar Sp35 murino. Para ELISA de Ap-Sp35 detectar os anticorpos ligados à região 417 a 532, ELISA foi executada como segue: Os Mabs foram revestidos sobre placas de ELISA, depois incubados com uma proteína fusão de Sp35-AP a 4°C durante a noite seguido por anti-humano ligado a AP (H+L) (1:5.000, Jackson ImmunoResearch) em TA por 1 h, ou com proteínas de fusão de AP a 4°C durante a noite. Substrato de AP foi depois desenvolvido por 10 mg/ml de 4NPP em 0,1 M de Glicina, 1 mM de $MgCl_2$, 1 mM de $ZnCl_2$, pH 10,5, e lido em O.D. 405.

[00403] Em experimentos similares, os anticorpos monoclonais 3B5.2 e 7P1D5.1G9, como também o fragmento Fab do anticorpo 7P1D5.1G9 foram testados em ensaios de ELISA para sua habilidade de ligar Sp35 humano, a região de LRR inteira de Sp35, a região de Ig de Sp35 e Sp35 murino. Como mostrado na Tabela 3C, fragmento Fab 3B5.2, 7P1D5.1G9 e o 7P1D5.1G9 ligado a Sp35 humano e murino. Os anticorpos monoclonais 3B5.2 e 7P1D5.1G9 também ligaram à região LRR de Sp35. Vide Tabela 3C.

[00404] Em um ensaio de ligação de Sp35 com 3B5.5 monoclonal fixado ao fundo de um poço de cultura de tecido, os anticorpos a seguir não bloquearam a ligação de 3B5.2 de Sp35: Li03, Li05, Li08, Li011 e o fragmento Fab de Li013.

EXEMPLO 6

Anticorpo anti-Sp35 que Especificamente Liga a Sp35 Determinado por FACS

[00405] Para também caracterizar as propriedades de ligação dos mAbs anti-Sp35 derivado de hibridoma 1A7 e 2F3 produzidos como descrito no Exemplo 3, ligação de ambas células COS-7 ou 293 fixadas e vivas expressando Sp35 de camundongo ou humano foi comparada. Células de Sp35 transfeccionadas e não-transfeccionadas foram fixas e submetidas à análise de FACS (FACS: Células transfeccionadas foram dissociadas com Sp35 humano ou de camundongo ou controle de vetor das placas de cultura, lavadas com 2% de FBS/PBS, e incubadas com anticorpo primário a 1 µg/ml em gelo por 1 h. As células foram lavadas 3 vezes com 2% de FBS/PBS, depois incubadas com anticorpo secundário marcado com PE (1:100, JacksonImmunoResearch) em gelo por 30 min. Após 2 lavagens com 2% de FBS/PBS, as células foram fixadas em 2% de PFA e submetidas à análise de FACS por PE). Resultado de FACS mostrou que MAbs 1A7 e 2F3 ligaram às células COS-7 ou 293 expressando Sp35, mas não ligaram às células de controle sem expressão de Sp35 (Fig 2).

[00406] Em experimentos similares, células CHO estavelmente transfeccionadas com Sp35 foram usadas em análise de FACS para também caracterizar as propriedades de ligação de 3B5.2 e 7P1D5.1G9. Como mostrado na FIGURA 11, 3B5.2 e 7P1D5.1G9 ligaram a Sp35 em células CHO transfeccionadas. Especificamente, os anticorpos 3B5.2 e 7P1D5.1G9 foram testados quanto à sua habilidade para ligar células CHO transfeccionadas, e expressar, Sp35 humano ou murino. Como mostrado na FIGURA 11, o número de células os anticorpos 3B5.2 e 7P1D5.1G9 ligaram, como medido pela fluorescência média (MCF), aumentou com a concentração de anticorpo usado. Adicionalmente, o anticorpo 3B5.2 ligou mais células quando medido pela fluorescência média (MCF) que 7P1D5.1G9.

EXEMPLO 7

Ensaio de Desenvolvimento de Neurite

[00407] Para testar a habilidade dos anticorpos monoclonais derivados de hibridoma e derivados de Fab-fago produzidos para inverter o efeito inibidor dos inibidores de mielina do SNC acima, por exemplo, OMgp, em neurônios, lâminas de cultura Lab-Tek® (4 poços) foram revestidas com 0,1 mg/ml de poli-D-lisina (Sigma®). Ap-OMgp (1 µg/borrão) ou PBS foi manchado como gotas de 3 µl. Lâminas de Lab-Tek® foram depois enxaguadas e revestidas com 10 µg/ml de laminina (Gibco™). Gânglios de raiz dorsais (DRG's) de filhotes de rato Sprague Dawley de P6-7 foram dissociados com 1 mg/ml de collagenase tipo 1 (Worthington), triturados com pipetas Pasteur polidas com fogo pré-banhadas para enriquecer em células neuronais e finalmente banhadas a 10.000 células/poço nas lâminas de cultura de Lab-Tek® pré-revestidas. Dez µg/ml de mAbs 1A7 ou 2F3 foram adicionados imediatamente após colocação em placa dos DRGs. O meio de cultura era F12 (disponível de Gibco/Invitrogen) contendo 5% de soro de cavalo doador inativado a calor, 5% de soro bovino fetal inativado a calor e 50 ng/ml de fator de desenvolvimento nervoso de camundongo (mNGF) e incubado a 37°C e 5% de CO₂ durante 6 horas. Seguindo incubação, as lâminas foram fixadas em 4% de paraformaldeído/20% de sucrose e tingidas com anticorpo de TUJ1 anti-βIII-tubulina (Covance) após 16 horas.

[00408] Como anticorpo secundário Alexa-Fluor® 594 de anticomundongo (Molecular Probes) diluído 1:300 foi acrescentado às lâminas e incubado durante 2 horas em temperatura ambiente. As lâminas foram cobertas com lâminas com Gel/Mount® (Biomed®). 5x imagens digitais foram adquiridas com software OpenLab® (Improvision, Inc., Lexington, MA), e as imagens foram analisadas para quantificação de desenvolvimento de neurite usando o software OPENLAB®, tudo de acordo com os parâmetros especificados pelo fabricante.

[00409] Ambos os MAb's 1A7 e 2F3 protegeram os neurônios de

DRG da inibição mediada por OMgp do desenvolvimento de neurite. (Figura 3). 3B5.2 também protegeu os neurônios de DRG da inibição mediada por OMgp do desenvolvimento de neurite (dados não mostrados).

EXEMPLO 8

Anticorpo monoclonal 1A7 promove restabelecimento funcional no modelo de lesão da espinha dorsal de rato

[00410] Lesão de espinha dorsal ("SCI") foi induzida através de sobre-hemisseção dorsal como segue, modificada dos métodos previamente descritos (Li, S., *et al. J. Neurosci.* 24, 10511-10520 (2004)). Ratas Long Evans anestesiadas (7 semanas de idade, Charles River) foram dadas analgesia pré-operativa (Buprenorphine/Buprenex, 0,05 mg/kg s.c.) e tranquilizadas (Midazolam, 2,5 mg/kg i.p.) e uma hemi-seção dorsal foi executada na vértebra torácica 6/7 completamente interrompendo o trato corticoespinhal dorsomedial e dorsolateral principal (CST). Os componentes dorsais e dorsolaterais do trato corticoespinhal (CST) foram completamente interrompidos e a porção ventral do CST deixada intacta. A ponte de tecido ventral que permanece após a hemisseção constituía cerca de 20% do cordão em ambos os grupos de tratamento (dados não mostrados).

[00411] Função de membro posterior foi quantificada usando o método de classificação de campo aberto de Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) (Eby, M. T. *et al., J. Biol. Chem.* 275, 15336-15342 (2000), incorporado aqui por referência) e todos os animais sustentaram déficits funcionais notáveis após SCI, com paralisia de membro posterior quase completa no dia após cirurgia. Imediatamente após transecção de CST, um cateter intratecal foi inserido no espaço subaracnóideo em T7 e conectado a uma bomba miniosmótica preparada (Alzet modelo 2004, Alza Corp) inserida no espaço subcutâneo. Bombas miniosmóticas liberaram proteína de controle de isótipo de IgG humana (5 mg/ml) ou

anticorpo monoclonal 1A7 (4,8 mg/ml), continuamente a uma taxa de 0,25 µl/h em 5 semanas. Animais de controle (tratados com IgG Humana) restabeleceram a função substancial na duração de 5 semanas do experimento, mas com platôs em 3-4 semanas, por fim atingindo uma classificação de BBB média de $9 \pm 0,45$ (Figura 7). Em contraste, infusão intratecal contínua de 1A7 durante 5 semanas após transecção da espinha dorsal resultou em contagens de BBB significativamente melhoradas nos animais de controle por 5 semanas com uma melhoria continuada na função no prazo de 2-5 semanas, alcançando uma classificação de BBB média de $11,1 \pm 0,7$ (Figura 4). Estes resultados demonstram que o tratamento com anticorpo anti-Sp35 monoclonal 1A7 promoveu restabelecimento da função após a lesão da espinha dorsal como demonstrado por um aumento na classificação de BBB, regeneração de axônios e menos retração axonal observada por manchamento imunoistoquímico dos axônios. Anticorpo 3B5.2 também promoveu restabelecimento após lesão da espinha dorsal (dados não mostrados).

EXEMPLO 9

Anticorpos anti-Sp35 1A7, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 6P4F4.1D3, 6P4F4.1F9, 7P1D5.1G9, Li05, Li06, Li08, Li13, Li28, Li33, D05, D08 e 3B5.2 promovem mielinização *in vitro*

[00412] O papel dos anticorpos anti-Sp35 1A7 e 2F3 foram investigados em mielinização *in vitro* tratando coculturas de neurônios e oligodendrócitos dos gânglios da raiz dorsal (DRG) com anticorpos anti-Sp35 1A7 e 2F3 e testando quanto à mielinização por imunoistoquímica e western blot. Para estes estudos, foi necessário primeiro gerar culturas primárias de neurônios e de oligodendrócitos de DRG.

[00413] Gânglios da raiz dorsal embrionários de ratas Long Evans E14-E17 foram cultivados como descrito por Plant et al., J. Neurosci. 22:6083-91 (2002). DRGs dissecados foram colocados em placas em

lâminas de cobertura revestidas com poli-L-lisina (100 µg/ml) durante 2 semanas. As células foram incubadas na presença de fluorodeoxiuridina por 2-6 dias e em meio de NLA contendo 1 x B27, 100 ng/ml de NGF (Gibco) por 8-11 dias.

