

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2005.06.24</b>	(73) Titular(es): <b>BIOGEN IDEC MA INC.</b> <b>14 CAMBRIDGE CENTER CAMBRIDGE,</b> <b>MASSACHUSETTS 02142</b> <b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>2004.06.24 US 582966 P</b> <b>2004.10.07 US 617297 P</b> <b>2004.11.15 US 628435 P</b> <b>2005.05.13 US 680475 P</b>	(72) Inventor(es): <b>JOHN MCCOY</b> <b>US</b> <b>R. BLAKE PEPINSKY</b> <b>US</b> <b>SHA MI</b> <b>US</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2007.04.25</b>	(74) Mandatário: <b>ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO</b> <b>RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA</b> <b>PT</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2012.10.03</b> <b>234/2012</b>	

(54) Epígrafe: **TRATAMENTO DE ESTADOS QUE ENVOLVEM DESMIELINIZAÇÃO**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PROPORCIONA MÉTODOS DE TRATAMENTO DE DOENÇAS, DISTÚRBIOS OU LESÕES QUE ENVOLVEM DESMIELINIZAÇÃO E DISMIELINIZAÇÃO, INCLUINDO ESCLEROSE MÚLTIPLA, ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO DE UM ANTAGONISTA DE SP35.

## RESUMO

### **"TRATAMENTO DE ESTADOS QUE ENVOLVEM DESMIELINIZAÇÃO"**

A invenção proporciona métodos de tratamento de doenças, distúrbios ou lesões que envolvem desmielinização e dismielinização, incluindo esclerose múltipla, através da administração de um antagonista de Sp35.

## DESCRIÇÃO

### "TRATAMENTO DE ESTADOS QUE ENVOLVEM DESMIELINIZAÇÃO"

Antecedentes da Invenção

Campo da Invenção

Esta invenção refere-se a neurobiologia, neurologia e farmacologia. Mais particularmente, refere-se a antagonistas de Sp35 para utilização em métodos de tratamento de esclerose múltipla como definidos nas reivindicações.

Técnica Antecedente

Muitas doenças do sistema nervoso estão associadas com desmielinização e dismielinização, incluindo esclerose múltipla (EM), leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP), encefalomielite (EPL), mielinólise pontina central (MPC), degeneração Walleriana e algumas doenças hereditárias, tais como adrenoleucodistrofia, doença de Alexander e doença de Pelizaeus-Merzbacher (PMZ). Entre estas doenças, a EM é a mais difundida, afectando aproximadamente 2,5 milhões de pessoas mundialmente.

A EM começa geralmente com um padrão de recorrência-remissão de envolvimento neurológico que depois progride para uma fase crónica com aumento da lesão neurológica. A EM está associada com a destruição de mielina, oligodendrócitos e axónios

localizados nas lesões crónicas. A desmielinização observada na EM não é sempre permanente e a remielinização foi documentada em fases precoces da doença. A remielinização dos neurónios requer oligodendrócitos.

Estão disponíveis vários tratamentos de modificação da doença para a EM, incluindo a utilização de corticoesteróides e imunomoduladores, tal como interferão beta. Além disso, devido ao papel central dos oligodendrócitos e da mielinização na EM, foram feitos esforços para desenvolver terapias para aumentar o número de oligodendrócitos ou para intensificar a mielinização. Ver, e. g., Cohen *et al.*, Pat. U.S. N° 5574009; Chang *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 346:165-73 (2002). Contudo, permanece uma necessidade urgente para conceber terapias adicionais para a EM.

O Pedido de Patente Internacional W02004085648A2, publicado em 7 de Outubro de 2004, divulga antagonistas de Sp35 para tratamento de doenças, distúrbios e lesões neurológicas através da promoção da sobrevivência neuronal.

#### Breve Sumário da Invenção

A presente invenção é baseada na observação de que o Sp35 (Sp35 é também designado na literatura como LINGO-1 e LRRN6) é expresso em oligodendrócitos e regula negativamente a diferenciação e sobrevivência dos oligodendrócitos e a mielinização dos axónios. Além disso, determinados antagonistas de Sp35 promovem a sobrevivência, proliferação e diferenciação dos oligodendrócitos, assim como a mielinização dos neurónios. Com base nestas observações, a invenção proporciona um método *in vitro* para promover a diferenciação ou a sobrevivência de oligodendrócitos, cujo método compreende colocar em contacto

oligodendrócitos que expressam Sp35 com uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo um antagonista de Sp35 (LINGO-1) seleccionado do grupo consistindo de:

- (i) um polipéptido Sp35 solúvel que carece de um domínio transmembranar e de um domínio citoplasmático de Sp35;
- (ii) um anticorpo de Sp35 ou um seu fragmento de ligação a antigénio;
- (iii) um polipéptido antagonista de Sp35 seleccionado do grupo consistindo de: (a) um polipéptido anti-sentido; (b) uma ribozima; (c) um pequeno ARN de interferência (siARN); e (d) um ARN de gancho-de-cabelo pequeno (shARN); e
- (iv) uma combinação de dois ou mais dos referidos antagonistas de Sp35.

A presente invenção também proporciona um antagonista de Sp35 (LINGO-1) seleccionado do grupo consistindo de:

- (i) um polipéptido Sp35 solúvel que carece de um domínio transmembranar e de um domínio citoplasmático de Sp35;
- (ii) um anticorpo de Sp35 ou um seu fragmento de ligação a antigénio;
- (iii) um polipéptido antagonista de Sp35 seleccionado do grupo consistindo de: (a) um polipéptido anti-sentido; (b) uma ribozima; (c) um pequeno ARN

de interferência (siARN); e (d) um ARN de gancho-de-cabelo pequeno (shARN); e

(iv) uma combinação de dois ou mais dos referidos antagonistas de Sp35;

para utilização num método de tratamento de esclerose múltipla num mamífero, através da promoção da diferenciação ou sobrevivência de oligodendrócitos que expressam Sp35.

Os polipéptidos Sp35 solúveis incluem polipéptidos compreendendo (i) um domínio de Repetição Rico em Leucina (LRR) de Sp35, (ii) uma região básica C-terminal de Sp35 relativamente ao domínio LRR e (iii) um domínio de imunoglobulina (Ig) de Sp35. Em algumas formas de realização, o polipéptido Sp35 solúvel carece de um domínio Ig de Sp35, um domínio LRR de Sp35, um domínio transmembranar e um domínio citoplasmático. Em algumas formas de realização, o polipéptido Sp35 solúvel compreende um domínio LRR de Sp35 e carece de um domínio Ig de Sp35, uma região básica de Sp35, um domínio transmembranar e um domínio citoplasmático. Em algumas formas de realização, o polipéptido Sp35 solúvel compreende os resíduos aminoacídicos 34-532 da SEQ ID N°: 2.