[00414] Oligodendrócitos de ratas Long Evans 2 dias pós-natal (P2) foram cultivados como descritos por Conn, Meth. Neurosci. 2:1-4 (Academic Press; 1990) com modificações como segue. Brevemente, o cérebro anterior foi extirpado de ratos P2 e colocado em meio de HBSS frio (Gibco). Os fragmentos de tecido foram cortados em pedaços de 1 mm e incubados a 37°C durante 15 min em 0,01% de tripsina e 10 µg/ml de DNase. Células dissociadas foram colocadas em placas em uns frascos de cultura de tecido de T75 revestidos com poli-L-lisina e crescidas em DMEM com 20% de soro bovino fetal a 37°C durante 10 dias. Oligodendrócitos A2B5-positivos foram colhidos agitando os frascos durante a noite a 200 rpm a 37°C. Os oligodendrócitos de A2B5 foram cultivados durante 7 dias em DMEM (Gibco) contendo 25 mM de D-glicose, 4 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 50 µg/ml de apo-transferrina humana, 5 µg/ml de insulina pancreática bovina, 30 nM de selenato de sódio, 10 nM de hidrocortisona, 10 nM de D-biotina, 1 mg/ml de BSA, 10 ng/ml de FGF e PDGF (Peprotech). As células foram depois colhidas através de tripsinização. As células foram depois cocultivadas com os neurônios de DRG na presença ou ausência de 1, 3, 10, ou 30 µg/ml de anticorpos monoclonais anti-Sp35 1A7 ou 2F3, ou um anticorpo de controle negativo em meio de NLA contendo 2% de soro bovino fetal, 50 µg/ml de ácido ascórbico, 100 ng/ml de NGF (Gibco). Uma dose de anticorpo efetiva para administrar em um tal ensaio foi determinada ser na faixa de 0,1 µg/ml a 10 µg/ml, dependendo do anticorpo. Alguém versado na técnica poderia determinar uma dose efetiva usando ensaios descritos aqui.

[00415] O meio de cultura foi alterado e os vários anticorpos

monoclonais foram renovados a cada três dias. Após 30 dias a 37°C, as células cocultivadas foram tingidas por manchamento imunoistoquímico ("IHC") para neurofilamentos com anticorpo anti- β III-tubulina para identificar os axônios, ou anticorpo anti-MBP para identificar os oligodendrócitos (Figura 4A-E). Células cocultivadas foram também lisadas e submetidas à análise de western blot para quantificar a MBP (Figura 4G). Com base em análises de IHC e western blot, as células cocultivadas tratadas com anticorpos anti-Sp35 1A7 e 2F3 mostraram sobrevivência aumentada de oligodendrócitos e neurônios, números aumentados de axônios empacotados e números aumentados de células positivas de MBP (Figura 4F, 10 vezes mais células MBP-positivas quando comparadas às coculturas tratadas com controle-anticorpo).

[00416] Em um experimento similar, coculturas de oligodendrócito e de DRG foram incubadas na presença ou ausência de anticorpos anti-Sp35 Li05 e Li06, ou um anticorpo de controle negativo. Células cocultivadas foram lisadas e submetidas à análise de western blot para quantificar a MBP (Figura 8). Com base nas análises de western blot, as células cocultivadas tratadas com anticorpos anti-Sp35 Li05 e Li06 mostraram números aumentados de células MBP-positivas, similares às células cocultivadas tratadas com 3, 10 e 30 μ g de Sp35-Fc (LINGO-1-Fc).

[00417] Em experimentos similares coculturas de oligodendrócito e de DRG foram incubadas na presença ou ausência de anticorpos anti-Sp35 3B5.2, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 6P4F4.1D3, 6P4F4.1F9, 7P1D5.1G9, Li08, Li13, Li28, e Li33 e também promoveram mielinização. Similarmente, anticorpos de comprimento total D05 e D08 também promoveram mielinização. A dose efetiva mais baixa do anticorpo 3B5.2 e 7P1D5.1G9 necessária para promover mielinização no experimento de cocultura de DRG foi 0,1 μ g/ml.

[00418] Adicionalmente, o fragmento Fab 7P1D5.1G9 foi testado em um ensaio de mielinização *in vitro* similar. O fragmento Fab 7P1D5.1G9 promoveu mielinização a uma concentração de 1,0 µg/ml.

[00419] Estes resultados indicaram que tratamento de coculturas de DRG-oligodendrócito com anticorpos anti-Sp35 1A7, 2F3, 3P1D10.2C3, 3P1E11.3B7, 6P4F4.1D3, 6P4F4.1F9, 7P1D5.1G9, Li05, Li06, Li08, Li13, Li28, Li33, D05, D08 e 3B5.2 promoveu interações de axônio de oligodendrócito maduras e mielinização comparadas às coculturas tratadas com anticorpo de controle.

EXEMPLO 10

Anticorpos anti-Sp35 e fragmentos Fab promovem sobrevivência de oligodendrócitos e mielinização *in vivo*

[00420] Camundongos machos adultos C57Bl/6 do tipo selvagem foram alimentados com cuprizona (0,2% moída com ração de camundongo moída por peso) durante 6 semanas para induzir desmielinização dentro do corpo caloso de acordo com o método descrito por Morell P et al., Mol Cell Neurosci. 12:220-7 (1998). Brevemente, anticorpo anti-Sp35 monoclonal 1A7 foi estereotaticamente injetado no corpo caloso desmielinizante em semanas 2, 2,5 e 3 semanas de alimentação de cuprizona, pelo método descrito abaixo. Camundongos de controle foram estereotaticamente injetados aos mesmos intervalos com meios esterilizados contendo anticorpo de controle. Após as 6 semanas de alimentação de cuprizona terem completado, os camundongos foram retornados a uma dieta normal por 2, 4 e 6 semanas (ração de camundongo moída apenas) para permitir remielinação.

[00421] Os anticorpos monoclonais 1A7 e de controle foram liberados como segue. Os camundongos tratados com cuprizona foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg do peso do corpo) e xilazina (10 mg/kg do peso do corpo) e posicionados em um aparelho de

imobilização projetado para cirurgia estereotática (David Kopf Instruments). O couro cabeludo foi aberto e os compostos estéreis injetados (1 μ M em 1 ml de HBSS) unilateralmente no corpo caloso intensamente desmielinado dos camundongos recipientes do tipo selvagem com uma seringa Hamilton de 10 μ l usando coordenadas estereotáticas de 0,7 mm posterior e 0,3 mm lateral para bregma a uma profundidade de 1,7 mm (Messier et al., Pharmacol. Biochem. Behav. 63: 313-18 (1999)). Camundongos recipientes de controle adicionais foram estereotaticamente injetados com HBSS não contendo nenhum composto. A abertura no crânio foi enchida com Gelfoam, e a área foi pincelada com penicilina e estreptomicina (Gibco) e a ferida foi suturada. Os camundongos foram sacrificados a cada semana do experimento após injeção e seu cérebro removido e processado para análise molecular, bioquímica e histológica.

[00422] Os animais que recebem o tratamento de anticorpo anti-Sp35 1A7 mostraram sobrevivência aumentada de oligodendrócitos maduros (com base em manchamento de anticorpo CC1, Figura 5A) e mielinação de axônio por IHC usando anticorpo de proteína anti-MBP ou luxol fast blue (Figura 5B). Oligodendrócitos de anticorpo CC1-positivo foram quantificados em quatro semanas e 6 semanas (Figura 5C). Estes resultados indicaram que o tratamento com anticorpo anti-Sp35 1A7 promoveu sobrevivência de oligodendrócitos maduros e mielinação de axônios comparados aos camundongos tratados com anticorpo de controle. Similarmente, animais recebendo o anticorpo 1A7 ou 1 μ g/ml de fragmento Fab de 7P1D5.1G9 em um modelo de lisolecitina de desmielinização também promoveram mielinação de axônio comparados aos animais de controle.

EXEMPLO 11

Anticorpo anti-Sp35 1A7 promove sobrevivência das células do gânglio retiniano (RGC) no modelo de transecção do nervo ótico

[00423] Anticorpo anti-Sp35 1A7 foi testado em um modelo de transecção de nervo ótico investigando os fatores que afetam a função neuronal. Ratas Sprague Dawley adultas jovens (SD) foram usadas neste estudo. O nervo ótico direito de cada animal foi transeccionado intraorbitalmente 1,5 mm do disco ótico. Um pedaço de Gelfoam intumescido com 6% de Fluoro-Gold (FG) foi aplicado ao sítio recentemente transeccionado logo atrás do disco ótico para marcação das células sobreviventes do gânglio retiniano (RGCs). Os animais foram divididos em três grupos (n=6 em cada grupo) que recebeu ou anticorpo anti-Sp35 1A7, anticorpo de controle, ou só PBS, através de injeção intravítrea. O volume de cada injeção intravítrea foi 4 µl enquanto a dosagem de cada injeção foi 2 µg. As injeções intravítrea foram executadas imediatamente após a transecção do nervo ótico.

[00424] Todos os animais foram deixados sobreviver durante 1 semana. Dois dias antes de sacrificar os animais, o nervo ótico esquerda de cada animal foi transeccionado e 6% de FG foram administrados como descrito acima para marcar RGCs sobreviventes, para servir como o controle interno. Os animais foram sacrificados com uma sobredose de Nembutal e as retinas dissecadas em 4% de paraformaldeído. Quatro cortes radiais foram feitos para dividir as retinas em quatro quadrantes (superior, inferior, nasal e temporal). As retinas foram depois pós-fixadas no mesmo fixador durante 1 hora antes de elas serem montados planas com o meio de montagem (Dako). As lâminas foram examinadas sob um microscópio de fluorescência usando um filtro ultravioleta (comprimento de onda de excitação = 330-380 nm). RGCs marcados foram contados ao longo da linha mediana de cada quadrantes a partir do disco ótico para a borda periférica da retina em intervalos de 500 µm, sob uma grade de lentes de 200 X 200 µm². A porcentagem de RGCs sobreviventes resultante de cada tratamento foi expressada comparando o número de RGCs

sobreviventes nos olhos feridos com seus olhos contralaterais. Todos os dados foram expressados como média \pm SEM. Significação estatística foi avaliada através de ANOVA unidirecional, seguido por um teste Tukey-Kramer pós hoc. Diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os animais tratados com anticorpo anti-Sp35 1A7 mostraram sobrevivência mais neuronal (80%) quando comparados aos animais tratados com anticorpo de controle ou com PBS, cada apenas mostrou aproximadamente 50% de sobrevivência neuronal (Fig 6).

EXEMPLO 12

Testando anticorpos anti-Sp35 para remielinação no modelo de esmagamento do nervo ótico

[00425] O nervo ótico direito recebe esmagamento completo através de fórceps #5 durante 10 segundos por volta de 1,5 mm atrás do globo ocular intraorbitalmente logo antes da administração de 2 μ l de anticorpo monoclonal 1A7, 2F3, Li05 e Li06 em 2 ml por injeção intravítrea.

[00426] Os animais recebem uma segunda injeção intravítrea do mesmo tratamento uma semana após a cirurgia. Duas semanas após a cirurgia, os animais são perfundidos com fixadores EM, pós-fixados e processados para seções de semiestreita e ultraestreita. As seções longitudinais do nervo ótico são tingidas e preparadas para observação de mielina. A mielinação das partes proximais e distais do nervo ótico esmagados é comparada entre grupos de tratamento diferentes. Animais tratados com Sp35-Fc e 1A7, 2F3, Li05 e Li06, como também controles apropriados, serão analisados para remielinação na parte distal do nervo ótico comparado aos controles.

EXEMPLO 13

Testando anticorpos anti-Sp35 para regeneração de axônio no modelo de esmagamento do nervo ótico

[00427] O nervo ótico direito foi esmagado por fórceps #5 durante 10

segundos por volta de 1,5-2 mm atrás do globo ocular intraorbitalmente logo antes da administração de 2 µg de anticorpo monoclonal 1A7 em PBS por meio de injeção intravítrea. 4 ratos foram testados com o anticorpo 1A7 e 8 ratos foram usados como animais de controle. Os animais receberam uma segunda injeção intravítrea do mesmo tratamento uma semana após a cirurgia. Três dias antes do sacrifício dos animais de teste (dia 11 do experimento), 2 ml de CTB-FITC foram injetados intravitreamente para marcação, anterograde, dos axônios dos nervos óticos regenerativos. No 14º dia pós cirurgia, os animais foram perfundidos e pós-fixados. O nervo ótico esmagado foi processado para seções longitudinais congeladas. Os axônios marcados com CTB-FITC, que cruzam o sítio de lesão foram contados como fibras regenerativas em várias distâncias além do sítio de esmagamento. Quando 1A7 foi injetado no olho, regeneração dos axônios foi observada até 250 µm além do sítio de esmagamento. Vide Figura 10.

EXEMPLO 14

Anticorpos anti-Sp35 promovem remielinação e reparo no nervo ótico usando o modelo de rato EAE induzido por MOG.

[00428] Para estes experimentos, o modelo Experimental Autoimmune de Encefalomielite (EAE) induzida por Glicoproteína de Oligodendrócito de Mielina (MOG) de rato foi usado. Este é o modelo animal para esclerose múltipla humana. 50 µl de 200 ng de adjuvante de Freund completo (Chondrex Inc.) mais 50 µl de 50 µg de MOG em solução salina foram emulsificados (1:1) e mantidos em gelo antes de ser injetado intradermicamente na base da cauda para cada animal. Ratas norueguesas marrons de 8-10 semanas de idade foram usadas para todos os experimentos. Observação geral na técnica indica que o modelo de EAE é induzido por volta de 15 dias após injeção de MOG. Ratos são classificados para sinais clínicos de EAE. Os sinais são

registrados como segue: grau 0,5, paresia distal da cauda; grau 1, paralisia completa da cauda,; grau 1,5, paresia da cauda e paresia da perna traseira moderadas; grau 2,0, paresia severa unilateral da perna traseira; grau 2,5, paresia severa bilateral do membro traseiro; grau 3,0, paralisia completa bilateral do membro traseiro; grau 3,5, paralisia completa bilateral do membro traseiro e paresia de um membro frontal; paralisia de grau total (tetraplegia), estado moribundo, ou morte. Os animais recebem tratamento uma vez o modelo de EAE é induzido.

[00429] 2 µg/µl de um anticorpo anti-Sp35 (1A7) foram injetados intravitalmente no dia 15 sob indução de MOG-EAE. 2 µg/µl do anticorpo anti-Sp35, 1A7, tempos adicionais foram dois injetados no dia 22 e dia 28. Sob terminação do experimento, os animais foram perfundidos com 4% de PFA. Os nervos óticos foram pós fixados em 1% de OsO₄, desidratados e embebidos em Epon. Seções semiestreitas (1 µM) foram cortadas e tingidas com Toluidina azul para avaliação da mielinização. Os nervos óticos dos animais tratados foram comparados aos animais sem tratar para regeneração de axônio e remielinação no nervo ótico. Todos os procedimentos foram executados seguindo um protocolo aprovado por Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

[00430] Animais recebendo tratamento com o anticorpo anti-Sp35 1A7 mostraram remielinação e reparo do nervo ótico quando comparado aos nervos óticos normais ou animais que foram submetidos à EAE induzida por MOG, mas não receberam nenhum tratamento (Figura 9). Na Figura 9C, as setas apontam para axônios mielinizados. Animais recebendo um anticorpo que reconhece o domínio III da Proteína G de Streptococcus (MOPC21), não específico para Sp35, não mostraram nenhum sinal de remielinação ou reparo do nervo ótico quando comparados aos nervos óticos normais ou aos nervos óticos de animais sem tratar (dados não mostrados). O anticorpo de antagonista de Sp35

1A7 promoveu remielinação e reparo dos nervos óticos em um modelo de rato de EAE induzida por MOG de neurite ótica (Figura 9).

EXEMPLO 15

Testando anticorpos anti-Sp35 para promoção de remielinação do SNC usando modelo de camundongo de EAE induzida por MOG

[00431] EAE é induzida na cepa mista 129B6 dos camundongos através de imunização intradérmica (dia 0) com 100 µg de proteína de MOG1-125 emulsificada com o adjuvante de Freund completo (CFA). O volume injetado é 100 µl por camundongo e é distribuído em 3 sítios (orelhas, costas e pele). A emulsão é preparada em base de uma razão de volume 1:1 e contém 1 mg/ml de MOG1-125 e 2 mg/ml de M. tuberculosis (cepa H37Ra, Chondrex). Toxina de coqueluche (200 ng/camundongo) é administrada intraperitonealmente na hora da imunização e 2 dias após. Peso do corpo e classificações clínicas de EAE (0 = nenhum sinal clínico; 1 = cauda flácida; 2 = fraqueza do membro traseiro, reflexo de endireitamento prejudicado ou andadura gingada; 3 = paralisia completa do membro traseiro ou reflexo de endireitamento ausente; 4 = paralisia completa do membro traseiro com algum grau de envolvimento do membro dianteiro; 5 = animal completamente paralisado; 6 = moribundo ou morto) são registradas diariamente. Todos os procedimentos são executados seguindo um protocolo, aprovado por nosso Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Os animais recebem o tratamento com anticorpos monoclonais 1A7, 2F3, Li05 e Li06 ou anticorpo de controle no dia 0 do estudo. As amostras de sangue são tiradas várias vezes ao longo dos experimentos através de técnica de hemorragia retro-orbital. Plasma é separado de PBMC por centrifugação e fenotipagem celular executada por mancha de FACS. Perfilação da resposta de anticorpo anti-MOG humoral é executada por ELISA usando mAbs subclasse/isótipo-específicos (PharMingen). Ao término de cada experimento, cérebro,

espinha dorsal, nervos óticos e nervos ciáticos são colhidos seguindo perfusão.

[00432] Este mesmo protocolo é usado para induzir a EAE em camundongos knockout em Sp35 e filhotes. Camundongos knockout em Sp35 tipicamente mostram classificações de EAE mais baixas (1,5), e nenhuma recaída comparada aos controles (em um período de 45 dias), depois filhotes do tipo selvagem (classificação de EAE 3,5).

[00433] Animais tratados com Sp35-Fc e 1A7, 2F3 serão analisados para remielinação comparando ao controle.

[00434] A proteína MOG 1-125 marcada com His foi expressada em *Pichia pastoris* usando um promotor de TetO-AOX1 induzível por doxiciclina (M. Levesque, D. Krushinskie e K. Strauch, manuscrito em preparação). A sequência de codificação extracelular (Gly1 até Gly125 da proteína madura após remoção de sequência sinal) de rato foi amplificada por PCR de MOG usando os iniciadores a seguir:

5' GGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGCATCATCATCATCATATGGGACA
GTTTCAGAGTGATAGGG 3'

(SEQ ID NO: 368), e

5' TTCGCGGCCGCTATTAGCCAGGGTTGATCCAGTAGAAGGG 3' (SEQ ID NO: 369).

EXEMPLO 16

Construção de Variante de 3B5.2

[00435] O seguinte é a sequência de aminoácido para a cadeia leve variável (VL) do anticorpo de 3B5.2, CDRs estão sublinhadas e o sítio de glicosilação N-ligado está em negrito e sublinhado duplo: QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSRVS YVHWYQQKSG TSPKRWLYDT SNLASGVPAR FGGNGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYCQQW STNPPTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO: 417). Para determinar se expressão do anticorpo de 3B5.2 e/ou ligação do anticorpo a Sp35 foi afetada pela remoção do sítio de glicosilação, uma

variante de 3B5.2 foi construída. Especificamente, posições de Kabat 63-68 foram mutadas em FR3 para a sequência de cadeia leve capa humana e murina de consenso SGSGSG (SEQ ID NO: 418). A cadeia leve da variável de B5.2 mutante resultante é como segue, os aminoácidos mutados estão em negrito e sublinhado duplo: QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSRVS YVHWYQQKSG TSPKRWLYDT SNLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYCQQW STNPPTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO: 419).

[00436] A habilidade do anticorpo de 3B5.2 e do anticorpo de 3B5.2 variante para ligar à proteína de Sp35 é a mesma quando testada. Adicionalmente, com base nos dados de mobilidade eletroforética, parece que a cadeia leve variável de 3B5.2 é glicosilada, enquanto a cadeia leve variante não. Por fim, os níveis de expressão de ambos os anticorpos nas células transfeccionadas foram os mesmos.

EXEMPLO 17

Construção de anticorpo 1A7 humanizado

SEQUÊNCIAS DE CADEIAS LEVE E PESADA DE 1A7

Cadeia leve:

1 QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTC**SAS** **SSV** **SYM**HWYQQKS
GTSPKRWIY**D** 50
51 **TSKLAS**GVPA RFSGSGSGTS YSLTISSMEA EDAATYYC**QQ**
WSSNPFTFGS 100
101 GTKLEIK (SEQ ID NO: 283)

Cadeia pesada:

1 QVQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKAS**GYTFT** **NYGMN**WVKQA
PGKGLKWMG**W** 50
51 **INTDTGEPTYT** **EDFQGR**F AFS LETSASTVYL QFNNLKNE DTATY
FCAR**EGVHF** 100
101 **DY**WGQGTTVT VSS (SEQ ID NO 170)

Sublinhado negrito: resíduos de CDR de Kabat

Sublinhado itálico: resíduos de CDR de Chotia

Resíduos canônicos

Numeração é de acordo com o esquema de Kabat

ANÁLISE DAS REGIÕES VARIÁVEIS MURINAS

[00437] As regiões de determinação de complementaridade (CDRs) contêm os resíduos mais prováveis de ligarem ao antígeno e devem ser retidos no anticorpo reformado. CDRs são definidas através de sequência de acordo com Kabat et al (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5ª Edição, U.S. Dept. Health and Human Services. U.S. Govt. Printing Office, que é incorporada por referência aqui em sua totalidade. CDRs entram nas classes canônicas (Chothia, C., Lesk, A. M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S. J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E. A., Davies, D., Tulip, W. R., Colman, P. M., Spinelli, S., Alzari, P. M. e Poljak, R.J. (1989) Nature 342:877-883 que é incorporada por referência aqui em sua totalidade) onde resíduos fundamentais determinam a uma extensão grande a conformação estrutural da alça de CDR. Estes resíduos são quase sempre retidos no anticorpo reformado. As CDRs da cadeia pesada e leve foram classificadas em classes canônicas como segue:

Cadeia leve: Cadeia pesada:

L1: 10 resíduos Classe 1 H1: 5 resíduos Classe 1

L2: 7 resíduos Classe 1 H2: 17 resíduos Classe 2

L3: 9 resíduos Classe 1 H3: 7 resíduos Nenhuma classe canônica

Os resíduos canônicos importantes para estas classes de CDR estão indicadas na Tabela 10.

TABELA 10

L1	Classe 1	2(I) 25(A) 30(V) 33(M) 71(Y)
L2	Classe 1	48(I) 51(T) 52(S) 64(G)
L3	Classe 1	90(Q) 95(P)
H1	Classe 1	24(A), 26(G), 27(F), 29(F), 34(M), 94(R)

H2 Classe 2 52a(T) 55(G) 71(L)

H3 Nenhuma Classe Canônica

[00438] As cadeias leve e pesada variáveis foram comparadas com as sequências de consensos (Kabat et al, 1991) e de linhagem germinal (Brensing-Kuppers J, Zocher I, Thiebe R, Zachau HG. (1997). Gene. 191(2):173-81 e Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, Kuma K, Hayashida H, Miyata T, Honjo T.(1998) J Exp Med. 188(11):2151-62, que são incorporadas por referência em suas totalidades) para subgrupos murinos e humanos usando programa BLAST e base de dados de sequência de proteína de BLAST de consensos e de linhagem germinal internamente compilados.