Em algumas formas de realização, o antagonista de Sp35 é para ser administrado por injeção de bólus ou infusão crónica. Em algumas formas de realização, o polipéptido Sp35 solúvel é para ser administrado directamente no sistema nervoso central. Em algumas formas de realização, o polipéptido Sp35 solúvel é para ser administrado directamente numa lesão crónica de EM.

Em algumas formas de realização, o antagonista de Sp35 é um polipéptido de fusão compreendendo uma unidade não de Sp35. Em

algumas formas de realização, a unidade não de Sp35 é seleccionada do grupo consistindo de uma unidade Ig de anticorpo, uma unidade de albumina sérica, uma unidade de direccionamento, uma unidade repórter e uma unidade que facilita a purificação. Em algumas formas de realização, a unidade Ig de anticorpo é uma unidade de charneira e Fc.

Em algumas formas de realização, os polipéptidos e anticorpos utilizados na presente invenção são conjugados num polímero. Em algumas formas de realização, o polímero é seleccionado do grupo consistindo de um polialquilenoglicol, um polímero de açúcar e um polipéptido. Em algumas formas de realização, o polialquilenoglicol é polietilenoglicol (PEG). Em algumas formas de realização, os polipéptidos e anticorpos utilizados na presente invenção são conjugados a 1, 2, 3 ou 4 polímeros. Em algumas formas de realização, o peso molecular total dos polímeros é desde 5000 Da a 100000 Da.

A invenção é definida no conjunto de reivindicações anexas.

#### Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 é a sequência de nucleótidos de um ADNc de Sp35 humano de tamanho total (SEQ ID N°: 1).

A Figura 2 é a sequência de aminoácidos de um polipéptido de Sp35 humano de tamanho total (SEQ ID N°: 2).

A Figura 3 é a sequência de nucleótidos de uma sequência que codifica um polipéptido Sp35 de murganho de tamanho total (SEQ ID N°: 3).

A Figura 4 é a sequência de aminoácidos de um polipéptido Sp35 de murganho de tamanho total (SEQ ID N°: 4).

Figura 5 - Sp5 (LINGO-1) é expresso em oligodendrócitos. Análise de RT-PCR da expressão de ARNm de LINGO-1 em culturas neuronais P13 CG (p13CGN), de oligodendrócitos e de astrócitos. A expressão de GAPDH foi analisada a partir das mesmas amostras como um controlo interno.

Figuras 6A e 6B - (A) Análise de RT-PCR da expressão de ARNm de Sp5 (LINGO-1) a partir de oligodendrócitos infectados com ARNi e um controlo não infectado. A  $\beta$ -actina foi utilizada como um padrão interno. (B) Quantificação de oligodendrócitos maduros em culturas tratadas com ARNi.

Figura 7 - Expressão de ARNm de Sp35 (LINGO-1) em oligodendrócitos em várias fases de desenvolvimento. Os oligodendrócitos foram induzidos para se diferenciarem e a quantificação de Sp35 foi realizada por RT-PCR. Os dados foram normalizados para níveis de GAPDH como um controlo interno. Os oligodendrócitos de progenitor precoce ( $A2B5^+$ ) e os oligodendrócitos pré-mielinizantes ( $O4^+$ ) mostraram níveis equivalentes de ARNm de Sp35, mas o nível de ARNm de Sp35 mais do que duplicou em oligodendrócitos maduros ( $MBP^+$ ).

Figura 8 - Diferenciação dependente da dose de oligodendrócitos após tratamento exógeno de LINGO-1-Fc, comparativamente ao tratamento com um polipéptido de controlo Fc. Os dados foram quantificados por contagem do número de oligodendrócitos maduros (identificados pela presença de camadas de mielina) como uma percentagem de oligodendrócitos  $O4^+$  totais. Para cada amostra, foram contadas aproximadamente 800 células.



Figura 9 - Os antagonistas de LINGO-1 (Sp5) regulam RhoA e Fyn. (A) RhoA-GTP acumula-se em oligodendrócitos tratados com LINGO-1-Fc, como detectado por transferência de Western. (B) Expressão e fosforilação de Fyn (pFyn) em oligodendrócitos infectados com lentivírus contendo FL-LINGO-1, DN-LINGO-1 ou plasmídeos de controlo, como detectado por transferência de Western.

Figura 10A - Os antagonistas de LINGO-1 promovem a mielinização axonal através de oligodendrócitos. Análise quantitativa da mielinização em co-culturas que foram tratadas com LINGO-1-Fc (10 µg/mL) durante 2 semanas. Para cada amostra, foram contados dez campos de células coradas para MBP<sup>+</sup>.

Figura 10B - transferência de Western de co-culturas de 4 semanas tratadas com LINGO-1-Fc exógeno e um polipéptido de controlo de fc, utilizando anticorpo anti-MBP para detectar a presença da proteína MBP.

Figuras 10C e 10D - Análise de microscopia electrónica de co-culturas que foram tratadas com LINGO-1-Fc (C) ou controlo Fc (D) durante 4 semanas. É indicada a estrutura de nódulo de Ranvier. Barra da escala: 1,5 µm.

Figuras 10E e 10F - Mielinização em co-culturas que foram infectadas com FL-LINGO-1, DN-LINGO-1 e lentivírus de controlo, durante duas semanas. As células MBP<sup>+</sup> foram contadas por imunofluorescência (E). Transferências de Western de culturas infectadas com FL-LINGO-1, DN-LINGO-1 e lentivírus de controlo analisadas para MBP e para LINGO-1, utilizando um anticorpo para o marcador de hemaglutinina (F).

Figura 10G - Mielinização em co-culturas em que apenas as células ganglionares da raiz dorsal (infectadas com DRG) ou oligodendrócitos (infectados com oligo) ou ambas (ambas infectadas) foram infectadas com FL-LINGO-1, DN-LINGO-1 e lentivírus de controlo.

Figuras 11A e 11B - Microscopia electrónica mostrando (A) análise visual e (B) quantitativa de fibras axonais mielinizadas em espinha dorsal de murganhos P1 de tipo selvagem e silenciados para LINGO-1. Quatro espinhas dorsais foram analisadas; para cada amostra, foram contados dez campos de fibras axonais mielinizadas. Os dados mostrados são os valores médios de todas as medições.

Figura 12 - Murganhos tratados com cuprizona foram injectados cirurgicamente com Sp5-Fc (LINGO-1-Fc) ou com um polipéptido de controlo, como aqui descrito. Os animais que recebem o tratamento de Sp35-Fc apresentaram uma sobrevivência aumentada de oligodendrócitos maduros (com base em coloração de anticorpo CC1).

Figura 13 - Ensaio TUNEL de células PC12 diferenciadas, 18 horas após retirada de NGF, tratadas com Sp35-Fc (LINGO-1-Fc) ou um controlo. As células tratadas com Sp5-Fc tinham menos células a sofrer apoptose.