[00439] A cadeia leve variável é um membro de capa 6 de subgrupo murino com uma identidade de 94% em sobreposição de 109 aminoácidos e originada da linhagem germinal de kk4 murina (100% ID) (Vide abaixo)

> mukk4

Cons.: 1
QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSK
LASGVPAR 60

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSK
LASGVPAR

Suj. : 1
QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSK
LASGVPAR 60

Cons.: 61 FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNP 94 (SEQ
ID NO: 451)

FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNP (SEQ ID
NO: 451)

Suj. : 61 FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNP 94 (SEQ
ID NO: 451)

[00440] A cadeia pesada variável é um membro do HVMS de subgrupo murino com uma identidade de 55% em sobreposição de 132 aminoácidos e originada da linhagem germinal de VGK6 murina (92% ID) (Vide abaixo)

> muVGK6

Cons.: 1
QVQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWIN
TDTGEPTY 60

Q+QLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWIN
T+TGEPTY

Suj.: 1
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWIN
TETGEPTY 60

Cons.: 61 TEDFQGRFAFSLETSASTVYLQFNNLKNEDTATYFC 96
(SEQ ID NO: 452)

+DF+GRFAFSLETSAST YLQ NNLKNEDTATYFC (SEQ ID
NO: 453)

Suj.: 61 ADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFC 96
(SEQ ID NO: 454)

[00441] A cadeia leve variável corresponde a capa 3 de subgrupo humano com uma identidade de 67% em sobreposição de 109 aminoácidos e é a mais próxima à linhagem germinal de L6 humana (64% ID) (Vide abaixo)

> huL6

Cons.: 1 QIVLTQSPA IMSASPGEKVTMTCSASSSVS-
YMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSK LASGVPA 59

+IVLTQSPA +S SPGE+ T++C AS SVS Y+ WYQQK G +P+ IYD
S A+G+PA

Suj.: 1
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS

NRATGIPA 60

Cons.: 60 RFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNP 94 (SEQ ID NO: 455)

RFSGSGSGT ++LTISS+E ED A YYCQQ S+ P (SEQ ID NO: 456)

Suj. : 61 RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWP 95 (SEQ ID NO: 457)

[00442] A cadeia pesada variável corresponde a MHV1 de subgrupo humano com uma identidade de 59% em sobreposição de 129 aa e é a mais próxima à linhagem germinal de huVH7-81 humana (70% ID) (Vide abaixo)

> huVH7-81

Cons.: 1
QVQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWIN
TDTGEPTY 60

QVQLVQSG E+K+PG +VK+SCKASGY+FT YGMNWW
QAPG+GL+WMGW NT TG PTY

Suj. : 1
QVQLVQSGHEVKQPGASVKVSCCKASGYSTFTTYGMNWVPQAPGQGLEWMGWFN
TYTGNPTY 60

Cons.: 61 TEDFQGRFAFSLETSASTVYLQFNNLKNEDTATYFCAR 98
(SEQ ID NO: 458)

+ F GRF FS++TSAST YLQ ++LK ED A Y+CAR (SEQ ID NO: 459)

Suj. : 61 AQGFTGRFVFSMDTSASTAYLQISSLKAEDMAMYYCAR 98
(SEQ ID NO: 460)

MODELANDO A ESTRUTURA DAS REGIÕES VARIÁVEIS

[00443] Para esta humanização foi construído o modelo de regiões variáveis de P1A7 com base nas estruturas cristalinas de anticorpos OKT3 (PDB ID 1SY6 - usado para modelagem da cadeia leve) e TE33 (PDB ID 1TET - usado para modelagem da cadeia pesada).

ANÁLISE DAS REGIÕES VARIÁVEIS REFORMADAS

[00444] Foi tentado encontrar as sequências de anticorpo expressas humanas mais similares, que não necessitam ser retromutadas nas posições (L4,38,43,44,58,62,65-69,73,85,98 e H2,4,36,39,43,45,69,70,74,92) (vide por exemplo, Patente U.S. 6.407.213 que é incorporada por referência em sua totalidade), e as usa como as estruturas de anticorpo. Foi usada a base de dados de sequência de anticorpo internamente curado e ferramentas de consulta para identificar os modelos adequados tendo a similaridade mais alta às sequências de P1A7 murinas em resíduos canônicos, de interface e de zona de revestimento para minimizar o número de retromutações. Sequências de linhagem germinal preenchidas com resíduos de consenso na região de FR4 foram consideradas separadamente. Após estruturas múltiplas terem sido consideradas, sequências de linhagem germinal huL6 e VH7-81 foram selecionadas como estruturas aceitantes para cadeias pesada e leve respectivamente.

[00445] Três versões da cadeia leve reformada variável e três versões da cadeia pesada reformada variável foram projetadas. A primeira versão contém menos retromutações e a terceira versão contém mais (isto é, as menos "humanizadas").

RETROMUTAÇÕES EM V_L REFORMADA

huL6

E1Q Ponto Q1 para antígeno e a alteração de carga pode alterar a ligação. Presente na versão 2 e 3

L46R R46 é um resíduo incomum na interface de V_H/V_L que suporta CDR-L1 e CDR-H3. Presente em todas as versões

L47W - W47 fica localizado em um agrupamento debaixo de CDR-L2. Presente na versão 3 apenas

I58V - V58 fica localizado em um agrupamento debaixo de CDR-L2. Presente na versão 3 apenas

F71Y - Y71 é um resíduo canônico importante para suportar CDR-L1 e CDR-L3. Presente em todas as versões

RETROMUTAÇÕES EM V_H REFORMADO

huVH7-81

- P38K K38 suporta CDR-H2. Presente nas versões 2 e 3
- E46K K46 suporta CDR-H2. Presente nas versões 2 e 3
- M71L L71 é um resíduo canônico que suporta CDR-H1. Presente em todas as versões
- A78V V78 é hipermutado da linhagem germinal A e suporta CDR-H1
- I82F F82 é um resíduo de empacotamento do núcleo. Presente na versão 3 apenas
- Y91F F91 é um resíduo na interface de V_H/V_L. Presente na versão 3 apenas

PROJETOS DE HUMANIZAÇÃO PARA P1A7

Estrutura tirada das sequências:

Cadeia leve: huL6

Cadeia pesada: huVH7-81

Retromutações estão em fonte tipo negrito minúscula

CDRs estão sublinhadas

> Variante de cadeia leve 1

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPR**r**LIYDTSK
LASGIPARFSGSGSGTD**y**TLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKVE
 IK (SEQ ID NO: 430)

> Variante de cadeia leve 2

qIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPR**r**LIYDTSK
LASGIPARFSGSGSGTD**y**TLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKVE
 IK (SEQ ID NO: 431)

> Variante de cadeia leve 3

qIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPR**rw**IYDTSK
LASG**v**IPARFSGSGSGTD**y**TLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKVE

IK (SEQ ID NO: 471)

> Variante pesada 1

QVQLVQSGHEVKQPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVPQAPGQGLEWMGWIN
 TDTGEPTYTEDFQGRFVFS**1**DTSAST**v**YLQISSSLKAEDMAMYYCAREGVHFD
 YWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 472)

> Variante pesada 2

QVQLVQSGHEVKQPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWV**k**QAPGQGL**k**WMGWIN
 TDTGEPTYTEDFQGRFVFS**1**DTSAST**v**YLQISSSLKAEDMAMYYCAREGVHFD
 YWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 432)

> Variante pesada 3

QVQLVQSGHEVKQPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWV**k**QAPGQGL**k**WMGWIN
 TDTGEPTYTEDFQGRFVFS**1**DTSAST**v**YLQ**f**SSLKAEDMAMY**f**CAREGVHFD
 YWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 473)

**SEQUÊNCIA DA CADEIA PESADA DE POLIPEPTÍDEO E
 POLINUCLEOTÍDEO DE COMPRIMENTO TOTAL PARA VARIANTE
 PESADA 2**

Sequência de DNA da cadeia pesada de huP1A7-IgG1 H2
 (pXW465)

1 ATGGACTGGA CCTGGAGGGT CTTCTGCTTG CTGGCTGTAG
 CACCAGGTGC

51 CCACTCCCAG GTCCAAGTGG TACAGTCTGG ACACGAGGTG
 AAGCAGCCTG

101 GAGCATCAGT CAAGGTCTCC TGCAAGGCCT CTGGGTATAC
 CTTCAAAAC

151 TATGGAATGA ACTGGGTGAA GCAGGCTCCT GGACAAGGTT
 TAAAGTGGAT

201 GGGCTGGATA AACACCGACA CTGGAGAGCC AACATATACT
 GAAGATTTCC

251 AGGGACGGTT TGTCTTCTCT TTGGACACCT CTGCCAGCAC
 TGTTTATTTG

301 CAGATCAGCA GCCTCAAAGC TGAGGACATG GCAATGTATT

ACTGTGCAAG

351 AGAGGGGGTC CACTTTGACT ACTGGGGCCA AGGGACCCTT
GTCACCGTCT

401 CCTCAGCCTC CACCAAGGGC CCATCGGTCT TCCCCCTGGC
ACCCTCCTCC

451 AAGAGCACCT CTGGGGGACAC AGCGGCCCTG GGCTGCCTGG
TCAAGGACTA

501 CTTCCCCGAA CCGGTGACGG TGTCGTGGAA CTCAGGCGCC
CTGACCAGCG

551 GCGTGACAC CTTCCCGGCT GTCCTACAGT CCTCAGGACT
CTACTCCCTC

601 AGCAGCGTGG TGACCGTGCC CTCCAGCAGC TTGGGCACCC
AGACCTACAT

651 CTGCAACGTG AATCACAAGC CCAGCAACAC CAAGGTGGAC
AAGAAAGTTG

701 AGCCCAAATC TTGTGACAAG ACTCACACAT GCCCACCCTG
CCCAGCACCT

751 GAACTCCTGG GGGGACCGTC AGTCTTCCTC TTCCCCC
AACCCAAGGA

801 CACCCTCATG ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACATGCGTG
GTGGTGGACG

851 TGAGCCACGA AGACCCTGAG GTCAAGTTCA ACTGGTACGT
GGACGGCGTG

901 GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGCGG GAGGAGCAGT
ACAACAGCAC

951 GTACCGTGTG GTCAGCGTCC TCACCGTCCT GCACCAGGAC
TGGCTGAATG

1001 GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG GTCTCCAACA AAGCCCTCCC
AGCCCCATC

1051 GAGAAAACCA TCTCCAAAGC CAAAGGGCAG CCCCAGAGAAC
CACAGGTGTA

1101 CACCCTGCCC CCATCCCGGG ATGAGCTGAC CAAGAACCAG
GTCAGCCTGA

1151 CCTGCCTGGT CAAAGGCTTC TATCCCAGCG ACATCGCCGT
GGAGTGGGAG

1201 AGCAATGGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCTC
CCGTGTTGGA

1251 CTCCGACGGC TCCTTCTTCC TCTACAGCAA GCTCACCGTG
GACAAGAGCA

1301 GGTGGCAGCA GGGGAACGTC TTCTCATGCT CCGTGATGCA
TGAGGCTCTG

1351 CACAACCACT ACACGCAGAA GAGCCTCTCC CTGTCTCCCG
GTTGA (SEQ ID NO: 461)

**[00446] Sequência de proteína prognosticada da cadeia pesada de
H2 de huP1A7 (sequência sinal está sublinhada)**

1 MDWTWRVFCL LAVAPGAHSQ VQLVQSGHEV KQPGASVKVS
CKASGYTFN

51 YGMNWVKQAP GQGLKWMGWI NTDTEPTYT EDFQGRFVFS
LDTSASTVYL

101 QISSLKAEDM AMYYCAREGV HFDYWGQGTL VTVSSASTKG
PSVFPLAPSS

151 KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL

201 SSVVTVPSSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSCDK
THTCPPCPAP

251 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
VKFNWYVDGV

301 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
VSNKALPAPI

351 EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF
YPSDIAVEWE

401 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV

FSCSVMHEAL

451 HNHYTQKSLS LSPG* (SEQ ID NO: 462)

**SEQUÊNCIA DE CADEIA PESADA DE POLIPEPTÍDEO E
POLINUCLEOTÍDEO DE COMPRIMENTO TOTAL PARA VARIANTE
LEVE 1**

**[00447] Sequência de DNA da cadeia leve de L1 de huP1A7 capa
(pXW480)**

1 ATGGATTTTC AGGTTCAGAT TTTCAGCTTC CTGCTAATCA
GTGCCTCAGT

51 CATAATATCC AGAGGAGAAA TTGTTCTCAC CCAGTCTCCA
GCAACCTTGT

101 CTTTATCTCC AGGGGAGAGA GCCACCTTGT CCTGCAGTGC
CAGCTCAAGT

151 GTAAGTTACA TGCACTGGTA CCAGCAGAAG CCAGGCCAAG
CGCCCAGAAG

201 ACTGATTTAT GACACATCCA AACTGGCTTC TGGAATCCCT
GCTCGCTTCA

251 GTGGCAGTGG GTCTGGGACC GATTACACTC TCACCATCAG
CAGCTTGGAG

301 CCTGAAGATT TCGCCGTTTA TTACTGCCAG CAGTGGAGTA
GTAACCCATT

351 CACGTTTCGGC CAGGGGACAA AGGTGGAAAT AAAACGTACG
GTGGCTGCAC

401 CATCTGTCTT CATCTTCCCG CCATCTGATG AGCAGTTGAA
ATCTGGAAC

451 GCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC TATCCCAGAG
AGGCCAAAGT

501 ACAGTGGAAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC
CAGGAGAGTG

551 TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG
CAGCACCCCTG

601 ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG
CCTGCGAAGT

651 CACCCATCAG GGCCTGAGCT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC
AACAGGGGAG

AGTGTTAG (SEQ ID NO: 463)

**[00448] Sequência de proteína prognosticada da cadeia leve de L1
de huP1A7 (sequência sinal está sublinhada)**

1 MDFQVQIFSF LLISASVIIS RGEIVLTQSP ATLSSLSPGER
ATLSCSASSS

51 VSYMHWYQQK PGQAPRRLIY DTSKLAGGIP ARFSGSGSGT
DYTLTISSLE

101 PEDFAVYYCQ QWSSNPFTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP
PSDEQLKSGT

151 ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK
DSTYSLSSTL

201 TLSKADYEKH KVIACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGECS* (SEQ
ID NO: 464)

**SEQUÊNCIA DE CADEIA PESADA DE POLIPEPTÍDEO E
POLINUCLEOTÍDEO DE COMPRIMENTO TOTAL PARA VARIANTE
LEVE 2**

**[00449] Sequência de DNA da cadeia leve de L2 de huP1A7 capa
(pXW476)**

1 ATGGATTTTC AGGTTTCAGAT TTTCAGCTTC CTGCTAATCA
GTGCCTCAGT

51 CATAATATCC AGAGGACAAA TTGTTCTCAC CCAGTCTCCA
GCAACCTTGT

101 CTTTATCTCC AGGGGAGAGA GCCACCTTGT CCTGCAGTGC
CAGCTCAAGT

151 GTAAGTTACA TGCACTGGTA CCAGCAGAAG CCAGGCCAAG
CGCCCAGAAG

201 ACTGATTTAT GACACATCCA AACTGGCTTC TGGAATCCCT

GCTCGCTTCA

251 GTGGCAGTGG GTCTGGGACC GATTACACTC TCACCATCAG
CAGCTTGGAG

301 CCTGAAGATT TCGCCGTTTA TTACTGCCAG CAGTGGAGTA
GTAACCCATT

351 CACGTTTCGGC CAGGGGACAA AGGTGGAAAT AAAACGTACG
GTGGCTGCAC

401 CATCTGTCTT CATCTTCCCG CCATCTGATG AGCAGTTGAA
ATCTGGAACT

451 GCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC TATCCCAGAG
AGGCCAAAGT

501 ACAGTGGAAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC
CAGGAGAGTG

551 TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG
CAGCACCCTG

601 ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG
CCTGCGAAGT

651 CACCCATCAG GGCCTGAGCT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC
AACAGGGGAG

701 AGTGTTAG (SEQ ID NO: 465

**[00450] Sequência de proteína prognosticada da cadeia leve de L2
de huP1A7 (sequência sinal esta sublinhada)**

1 MDFQVQIFSF LLISASVIIS RGQIVLTQSP ATLSLSPGER
ATLSCSASSS

51 VSYMHWYQQK PGQAPRRLIY DTSKLAGSIP ARFSGSGSGT
DYTLTISSLE

101 PEDFAVYYCQ QWSSNPFTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP
PSDEQLKSGT

151 ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK
DSTYSLSSTL

201 TLSKADYEKH KVIACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGECS* (SEQ

ID NOS:466)

[00451] Sequência de polipeptídeo e polinucleotídeo de cadeia pesada e leve de um anticorpo 1A7 quimérico murino e humano segue:

[00452] Sequência de DNA de cadeia leve de chP1A7 capa (pEAG2110)

1 ATGGATTTTC AGGTGCAGAT TTTCAGCTTC CTGCTAATCA
GTGCCTCAGT

51 CATAATATCC AGAGGACAAA TTGTTCTCAC CCAGTCTCCA
GCAATCATGT

101 CTGCATCTCC AGGGGAGAAG GTCACCATGA CCTGCAGTGC
CAGCTCAAGT

151 GTAAGTTACA TGCACTGGTA CCAGCAGAAG TCAGGCACCT
CCCCCAAAG

201 ATGGATTTAT GACACATCCA AACTGGCTTC TGGAGTCCCT
GCTCGCTTCA

251 GTGGCAGTGG GTCTGGGACC TCTTACTCTC TCACAATCAG
CAGCATGGAG

301 GCTGAAGATG CTGCCACTTA TTA CTGCCAG CAGTGGAGTA
GTAACCCATT

351 CACGTTTCGGC TCGGGGACAA AGTTGGAAAT AAAACGTACG
GTGGCTGCAC

401 CATCTGTCTT CATCTTCCCG CCATCTGATG AGCAGTTGAA
ATCTGGAACT

451 GCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC TATCCCAGAG
AGGCCAAAGT

501 ACAGTGGAAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC
CAGGAGAGTG

551 TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG
CAGCACCTG

601 ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG
CCTGCGAAGT

651 CACCCATCAG GGCCTGAGCT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC
AACAGGGGAG

701 AGTGTTAG (SEQ ID NO: 467)

[00453] Sequência de proteína prognosticada da cadeia leve de chP1A7 (sequência sinal está sublinhada)

1 MDFQVQIFSF LLISASVIIS RGQIVLTQSP AIMSASPGEK
VTMTCSASSS

51 VSYMHWYQQK SGTSPKRWIY DTSKLASGVP ARFSGSGSGT
SYSLTISSME

101 AEDAATYYCQ QWSSNPFTFG SGTKEIKRT VAAPSVFIFP
PSDEQLKSGT

151 ASVVCLLNNF YPBREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK
DSTYSLSSTL

201 TLSKADYEKH KVIYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGECS* (SEQ
ID NO: 468)

[00454] Sequência de DNA da cadeia pesada de hulgG1 de chP1A7 (pEAG2112)

1 ATGGACTGGA CCTGGAGGGT CTTCTGCTTG CTGGCTGTAG
CACCAGGTGC

51 CCACTCCCAG GTCCAAGTGG TACAGTCTGG ACCTGAGCTG
AAGAAGCCTG

101 GAGAGACAGT CAAGATCTCC TGCAAGGCCT CTGGGTATAC
CTTCACAAAC

151 TATGGAATGA ACTGGGTGAA GCAGGCTCCA GGAAAGGGTT
TAAAGTGGAT

201 GGGCTGGATA AACACCGACA CTGGAGAGCC AACATATACT
GAAGATTTCC

251 AGGGACGGTT TGCCTTCTCT TTGGAAACCT CTGCCAGCAC
TGTTTATTTG

301 CAGTTCAACA ACCTCAAAAA TGAGGACACG GCTACATATT
TCTGTGCAAG

351	AGAGGGGGTC	CACTTTGACT	ACTGGGGCCA	AGGGACCACG
	GTCACCGTCT			
401	CCTCAGCCTC	CACCAAGGGC	CCATCGGTCT	TCCCCCTGGC
	ACCCTCCTCC			
451	AAGAGCACCT	CTGGGGGGCAC	AGCGGGCCCTG	GGCTGCCTGG
	TCAAGGACTA			
501	CTTCCCCGAA	CCGGTGACGG	TGTCGTGGAA	CTCAGGCGCC
	CTGACCAGCG			
551	GCGTGCACAC	CTTCCCGGCT	GTCCTACAGT	CCTCAGGACT
	CTACTCCCTC			
601	AGCAGCGTGG	TGACCGTGCC	CTCCAGCAGC	TTGGGCACCC
	AGACCTACAT			
651	CTGCAACGTG	AATCACAAGC	CCAGCAACAC	CAAGGTGGAC
	AAGAAAGTTG			
701	AGCCCAAATC	TTGTGACAAG	ACTCACACAT	GCCCACCGTG
	CCCAGCACCT			
751	GAACTCCTGG	GGGGACCGTC	AGTCTTCCTC	TTCCCCCCAA
	AACCCAAGGA			
801	CACCCTCATG	ATCTCCCGGA	CCCCTGAGGT	CACATGCGTG
	GTGGTGACG			
851	TGAGCCACGA	AGACCCTGAG	GTCAAGTTCA	ACTGGTACGT
	GGACGGCGTG			
901	GAGGTGCATA	ATGCCAAGAC	AAAGCCGCGG	GAGGAGCAGT
	ACAACAGCAC			
951	GTACCGTG TG	GTCAGCGTCC	TCACCGTCCT	GCACCAGGAC
	TGGCTGAATG			
1001	GCAAGGAGTA	CAAGTGCAAG	GTCTCCAACA	AAGCCCTCCC
	AGCCCCCATC			
1051	GAGAAAACCA	TCTCCAAAGC	CAAAGGGCAG	CCCCGAGAAC
	CACAGGTGTA			
1101	CACCCTGCCC	CCATCCCGGG	ATGAGCTGAC	CAAGAACCAG

GTCAGCCTGA

1151 CCTGCCTGGT CAAAGGCTTC TATCCCAGCG ACATCGCCGT
GGAGTGGGAG

1201 AGCAATGGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCTC
CCGTGTTGGA

1251 CTCCGACGGC TCCTTCTTCC TCTACAGCAA GCTCACCGTG
GACAAGAGCA

1301 GGTGGCAGCA GGGGAACGTC TTCTCATGCT CCGTGATGCA
TGAGGCTCTG

1351 CACAACCACT ACACGCAGAA GAGCCTCTCC CTGTCTCCCG
GTTGA (SEQ ID NO: 469)

**[00455] Sequência de proteína prognosticada da cadeia pesada de
chP1A7 (sequência sinal está sublinhada)**

1 MDWTWRVFCL LAVAPGAHSQ VQLVQSGPEL KKPGETVKIS
CKASGYTFTN

51 YGMNWVKQAP GKGLKWMGWI NTDTEGEPTYT EDFQGRFAFS
LETSASTVYL

101 QFNNLKNEDT ATYFCAREGV HFDYWGQGT VTVSSASTKG
PSVFPLAPSS

151 KSTSGGTAAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL

201 SSVVTVPSST LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSCDK
THTCPPCPAP

251 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
VKFNWYVDGV

301 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
VSNKALPAPI

351 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSRDELTKNQ VSLTCLVKGF
YPSDIAVEWE

401 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
FSCSVMEAL

451 HNHYTQKSLS LSPG* (SEQ ID NO: 470)

EXEMPLO 18

Reengenheiramento de Li33Ig2 para reduzir a função efetora, glicação e agregação

[00456] Várias mutações foram feitas em Li33 para potencialmente reduzir a função efetora, glicação e agregação. O efeito de cada destas mutações na expressão de proteína, solubilidade, atividade do anticorpo no ensaio de cocultura de oligodendrócito-DRG, e glicação ou ligação de CD32 foi determinado. Os resultados estão resumidos abaixo na Tabela 11.