Figura 14 - Apoptose em células PC12 diferenciadas privadas de apoio trófico, 18 horas após remoção de NGF do meio de cultura tratado com Sp35-Fc (LINGO-1), inibidor da caspase zVAD ou um polipéptido de controlo. As células tratadas com o polipéptido de controlo mostraram a maior morte celular.

Figura 15 - Transferência de Western de co-culturas tratadas com LINGO-1-Ig-Fc exógeno, LINGO-1-Ig-Fc mutante (arginina na posição 456 alterada para histidina), LINGO-1-Fc e um polipéptido de controlo de fc, utilizando anticorpo anti-MBP para detectar a presença da proteína MBP.

Figura 16 - Transferência de Western de 4 co-culturas tratadas com péptidos cíclicos de LINGO-1-Ig exógeno e péptidos cíclicos de LINGO-1-Ig mutado, como descrito no Exemplo 6, utilizando anticorpo anti-MBP para detectar a presença da proteína MBP.

#### Descrição Detalhada da Divulgação

#### Definições

Salvo definição em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado como geralmente compreendido por um técnico com conhecimento geral na matéria a que esta divulgação pertence. No caso de conflito, o presente pedido governará, incluindo as definições. Salvo requerido em contrário, pelo contexto, os termos no singular incluirão os termos no plural e os termos no plural incluirão os termos no singular.

Embora métodos e materiais semelhantes ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser utilizados na prática ou teste da presente divulgação, os métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos e não pretendem ser limitativos. Outras características e vantagens da divulgação serão evidentes a partir da descrição detalhada e das reivindicações.

De modo a definir adicionalmente esta divulgação, são proporcionados os seguintes termos e definições.

Deverá notar-se que o termo "um" ou "uma" entidade, refere-se a uma ou mais dessas entidades; por exemplo, "uma molécula de imunoglobulina" é entendida como representar uma ou mais moléculas de imunoglobulina. Como tal, os termos "um" (ou "uma"), "um ou mais" e "pelo menos um" podem ser aqui indistintamente utilizados.

Ao longo desta descrição e das reivindicações, a palavra "compreende" ou variações como "compreendem" ou "compreendendo" indicam a inclusão de qualquer entidade ou grupo de entidades, mas não a exclusão de qualquer outra entidade ou grupo de entidades.

Como aqui utilizado, uma "quantidade terapêuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e durante períodos de tempo necessários, para conseguir um resultado terapêutico desejado. Um resultado terapêutico pode ser, e. g., a atenuação dos sintomas, sobrevivência prolongada, mobilidade melhorada e semelhantes. Um resultado terapêutico não necessita ser uma "cura".

Como aqui utilizado, uma "quantidade profilacticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e durante períodos de tempo necessários, para conseguir o resultado profilático desejado. Tipicamente, uma vez que é utilizada uma dose profiláctica em indivíduos antes ou numa fase precoce da doença, a quantidade profilacticamente eficaz será menor do que a quantidade terapêuticamente eficaz.

Como aqui utilizado, um "polinucleótido" pode conter a sequência de nucleótidos da sequência de ADNc de tamanho total, incluindo as sequências 5' e 3' não traduzidas, sequências codificantes, assim como fragmentos, epitopos, domínios e variantes da sequência de ácido nucleico. O polinucleótido pode ser composto de qualquer polirribonucleótido ou polidesoxirribonucleótido que pode ser ARN ou ADN não modificado ou ARN ou ADN modificado. Por exemplo, os polinucleótidos podem ser compostos de ADN de cadeia dupla e cadeia simples, ADN que é uma mistura de regiões de cadeia simples e dupla, ARN de cadeia simples e dupla, ARN que é uma mistura de regiões de cadeia simples e dupla, moléculas híbridas compreendendo ADN e ARN que podem ser de cadeia simples ou, mais tipicamente, de cadeia dupla ou uma mistura de regiões de cadeia simples e dupla. Além disso, os polinucleótidos podem ser compostos de regiões de cadeia tripla compreendendo ARN ou ADN ou ambos ARN e ADN. Os polinucleótidos podem também conter uma ou mais bases modificadas ou estruturas de ADN ou ARN modificado por questões de estabilidade ou outras razões. As bases "modificadas" incluem, por exemplo, bases tritiladas e bases não comuns, tal como inosina. Uma variedade de modificações pode ser realizada em ADN e ARN; assim, "polinucleótido" abrange formas modificadas quimicamente, enzimaticamente ou metabolicamente.

Na presente divulgação, um polipéptido pode ser composto de aminoácidos ligados uns aos outros por ligações peptídicas ou ligações peptídicas modificadas, *i. e.*, isoésteres peptídicos, e pode conter aminoácidos diferentes dos 20 aminoácidos codificados geneticamente (*e. g.*, aminoácidos de ocorrência não natural). Os polipéptidos da presente divulgação podem ser modificados por processos naturais, tal como processamento pós-tradução, ou por técnicas de modificação química que são bem conhecidas no campo técnico. Tais modificações são bem descritas

em textos básicos e em monografias mais detalhadas, assim como numa volumosa literatura de investigação. As modificações podem ocorrer em qualquer local no polipéptido, incluindo a estrutura peptídica, as cadeias laterais aminoacídicas e nos terminais amino ou carboxilo. Deve ser entendido que o mesmo tipo de modificação pode estar presente no mesmo grau ou em graus variados em diversos locais num dado polipéptido. Além disso, um dado polipéptido pode conter muitos tipos de modificações. Os polipéptidos podem ser ramificados, por exemplo, como resultado de ubiquitinação, e podem ser cíclicos, com ou sem ramificação. Os polipéptidos cíclicos, ramificados e cíclicos ramificados podem resultar de processos naturais de pós-tradução ou podem ser realizados por métodos sintéticos. As modificações incluem acetilação, acilação, ADP-ribosilação, amidação, ligação covalente de flavina, ligação covalente de um grupo hémico, ligação covalente de um nucleótido ou derivado de nucleótido, ligação covalente de um lípido ou derivado de lípido, ligação covalente de fosfotidilinositol, reticulação, ciclização, formação de ligação perssulfureto, desmetilação, formação de reticulados covalentes, formação de cisteína, formação de piroglutamato, formilação, gama-carboxilação, glicosilação, formação de âncora de GPI, hidroxilação, iodinação, metilação, miristoilação, oxidação, pegilação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, racemização, selenoilação, sulfatação, adição mediada por ARN de transferência de aminoácidos a proteínas, tais como arginilação e ubiquitinação. (ver, por exemplo, *Proteins - Structure And Molecular Properties*, 2<sup>a</sup> Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nova Iorque (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nova Iorque, pg. 1-12 (1983); Seifter *et al.*, *Meth Enzymol* 182: 626-646 (1990); Rattan *et al.*, *Ann NY Acad Sci* 663:48-62 (1992)).