TABELA 11: REENGEINHEIRAMENTO DE LI33IG2

Função efetora	Construção Expressa	Solubilidade (mg/ml)	ligação de CD32 de IC50 (µg/ml)	Ensaio da atividade (cocultura)
Li33Ig2wt	Y	>20	4,3	+
Li33Ig2 agly	Y	0,3	25	+
Li33Ig2 Rinat	Y	>5	9,5	+
Li33Ig2 PDL	Y	5,8	>100	+
Li33Ig2 Alexion	em andamento	ND	ND	ND
Glicação	Construção Expressa	Solubilidade (mg/ml)	% Glicação	Ensaio da atividade (cocultura)
Li33wt	Y	>20	25	+
Li33Ig2 PDL	Y	5,8	15(5)	+
Li33Ig2 PDLW94G	Y	ND	>2	-
Li33Ig2 PDLW94V	Y	ND	<2	+
Li33Ig2 PDLW94Q	Y	ND	<2	-
Li33Ig2 PDLW93N	Y	ND	<2	-
Li33Ig2 PDLK93R	Y	0,4	<2	+

Função efetora	Construção Expressa	Solubilidade (mg/ml)	ligação de CD32 de IC50 (µg/ml)	Ensaio da atividade (cocultura)
Agregação	Construção Expressa	Solubilidade (mg/ml)	% Glicação	Ensaio da atividade (cocultura)
Li33Ig1a94V 157P	Y	ND	ND	+
Li33Ig1a94V 157S	Y	ND	ND	+
Li33Ig1a94V 157T	Y	ND	ND	-
Li33Ig1a94V 157V	Y	ND	ND	+
Li33Ig2PDL9 4V 157S	Y	ND	ND	+
Li33Ig2PDL9 4V 157A	Y	ND	ND	+
Li33Ig2PDL9 4V W103Q	Y	ND	ND	-
Li33Ig2PDL9 4V W103A	Y	ND	ND	-
Li33Ig2PDL9 4V 103Q57S	Y	ND	<2	+
Li33Ig2PDL9 4V 103Q57A	Y	ND	<2	+

EXEMPLO 19**Construção de uma variante de Li81**

[00457] Anticorpo Li81 é uma versão madura de afinidade do anticorpo Li13. Uma versão aglicosilada do anticorpo de Li81 foi criada alterando um aminoácido simples na sequência de cadeia pesada de Li81. O seguinte é a sequência de aminoácido para a cadeia pesada variável (V_H) da variante aglicosilada.

MDWTWRVFCLLA VAPGAHSEVQLLES GGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYE
MKWVRQAPGKGLEWVSVIGPSGGFTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCATEGDNDAFDIWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS

GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSAYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO: 474)

[00458] A sequência líder (os primeiros 19 aminoácidos) que não estarão presentes na proteína madura são mostrados em negrito, e as CDRs estão sublinhadas. A alteração de aminoácido simples quando comparado à sequência de cadeia pesada variável de Li81 (SEQ ID NO: 433) é mostrada em negrito e sublinhada. O seguinte é a sequência de nucleotídeo para a cadeia pesada variável (V_H) da variante aglicosilada.

GAAGTACAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTTCTT
TACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACCTTCTCTGCTTACGAGATGAA
GTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTGTTATCGGT
CCTTCTGGTGGCTTTACTTTTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCTACTA
TCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAG
GGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACAGAGGGTGATAATGATGCT
TTTGATATCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCA
AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG
CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG
GTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTG
TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC
CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGAGACAAGACTCACA
CATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCT
CTTCCCCCCTAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA
GCAGTACAACAGCGCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG

GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC
CAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTT
GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC
ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGAGGATCCCT
GCCCGG (SEQ ID NO: 450) .

[00459] A presente invenção não será limitada em escopo pelas modalidades específicas descritas que são intencionadas como meras ilustrações dos aspectos individuais da invenção, e quaisquer composições ou métodos que são funcionalmente equivalentes estão dentro do escopo desta invenção. De fato, várias modificações da invenção além daquelas mostradas e descritas aqui ficarão evidentes àqueles versados na técnica da descrição anterior e desenhos em anexo. Tais modificações são intencionadas enquadrarem-se no escopo das reivindicações em anexo.

[00460] Todas as publicações e pedidos de patente mencionados neste relatório descritivo são aqui incorporados por referência na mesma proporção que se cada publicação ou pedido de patente individual fosse específica e individualmente indicados ser incorporados por referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo isolado que pode se ligar especificamente a Sp35, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável da cadeia pesada de imunoglobulina (VH) e uma região variável da cadeia leve de imunoglobulina (VL), em que as regiões o CDR1, CDR2, e CDR3 da VH compreendem as sequências de SEQ ID NO: 436, SEQ ID NO: 437 e SEQ ID NO: 438, respectivamente, e em que as regiões CDR1, CDR2 e CDR3 da VL compreendem as sequências de SEQ ID NO: 442, SEQ ID NO: 443 e SEQ ID NO: 444, respectivamente.

2. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina e a região variável da cadeia leve da imunoglobulina de um anticorpo anti-Sp35 compreendendo a sequência da cadeia pesada da imunoglobulina de SEQ ID NO: 433 e a sequência da cadeia leve de imunoglobulina da SEQ ID NO: 434.

3. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende a sequência da SEQ ID NO: 433 e a sequência da SEQ ID NO: 434.

4. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende a sequência da SEQ ID NO: 435 e a sequência da SEQ ID NO: 434.

5. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é fusionado a um motivo alvo do cérebro.

6. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o motivo alvo do cérebro é selecionado do grupo que consiste no anticorpo de domínio único FC5, o anticorpo monoclonal mAB 83-14 contra o receptor de insulina humana, um peptídeo B2 que se liga ao receptor de transferrina humana, um peptídeo B6 que se liga ao receptor de transferrina humana e um peptídeo B8 que se liga ao

receptor de transferrina humana, anti-receptor de Fc, transferrina e anti-receptor de insulina.

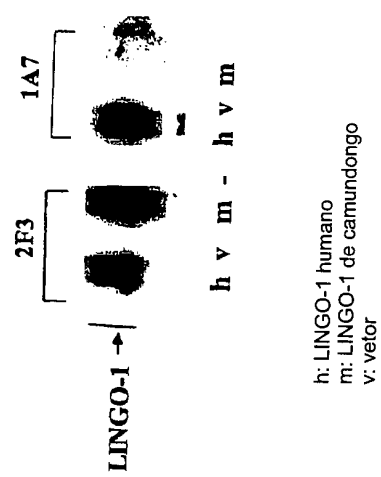
7. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

8. Uso do anticorpo isolado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para tratar esclerose múltipla em um indivíduo humano.

9. Uso do anticorpo isolado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para tratar neurite óptica em um indivíduo humano.

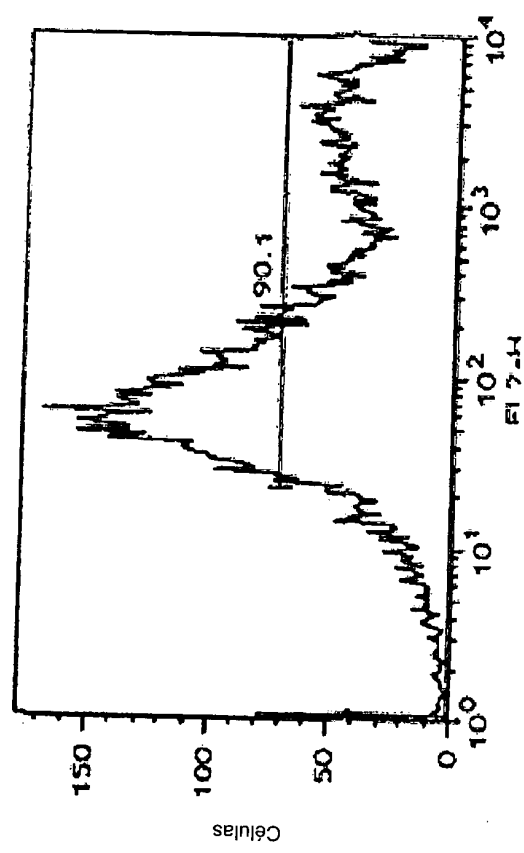
10. Uso do anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para tratar neuropatia óptica isquêmica aguda em um indivíduo humano.