Os termos "fragmento", "variante", "derivados" e "análogos" quando se referem a um antagonista de Sp35 da presente divulgação, incluem quaisquer moléculas de antagonista que retenham, pelo menos, alguma capacidade para inibir a actividade de Sp35. Os antagonistas de Sp35, como aqui descritos, podem aí incluir moléculas de fragmento, variante ou derivado, sem limitação, desde que o antagonista de Sp35 ainda tenha a sua função. Os polipéptidos Sp35 solúveis da presente divulgação podem incluir fragmentos proteolíticos, fragmentos de deleção de Sp35 e, em particular, fragmentos que mais facilmente chegam ao local de acção quando administrados num animal. Os fragmentos de polipéptidos incluem ainda qualquer porção do polipéptido que compreenda um epitopo antigénico ou imunogénico do polipéptido nativo, incluindo epitopos lineares assim como tridimensionais. Os polipéptidos Sp35 solúveis da presente divulgação podem compreender regiões Sp35 variantes, incluindo fragmentos como acima descritos e também polipéptidos com sequências de aminoácidos alteradas devido a substituições, deleções ou inserções de aminoácidos. As variantes podem ocorrer naturalmente, tal como uma variante alélica. Por uma "variante alélica" entende-se formas alternativas de um gene que ocupa um dado locus num cromossoma de um organismo. *Genes II*, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, Nova Iorque (1985). As variantes de ocorrência não natural podem ser produzidas utilizando técnicas de mutagénese conhecidas no campo técnico. Os polipéptidos Sp35 solúveis podem compreender substituições, deleções ou adições de aminoácidos, conservadoras ou não conservadoras. Os antagonistas de Sp35 da presente divulgação podem também incluir moléculas derivadas. Por exemplo, os polipéptidos Sp35 solúveis da presente divulgação podem incluir regiões Sp35 que foram alteradas de modo a apresentarem características adicionais não encontradas no polipéptido nativo. Os exemplos incluem proteínas de fusão e conjugados proteicos.

Na presente divulgação, um "fragmento de polipéptido" refere-se a uma pequena sequência de aminoácidos de um polipéptido Sp35. Os fragmentos proteicos podem estar "isolados" ou compreendidos num polipéptido maior do qual o fragmento forma uma parte da região. Os exemplos representativos de fragmentos de polipéptido da invenção incluem, por exemplo, fragmentos compreendendo cerca de 5 aminoácidos, cerca de 10 aminoácidos, cerca de 15 aminoácidos, cerca de 20 aminoácidos, cerca de 30 aminoácidos, cerca de 40 aminoácidos, cerca de 50 aminoácidos, cerca de 60 aminoácidos, cerca de 70 aminoácidos, cerca de 80 aminoácidos, cerca de 90 aminoácidos e cerca de 100 aminoácidos de comprimento.

*Anticorpo ou Imunoglobulina.* Num exemplo, os antagonistas de Sp35 para utilização nos métodos de tratamento aqui divulgados são moléculas de "anticorpo" ou "imunoglobulina", ou os seus fragmentos imuno-específicos, e. g., moléculas de anticorpo ou imunoglobulina de ocorrência natural ou moléculas ou fragmentos de anticorpo manipulados que se ligam ao antigénio de um modo semelhante às moléculas de anticorpo. Os termos "anticorpo" e "imunoglobulina" são aqui indistintamente utilizados. Um anticorpo ou imunoglobulina compreende, pelo menos, o domínio variável de uma cadeia pesada e compreende normalmente, pelo menos, os domínios variáveis de uma cadeia pesada e de uma cadeia leve. As estruturas básicas de imunoglobulina em sistemas vertebrados são relativamente bem entendidas. Ver, e. g., Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988).

Como será discutido mais detalhadamente abaixo, o termo "imunoglobulina" compreende cinco amplas classes de polipéptidos que podem ser distinguidas bioquimicamente. Todas as cinco classes estão claramente no âmbito da divulgação e a seguinte



discussão será geralmente dirigida à classe IgG de moléculas de imunoglobulina. No que diz respeito a IgG, uma molécula padrão de imunoglobulina compreende dois polipéptidos de cadeia leve idênticos, de peso molecular aproximadamente 23000 Daltons e dois polipéptidos de cadeia pesada idênticos, de peso molecular 53000-70000. As quatro cadeias são tipicamente ligadas por ligações persulfureto numa configuração em "Y" em que as cadeias leves se associam às cadeias pesadas, começando na boca do "Y" e continuando através da região variável.

As cadeias leves e pesadas estão divididas em regiões de homologia estrutural e funcional. Os termos "constante" e "variável" são utilizados funcionalmente. Quanto a isto, deve ser entendido que os domínios variáveis das porções da cadeia leve ( $V_L$ ) e pesada ( $V_H$ ) determinam o reconhecimento e a especificidade do antigénio. Inversamente, os domínios constantes da cadeia leve ( $C_L$ ) e da cadeia pesada ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  ou  $C_{H3}$ ) conferem importantes propriedades biológicas, tais como secreção, mobilidade transplacentária, ligação do receptor Fc, ligação do complemento e semelhantes. Por convenção, a numeração dos domínios da região constante aumenta à medida que estão mais distais do local de ligação ao antigénio ou ao terminal amino do anticorpo. A porção do N-terminal é região variável e a porção C-terminal é uma região constante; os domínios  $C_{H3}$  e  $C_L$  compreendem, de facto, o terminal carboxilo da cadeia pesada e leve, respectivamente.

As cadeias leves são classificadas como kapa ou lambda ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ). Cada classe de cadeia pesada pode ser ligada com uma cadeia leve kapa ou lambda. Em geral, as cadeias leves e pesadas são ligadas covalentemente entre si e as porções da "cauda" das duas cadeias pesadas são ligadas entre si através de ligações persulfureto covalentes ou ligações não covalentes, quando as

imunoglobulinas são produzidas por hibridomas, células B ou células hospedeiras geneticamente manipuladas. Na cadeia pesada, as sequências de aminoácidos correm do N-terminal nas extremidades bifurcadas da configuração Y para o C-terminal na base de cada cadeia. Os especialistas na técnica entenderão que as cadeias pesadas são classificadas como gama, mu, alfa, delta ou épsilon, ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) com algumas subclasses entre elas (e. g.,  $\gamma_1$ - $\gamma_4$ ). É a natureza desta cadeia que determina a "classe" do anticorpo como IgG, IgM, IgA, IgG ou IgE, respectivamente. As subclasses de imunoglobulina (isotipos), e. g., IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, etc., estão bem caracterizadas e são conhecidas por conferirem especialização funcional. As versões modificadas de cada uma destas classes e isotipos são prontamente discerníveis ao especialista face à presente divulgação e, desta forma, estão no âmbito da presente divulgação.

Como acima indicado, a região variável permite ao anticorpo reconhecer selectivamente e ligar especificamente epitopos em antigénios. Isto é, o domínio V<sub>L</sub> e o domínio V<sub>H</sub> de um anticorpo combinam-se para formar a região variável que define um local de ligação ao antigénio tridimensional. Esta estrutura de anticorpo quaternária, forma o local de ligação ao antigénio, presente na extremidade de cada braço do Y. Mais especificamente, o local de ligação ao antigénio é definido por três regiões determinantes de complementaridade (CDR) em cada uma das cadeias V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub>. Em alguns casos, e. g., determinadas moléculas de imunoglobulina derivadas de espécies camelídeas ou manipuladas com base em imunoglobulinas camelídeas, uma molécula de imunoglobulina completa pode consistir apenas de cadeias pesadas, sem cadeias leves. Ver, e. g., Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993).

Em anticorpos de ocorrência natural, as seis "regiões determinantes de complementaridade" ou "CDR" presentes em cada domínio de ligação ao antígeno são sequências curtas, não contíguas, de aminoácidos que estão especificamente posicionadas para formar o domínio de ligação ao antígeno, à medida que o anticorpo assume a sua configuração tridimensional num ambiente aquoso. Os restantes aminoácidos nos domínios de ligação ao antígeno, referidos como regiões de "estrutura", mostram menos variabilidade intermolecular. As regiões de estrutura adoptam largamente uma conformação de folha  $\beta$  e as CDR formam ansas que ligam, e em alguns casos formam parte, da estrutura de folha  $\beta$ . Assim, as regiões de estrutura actuam de modo a formar uma armação que proporciona o posicionamento das CDR na orientação correcta através de interacções não covalentes, intercadeia. O domínio de ligação ao antígeno formado pelas CDR posicionadas define uma superfície complementar ao epitopo no antígeno imunorreactivo. Esta superfície complementar promove a ligação não covalente de anticorpo ao seu epitopo cognato. Os aminoácidos compreendendo as CDR e as regiões de estrutura, respectivamente, podem ser prontamente identificados através de qualquer região variável de cadeia pesada ou leve dada, por um técnico com conhecimento geral na matéria, uma vez que foram definidas precisamente (ver, "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)).

Em espécies camelídeas, contudo, a região variável da cadeia pesada, referida como  $V_{H}H$ , forma a totalidade da CDR. As principais diferenças entre regiões variáveis de  $V_{H}H$  de camelídeas e aquelas derivadas de anticorpos convencionais ( $V_H$ ) incluem (a) mais aminoácidos hidrofóbicos na superfície de contacto da cadeia leve de  $V_H$  comparativamente à região

correspondente em  $V_{\text{H}}\text{H}$ , (b) uma CDR3 mais longa em  $V_{\text{H}}\text{H}$  e (c) a ocorrência frequente de uma ligação persulfureto entre CDR1 e CDR3 em  $V_{\text{H}}\text{H}$ .

Num exemplo, uma molécula de ligação ao antigénio da divulgação compreende, pelo menos, uma CDR de cadeia pesada ou leve de uma molécula de anticorpo. Noutro exemplo, uma molécula de ligação ao antigénio da divulgação compreende, pelo menos, duas CDR de uma ou mais moléculas de anticorpo. Noutro exemplo, uma molécula de ligação ao antigénio da divulgação compreende, pelo menos, três CDR de uma ou mais moléculas de anticorpo. Noutro exemplo, uma molécula de ligação ao antigénio da divulgação compreende, pelo menos, quatro CDR de uma ou mais moléculas de anticorpo. Noutro exemplo, uma molécula de ligação ao antigénio da divulgação compreende, pelo menos, cinco CDR de uma ou mais moléculas de anticorpo. Noutro exemplo, uma molécula de ligação ao antigénio da divulgação compreende, pelo menos, seis CDR de uma ou mais moléculas de anticorpo. As moléculas de anticorpo exemplificativas compreendendo, pelo menos, uma CDR que podem ser incluídas nas moléculas de ligação ao antigénio em questão são conhecidas na técnica e as moléculas exemplificativas são aqui descritas.

Os anticorpos ou os seus fragmentos imuno-específicos para utilização nos métodos da divulgação incluem, mas não estão limitados a, anticorpos policlonais, monoclonais, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados ou quiméricos, anticorpos de cadeia simples, fragmentos de ligação a epitopo, e. g., Fab, Fab' e F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, Fv de cadeia simples (scFv), anticorpos de cadeia simples, Fv ligados por persulfureto (sdFv), fragmentos compreendendo um domínio  $V_{\text{L}}$  ou  $V_{\text{H}}$ , fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab e anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluindo, e. g.,

anticorpos anti-Id para ligar moléculas aqui divulgadas). As moléculas de ScFv são conhecidas na técnica e são descritas, e. g., na Patente U.S. 5892019. As moléculas de imunoglobulina ou de anticorpo da divulgação podem ser de qualquer tipo (e. g., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (e. g., IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>) ou subclasse de molécula de imunoglobulina.

Os fragmentos de anticorpo, incluindo anticorpos de cadeia simples, podem compreender a região ou regiões variáveis isoladamente ou em combinação com a totalidade ou uma porção do seguinte: região de charneira, domínios C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 e C<sub>H</sub>3. Estão também incluídos na divulgação os fragmentos de ligação ao antígeno também compreendendo qualquer combinação de região ou regiões variáveis com uma região de charneira, domínios C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 e C<sub>H</sub>3. Os anticorpos ou os seus fragmentos imuno-específicos para utilização nos métodos de diagnóstico e terapêuticos aqui divulgados podem ser de qualquer origem animal, incluindo aves e mamíferos. De um modo preferido, os anticorpos são anticorpos de humano, murino, burro, coelho, cabra, cobaio, camelo, lama, cavalo ou galinha. Noutro exemplo, a região variável pode ser de origem condrictoíde (e. g., de tubarões). Como aqui utilizado, anticorpos "humanos" incluem anticorpos que têm a sequência de aminoácidos de um imunoglobulina humana e incluem anticorpos isolados de bibliotecas de imunoglobulinas humanas ou de animais transgênicos para uma ou mais imunoglobulinas humanas e que não expressam imunoglobulinas endógenas, como descrito *infra* e, por exemplo, na Pat. U.S. N° 5939598 de Kucherlapati *et al.*