FIG. 1



Dados de FACS de células 293 transfeccionadas de LINGO-1 humano

1A7



Células vivas

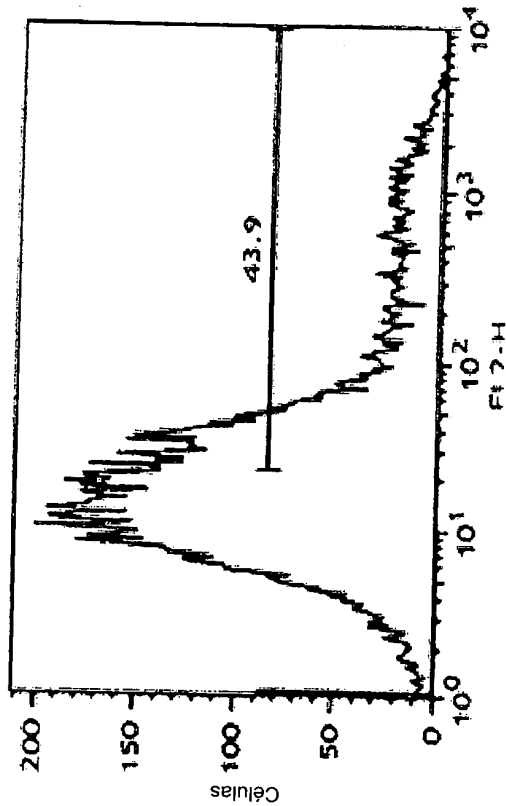
ZS061704.C03

Contagem do evento: 12917

(FL2-H): Média geométrica = 172
(FL2-H): Média = 923
(FL2-H): Mediano = 113

Fig 2A

Dados de FACS de células 293 transfeccionadas de LINGO-1 humano
2F3



Células vivas

Z5061704.C08

Contagem do evento 13349

(FL2-H): Média geométrica = 24.9
(FL2-H): Média 138
(FL2-H): Mediano 18.6

Fig 2B

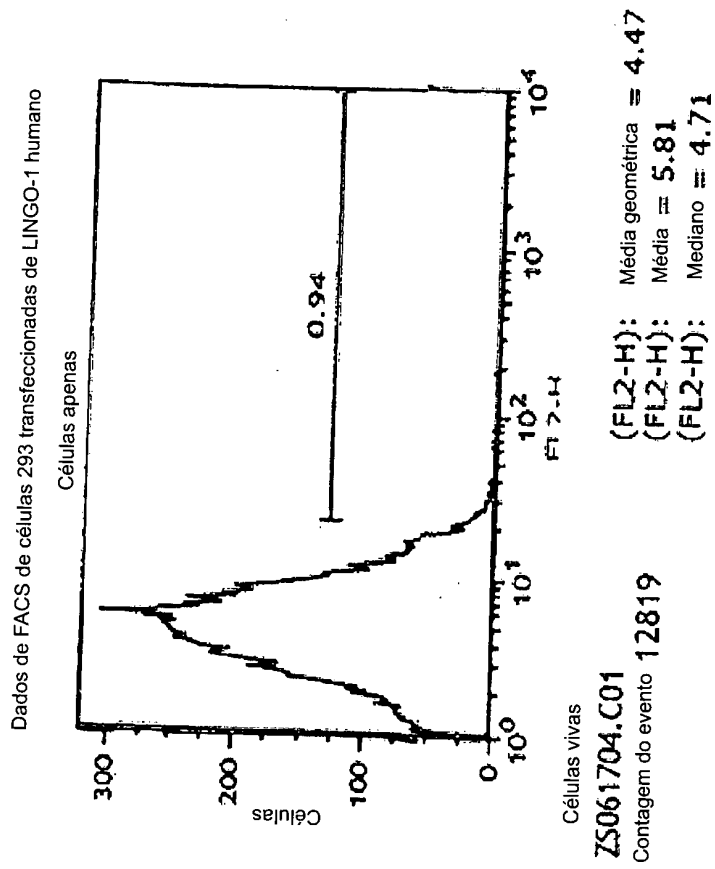


Fig 2C

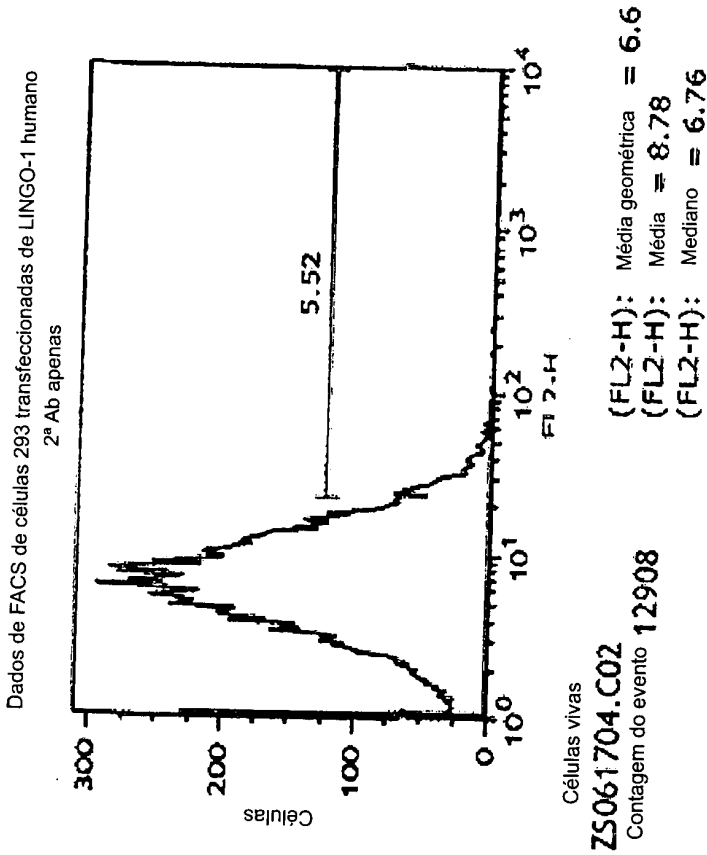


Fig 2D

1A7 e 2F3 promovem desenvolvimento de neurite de CGN e DRG

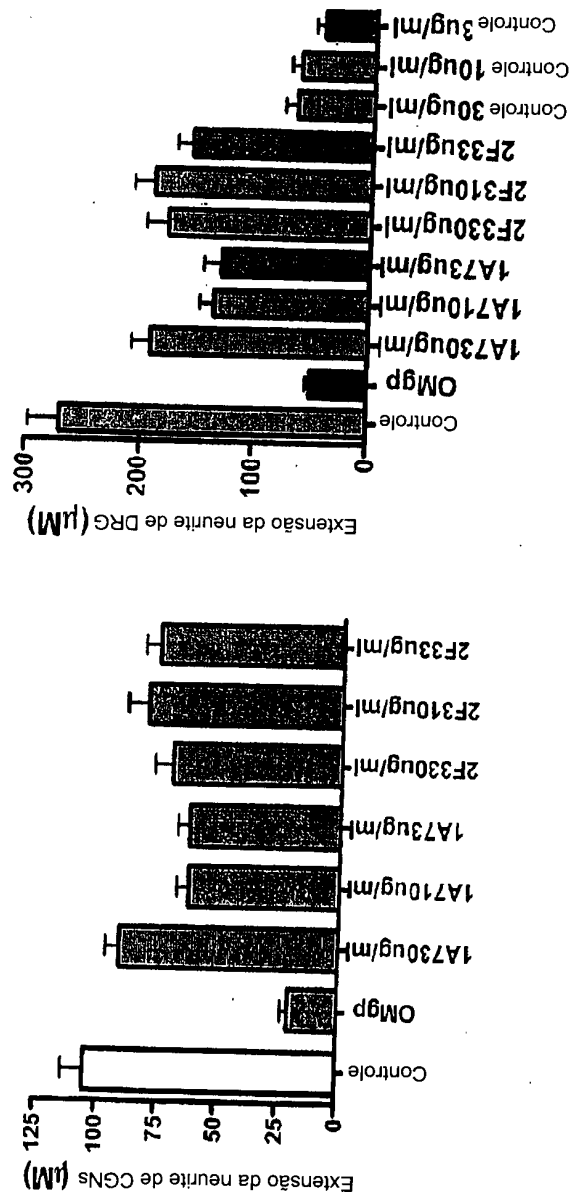


Fig 3

FIG. 4: mABs de anti-LINGO-1 promovem mielinização em cocultura

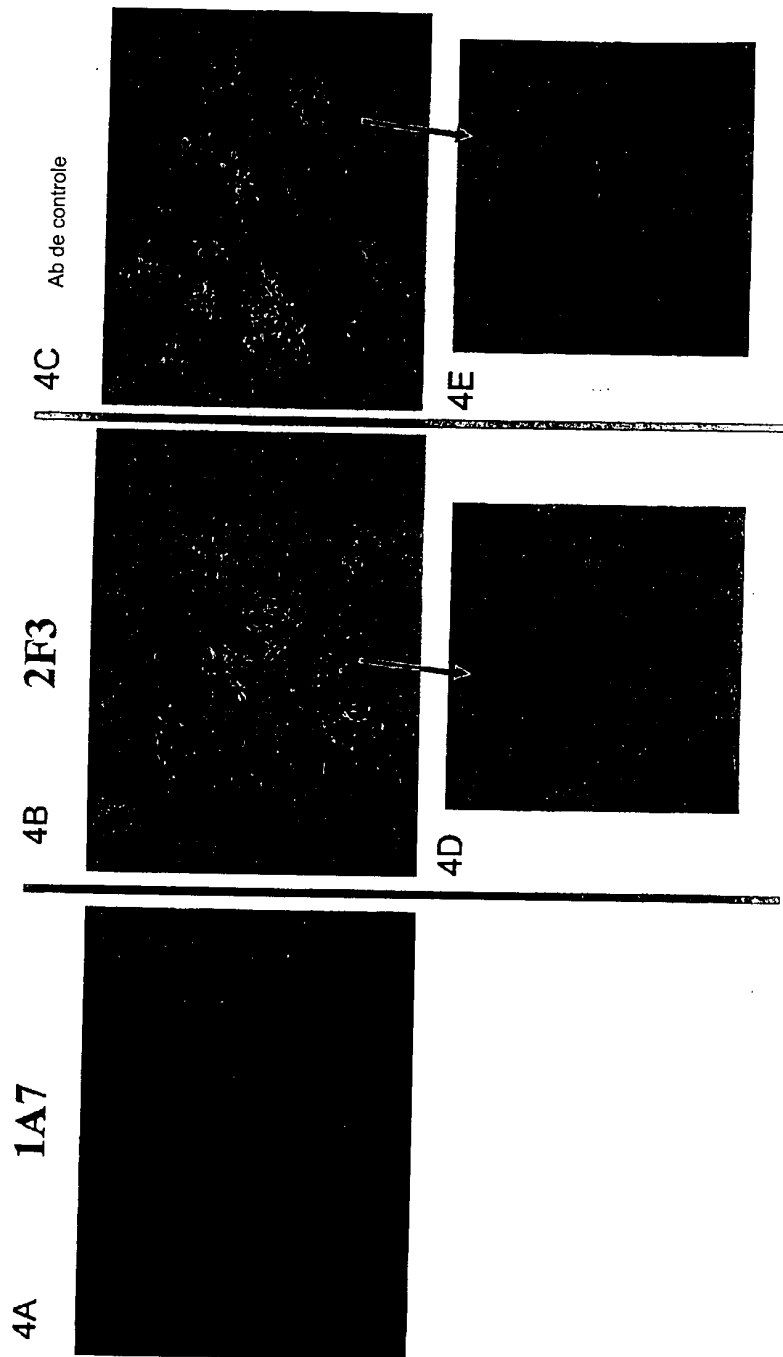
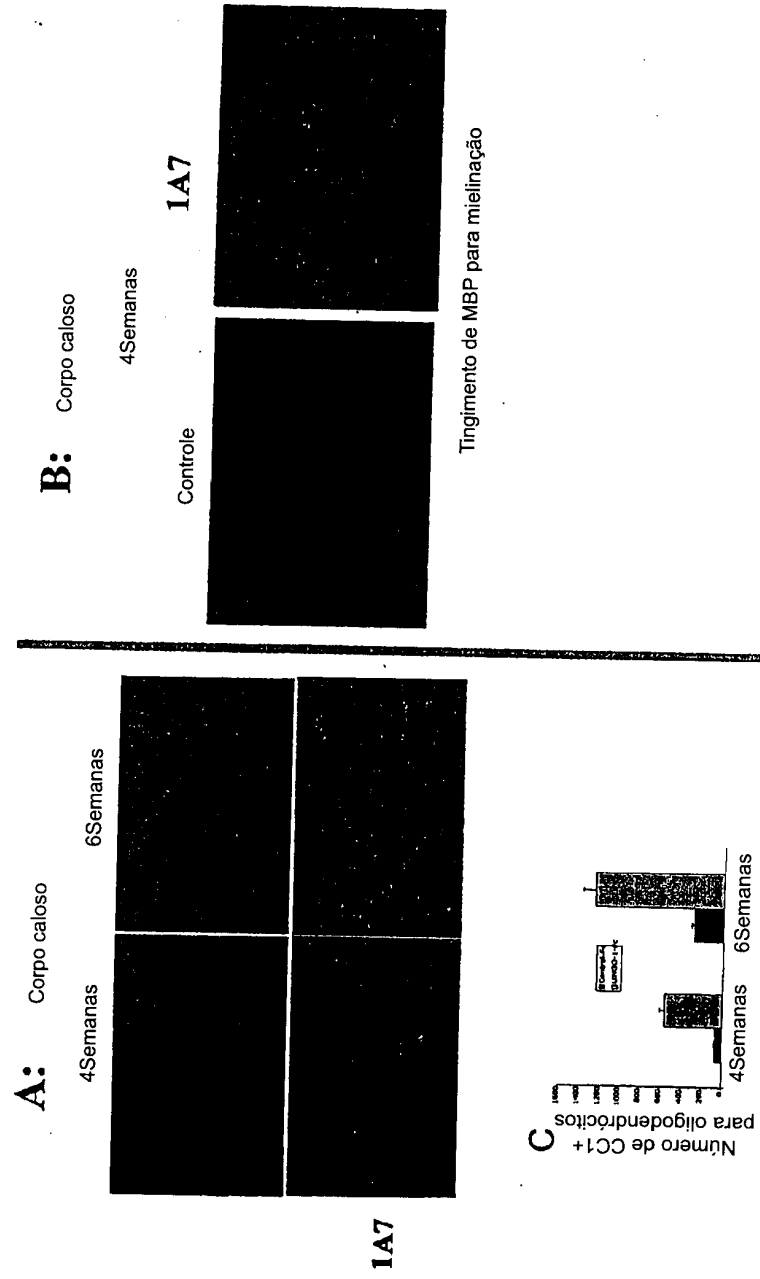