Como aqui utilizado, a expressão "porção de cadeia pesada" inclui sequências de aminoácidos derivadas de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Um polipéptido compreendendo uma porção de cadeia pesada compreende, pelo menos, um de: um domínio C<sub>H</sub>1, um domínio de charneira (e. g., região de charneira superior, média

e/ou inferior), um domínio C<sub>H2</sub>, um domínio C<sub>H3</sub> ou uma variante ou um seu fragmento. Por exemplo, um polipéptido de ligação pode compreender uma cadeia polipeptídica compreendendo um domínio C<sub>H1</sub>; uma cadeia polipeptídica compreendendo um domínio C<sub>H1</sub>, pelo menos uma porção de um domínio de charneira e um domínio C<sub>H2</sub>; uma cadeia polipeptídica compreendendo um domínio C<sub>H1</sub> e um domínio C<sub>H3</sub>; uma cadeia polipeptídica compreendendo um domínio C<sub>H1</sub>, pelo menos uma porção de um domínio de charneira e um domínio C<sub>H3</sub>, ou uma cadeia polipeptídica compreendendo um domínio C<sub>H1</sub>, pelo menos uma porção de um domínio de charneira, um domínio C<sub>H2</sub> e um domínio C<sub>H3</sub>. Noutro exemplo, um polipéptido da divulgação compreende uma cadeia polipeptídica compreendendo um domínio C<sub>H3</sub>. Além disso, um polipéptido de ligação pode carecer, pelo menos, de uma porção de um domínio C<sub>H2</sub> (e. g., todo ou uma parte de um domínio C<sub>H2</sub>). Como acima apresentado, será entendido por um técnico com conhecimento geral na matéria que estes domínios (e. g., as porções de cadeia pesada) podem ser modificados de modo que variem na sequência de aminoácidos da molécula de imunoglobulina de ocorrência natural.

Em determinados anticorpos antagonistas de Sp35 ou os seus fragmentos imuno específicos para utilização nos métodos de tratamento aqui divulgados, as porções de cadeia pesada de uma cadeia polipeptídica de um multímero são idênticas àquelas numa segunda cadeia polipeptídica do multímero. Alternativamente, os monómeros contendo porção de cadeia pesada não são idênticos. Por exemplo, cada monómero pode compreender um local de ligação ao alvo diferente, formando, por exemplo, um anticorpo biespecífico.

As porções de cadeia pesada de um polipéptido de ligação para utilização nos métodos de diagnóstico e tratamento aqui divulgados, podem ser derivadas de diferentes moléculas de

imunoglobulina. Por exemplo, uma porção de cadeia pesada de um polipéptido pode compreender um domínio  $C_{H1}$  derivado de uma molécula de  $IgG_1$  e uma região de charneira derivada de uma molécula de  $IgG_3$ . Noutro exemplo, uma porção de cadeia pesada pode compreender uma região de charneira derivada, em parte, de uma molécula de  $IgG_1$  e, em parte, de uma molécula de  $IgG_3$ . Noutro exemplo, uma porção de cadeia pesada pode compreender uma charneira quimérica derivada, em parte, de uma molécula de  $IgG_1$  e, em parte, de uma molécula de  $IgG_4$ .

Como aqui utilizado, a expressão "porção de cadeia leve" inclui sequências de aminoácidos derivadas de uma cadeia leve de imunoglobulina. De um modo preferido, a porção de cadeia leve compreende, pelo menos, um domínio  $V_L$  ou  $C_L$ .

Uma molécula isolada de ácido nucleico que codifica uma variante não natural de um polipéptido derivado de uma imunoglobulina (e. g., uma porção de cadeia pesada ou uma porção de cadeia leve de imunoglobulina) pode ser criada por introdução de uma ou mais substituições, adições ou deleções de nucleótido na sequência de nucleótidos da imunoglobulina, de modo que uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácido sejam introduzidas na proteína codificada. As mutações podem ser introduzidas por técnicas convencionais, tais como mutagénesis dirigida e mutagénesis mediada por PCR. De um modo preferido, as substituições conservadoras de aminoácidos são realizadas em um ou mais resíduos de aminoácidos não essenciais.

Os anticorpos ou os seus fragmentos imuno-específicos para utilização nos métodos de tratamento aqui divulgados, podem também ser descritos ou especificados em termos da sua afinidade de ligação a um polipéptido da divulgação. As afinidades de ligação preferidas incluem aquelas com uma constante de

dissociação ou Kd menor que  $5 \times 10^{-2}$  M,  $10^{-2}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M,  $10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$  M,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $10^{-14}$  M,  $5 \times 10^{-15}$  M ou  $10^{-15}$  M.

Os anticorpos ou os seus fragmentos imuno-específicos para utilização nos métodos de tratamento aqui divulgados, actuam como antagonistas de Sp35 como aqui descrito. Por exemplo, um anticorpo pode funcionar como um antagonista, bloqueando ou inibindo a actividade supressora do polipéptido Sp35.

Como aqui utilizado, pela expressão "anticorpo quimérico", entende-se qualquer anticorpo em que a região ou local imunorreactiva é obtida ou derivada de uma primeira espécie e a região constante (que pode ser intacta, parcial ou modificada) é obtida de uma segunda espécie. Em exemplos preferidos, a região ou local de ligação ao alvo será de uma fonte não humana (e. g., murganho ou primata) e a região constante é humana.

Como aqui utilizado, a expressão "anticorpo manipulado" refere-se a um anticorpo em que o domínio variável na cadeia pesada ou leve ou em ambas é alterado por, pelo menos, substituição parcial de uma ou mais CDR de um anticorpo de especificidade conhecida e, se necessário, por substituição parcial da região de estrutura e alteração de sequência. Embora as CDR possam ser derivadas de um anticorpo da mesma classe, ou mesmo subclasse, que o anticorpo do qual as regiões de estrutura são derivadas, está contemplado que as CDR serão derivadas de um anticorpo de classe diferente e, de um modo preferido, de um anticorpo de uma espécie diferente. Um anticorpo manipulado em que uma ou mais CDR "dadoras" de um anticorpo não humano de especificidade conhecida é enxertado numa região de estrutura de



cadeia pesada ou leve humana é aqui referido como um "anticorpo humanizado". Pode não ser necessário substituir todas as CDR com as CDR completas da região variável dadora para transferir a capacidade de ligação ao antigénio de um domínio variável para outro. Mais exactamente, pode apenas ser necessário transferir aqueles resíduos que são necessários para manter a actividade do local de ligação ao alvo. Dadas as explicações apresentadas em, e. g., Pat. U.S. N° 5585089, 5693761, 5693762 e 6180370, estará bem dentro da competência dos especialistas na técnica, por realização de experimentação de rotina ou por tentativa e erro, obter um anticorpo humanizado ou manipulado funcional.

Como aqui utilizado, os termos "ligado", "fundido" ou "fusão" são utilizados indistintamente. Estes termos referem-se à ligação conjunta de dois mais elementos ou componentes, por quaisquer meios incluindo conjugação química ou meios recombinantes. Uma "fusão em-grelha" refere-se à ligação de duas ou mais grelhas da leitura aberta (ORF) para formar uma ORF contínua mais longa, de um modo que mantenha a grelha de leitura correcta das ORF originais. Assim, a proteína de fusão recombinante resultante é uma única proteína contendo dois ou mais segmentos que correspondem a polipéptidos codificados pelas ORF originais (cujos segmentos não estão normalmente assim ligados na natureza). Embora a grelha de leitura seja assim tornada contínua ao longo dos segmentos fundidos, os segmentos podem estar física ou espacialmente separados, por exemplo, através de uma sequência ligante em-grelha.

No contexto de polipéptidos, uma "sequência linear" ou uma "sequência" é uma ordem de aminoácidos num polipéptido no sentido do terminal amino para carboxilo em que resíduos vizinhos na sequência estão contíguos na estrutura primária do polipéptido.

Como aqui utilizado, o termo “expressão” refere-se a um processo através do qual um gene produz um produto bioquímico, por exemplo, um ARN ou polipéptido. O processo inclui qualquer manifestação da presença funcional do gene dentro da célula incluindo, sem limitação, inativação génica, assim como expressão transiente e expressão estável. Inclui, sem limitação, transcrição do gene em ARN mensageiro (ARNm), ARN de transferência (tARN), ARN de gancho-de-cabelo pequeno (shARN), ARN de interferência pequeno (siARN) ou qualquer outro produto de ARN e a tradução de tal ARNm em polipéptido(s). Se o produto final desejado for bioquímico, a expressão inclui a criação do produto bioquímico e quaisquer precursores.

Por “indivíduo” ou “individual” ou “animal” ou “doente” ou “mamífero” entende-se qualquer indivíduo, particularmente um indivíduo mamífero, para o qual é desejado diagnóstico, prognóstico ou terapia. Os indivíduos mamíferos incluem, mas não estão limitados a, humanos, animais domésticos, animais de criação, animais de jardim zoológico, animais desportivos, animais de estimação, tais como cães, gatos, cobaios, coelhos, ratos, murganhos, cavalos, gado bovino, vacas; primatas, tais como símios, macacos, orangotangos e chimpanzés; canídeos, tais como cães e lobos; felídeos, tais como gatos, leões e tigres; equídeos, tais como cavalos, burros e zebras; animais para alimentação, tais como vacas, porcos e ovelhas; ungulados, tais como veados e girafas; roedores, tais como murganhos, ratos, hamsters e cobaios; e assim por diante. Em determinados exemplos, o mamífero é um indivíduo humano.

O termo “ARN de interferência” ou “ARNi” refere-se ao silenciamento ou diminuição da expressão génica por siARN. É o processo de silenciamento génico pós-transcrição, específico de sequência, em animais e plantas, iniciado por siARN que é

homólogo na sua região duplex à sequência do gene silenciado. O gene pode ser endógeno ou exógeno ao organismo, presente integrado num cromossoma ou presente num vector de transfecção que não está integrado no genoma. A expressão do gene é totalmente ou parcialmente inibida. O ARNi pode também ser considerado para inibir a função de um ARN alvo; a função do ARN alvo pode ser completa ou parcial.

#### Sp35 (LINGO-1/LRRN6)

A divulgação é baseada na verificação de que os antagonistas de Sp35 aumentam o número de oligodendrócitos através da promoção da sua sobrevivência, proliferação e diferenciação. Além disso, a requerente verificou que os antagonistas de Sp35 promovem a mielinização de neurónios. Sem se pretender estar limitado pela teoria, parece que a actividade promotora de mielinização produzida por antagonistas de Sp35 está separada dos efeitos na proliferação de oligodendrócitos.

O Sp35 humano de ocorrência natural é uma proteína glicosilada, específica do sistema nervoso, consistindo de 614 aminoácidos (FIG. 1; SEQ ID N°: 2). O polipéptido Sp35 humano contém um domínio LRR consistindo de 14 repetições ricas em leucina (incluindo Cap no N- e C-terminal), um domínio de Ig, uma região transmembranar e um domínio citoplasmático (FIG. 2). O domínio citoplasmático contém um local de fosforilação de tirosina canónico. Além disso, a proteína Sp35 de ocorrência natural contém uma sequência de sinal, uma curta região básica entre LRRCT e o domínio de Ig, e uma região transmembranar entre o domínio de Ig e o domínio citoplasmático (FIG. 2). O gene Sp35 humano contém codões de iniciação de tradução alternativos, de modo que seis aminoácidos adicionais (MQVSKR; SEQ ID N°: 5)

podem ou não estar presentes no N-terminal da sequência de sinal de Sp35. A Tabela 1 lista os domínios de Sp35 e outras regiões, de acordo com o número do resíduo de aminoácido, com base na sequência na FIG. 1.

**Tabela 1**

<b>Domínio ou Região</b>	<b>Resíduo Inicial</b>	<b>Resíduo Final</b>
Sequência de 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	263	414 ou 416
Básico	415 ou 417	424
Ig	419	493
Sequência de ligação	494	551
Transmembranar	552	576
Citoplasmático	577	614

A distribuição no tecido e a expressão de desenvolvimento de Sp35 foram estudados em humanos e ratos. A biologia de Sp35 foi estudada num modelo de animal experimental (rato). A expressão de Sp35 de rato está localizada em neurónios do sistema nervoso e oligodendrócitos do cérebro, como determinado por transferência de Northern e coloração imuno-histoquímica. O nível de expressão do ARNm de Sp35 em rato é regulado em termos de desenvolvimento, atingindo o pico logo após o nascimento, *i. e.*, cerca do dia um pós-nascimento. Num modelo de lesão transeccional da espinha dorsal de rato, o Sp35 é regulado positivamente no local de lesão, como determinado por RT-PCR. Além disso, foi demonstrado que o Sp35 interage com o Receptor Nogo66 (receptor Nogo). Ver, *e. g.*, Pedido de Patente Internacional N° PCT/LJS2004/00832. Contudo, o receptor-1 Nogo não é expresso em oligodendrócitos e qualquer impacto de Sp35 na biologia do oligodendrócito deve ocorrer através de uma via independente do receptor Nogo.

#### Utilização Médica de Antagonistas de Sp35

Um exemplo da presente divulgação proporciona métodos para tratamento de uma doença, distúrbio ou lesão associada com dismielinização ou desmielinização, *e. g.*, esclerose múltipla num animal que sofre de tal doença, cujo o método compreende, consiste essencialmente ou consiste da administração ao animal, de uma quantidade eficaz de um antagonista de Sp35 seleccionado do grupo consistindo de um polipéptido Sp35 solúvel, um anticorpo de Sp35 e um polinucleótido do antagonista de Sp35.

Adicionalmente, a divulgação é dirigida a um método para promover a mielinização de neurónios num mamífero compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo da administração de

uma quantidade terapêuticamente eficaz de um antagonista de Sp35 seleccionado do grupo consistindo de um polipéptido Sp35 solúvel, um anticorpo de Sp35 e um polinucleótido do antagonista de Sp35.