FIG. 4: Anticorpos de anti-LINGO-1- promovem mielinização em cocultura



FIG. 5: 1A7 promove sobrevivência de oligodendrócitos e remielinação em modelo de cuprizona



1A7 promove sobrevivência neuronal de RGC

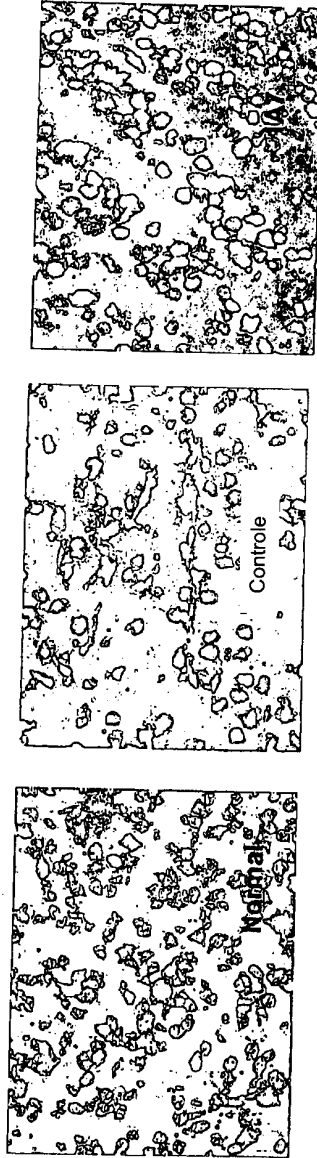
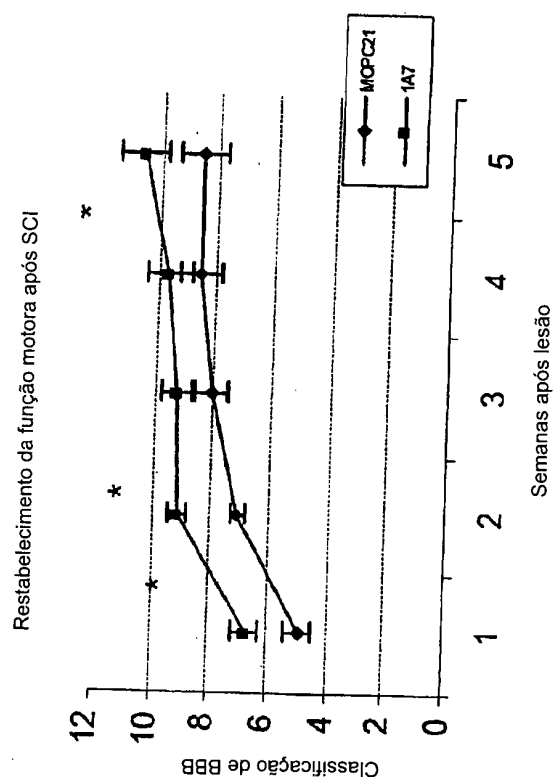


Fig 6



*P < 0,05 (ANOVA bidirecional com RM)

Fig 7

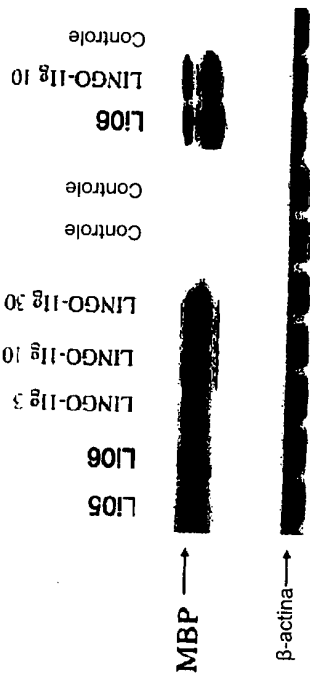


Fig 8

Tratamento com 1A7 promove remielinação e reparo no modelo de rato com neurite óptica

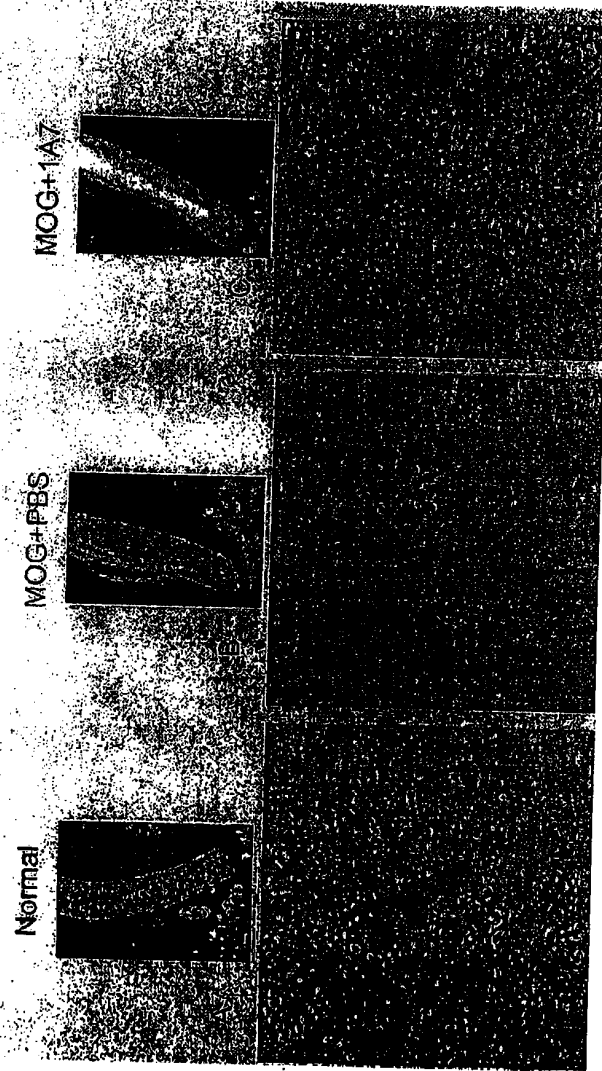


FIG. 9

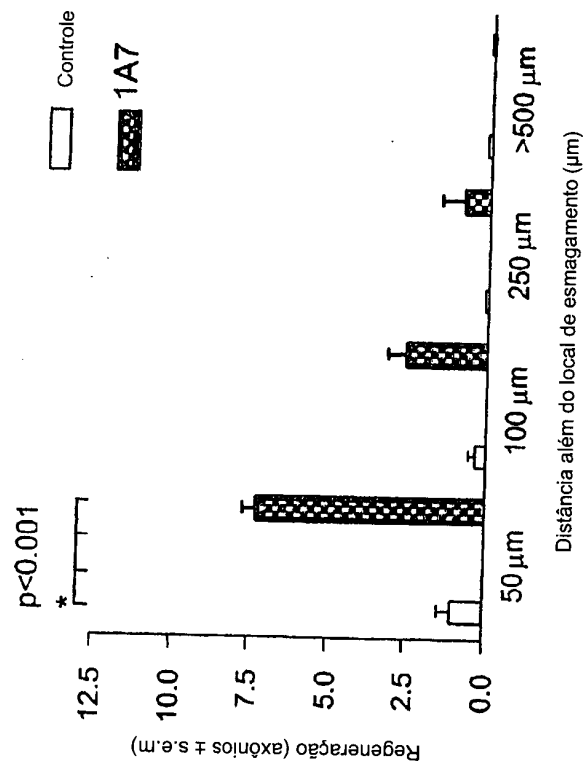


Fig. 10

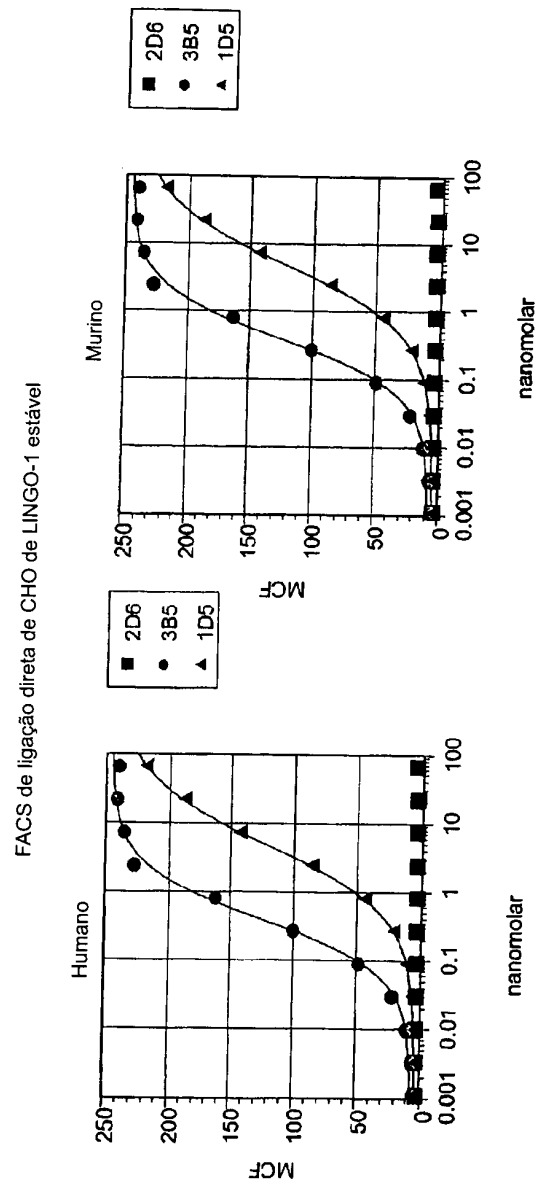


Fig. 11