Um exemplo adicional da presente divulgação proporciona métodos para tratamento de uma doença, distúrbio ou lesão associada com a morte de oligodendrócitos ou perda de diferenciação, e. g., esclerose múltipla, doença de Pelizaeus-Merzbacher ou leucodistrofia da célula globóide (doença de Krabbe), num animal que sofre de tal doença, cujo método compreende, consiste essencialmente ou consiste da administração ao animal, de uma quantidade eficaz de um antagonista de Sp35 seleccionado do grupo consistindo de um polipéptido Sp35 solúvel, um anticorpo de Sp35 e um polinucleótido do antagonista de Sp35.

Outro aspecto da divulgação inclui um método para promover a proliferação, diferenciação e sobrevivência de oligodendrócitos num mamífero compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo da administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um antagonista de Sp35 seleccionado do grupo consistindo de um polipéptido Sp35 solúvel, um anticorpo de Sp35 e um polinucleótido do antagonista de Sp35.

Um antagonista de Sp35, e. g., um polipéptido Sp35 solúvel, um anticorpo de Sp35 ou um polinucleótido do antagonista de Sp35, para ser utilizado nos métodos de tratamento aqui divulgados, pode ser preparado e utilizado como um agente terapêutico que pára, reduz, previne ou inibe a capacidade de Sp35 para regular negativamente a mielinização de neurónios por oligodendrócitos. Adicionalmente, o antagonista de Sp35 a ser utilizado nos métodos de tratamento aqui divulgados pode ser

preparado e utilizado como um agente terapêutico que pára, reduz, previne ou inibe a capacidade de Sp35 para regular negativamente a diferenciação, proliferação e sobrevivência dos oligodendrócitos.

Exemplos adicionais da divulgação incluem um método de indução da proliferação ou sobrevivência de oligodendrócitos para tratar uma doença, distúrbio ou lesão que envolve a destruição de oligodendrócitos ou mielina compreendendo a administração a um mamífero, no local da doença, distúrbio ou lesão, ou perto deste, de uma quantidade suficiente para reduzir a inibição da extensão axonal e promover a mielinização.

Nos métodos da presente divulgação, um antagonista de Sp35 pode ser administrado por administração directa de um polipéptido Sp35 solúvel, anticorpo de Sp35 ou polinucleótido do antagonista de Sp35 ao doente. Alternativamente, o antagonista de Sp35 pode ser administrado por um vector de expressão que produz o antagonista de Sp35 específico. Em determinados exemplos da divulgação, um antagonista de Sp35 é administrado num método de tratamento que inclui: (1) transformar ou transfectar uma célula hospedeira implantável com um ácido nucleico, e. g., um vector que expresse um antagonista de Sp35; e (2) implantar a célula hospedeira transformada num mamífero, no local de uma doença, distúrbio ou lesão. Por exemplo, a célula hospedeira transformada pode ser implantada no local de uma lesão crónica de EM. Em alguns exemplos da divulgação, a célula hospedeira implantável é removida de um mamífero, temporariamente cultivada, transformada ou transfectada com um ácido nucleico isolado que codifica um antagonista de Sp35, e implantada de volta no mesmo mamífero ao qual foi removida. A célula pode ser, mas não é requerido que seja, removida do mesmo local em que é implantada. Tais exemplos, por vezes conhecidos

como terapia génica *ex vivo*, podem proporcionar uma fonte contínua do antagonista de Sp35, localizada no local de acção, por um período de tempo limitado.

As doenças ou distúrbios que podem ser tratadas ou melhoradas pelos métodos da presente divulgação incluem doenças, distúrbios ou lesões que se relacionam com a dismielinização ou desmielinização de neurónios de mamíferos. Especificamente, doenças e distúrbios em que a mielina que circunda o neurónio está ausente, incompleta, não formada correctamente ou está a deteriorar-se. Tal doença inclui, mas não está limitada a, esclerose múltipla (EM), incluindo formas progressivas primárias e progressivas secundárias, recorrente remitente de EM; leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP), encefalomielite (EPL), mielinólise pontina central (MPC), adrenoleucodistrofia, doença de Alexander, doença de Pelizaeus-Merzbacher (PMZ), leucodistrofia da célula globóide (doença de Krabbe), degeneração Walleriana, neurite óptica e mielite transversa.

As doenças ou distúrbios que podem ser tratadas ou melhoradas pelos métodos da presente divulgação incluem doenças, distúrbios ou lesões que se relacionam com a morte ou ausência de proliferação ou diferenciação dos oligodendrócitos. Tal doença inclui, mas não está limitada a, esclerose múltipla (EM), leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP), encefalomielite (EPL), mielinólise pontina central (MPC), adrenoleucodistrofia, doença de Alexander, doença de Pelizaeus-Merzbacher (PMZ), leucodistrofia da célula globóide (doença de Krabbe) e degeneração Walleriana.

As doenças ou distúrbios que podem ser tratados ou melhorados pelos métodos da presente divulgação, incluem doenças ou distúrbios neurodegenerativas. Tais doenças incluem, mas não



estão limitadas a, esclerose lateral amiotrófica, doença de Huntington, doença de Alzheimer e doença de Parkinson.

Os exemplos de doenças, distúrbios ou lesões adicionais que podem ser tratados ou melhorados pelos métodos da presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, lesões da espinha dorsal, mielopatia ou radiculopatia crônica, lesão cerebral traumática, doença do neurônio motor, deformação, contusão, parálise, lesão pós-irradiação axonal ou outras complicações neurológicas da quimioterapia, acidente vascular cerebral, grandes lacunas, oclusões de vasos médios a grandes, leucorrose, neuropatia óptica isquêmica aguda, deficiência de vitamina E (síndrome de deficiência isolada, AR, síndrome de Bassen-Kornzweig), B12, B6 (piridoxina - pelagra), tiamina, folato, deficiência de ácido nicotínico, síndrome de Marchiafava-Bignami, leucodistrofia metacromática, nevralgia do trigêmeo, paralisia de Bell ou qualquer lesão neuronal que requeira regeneração axonal, re-mielinização ou sobrevivência ou diferenciação/proliferação de oligodendrócitos.

#### Polipéptidos Sp35 Solúveis

Os antagonistas de Sp35 da presente divulgação incluem aqueles polipéptidos que bloqueiam, inibem ou interferem com a função biológica de Sp35 de ocorrência natural. Especificamente, os polipéptidos Sp35 solúveis da presente divulgação incluem fragmentos, variantes ou os seus derivados de um polipéptido Sp35 solúvel. A Tabela 1 acima descreve os vários domínios do polipéptido Sp35. Os polipéptidos Sp35 solúveis carecem dos domínios intracelulares e transmembranares do polipéptido Sp35. Por exemplo, determinados polipéptidos Sp35 solúveis carecem dos aminoácidos 552-576 que compreendem o domínio transmembranar de

Sp35 e/ou dos aminoácidos 577-614 que compreendem o domínio intracelular de Sp35. Adicionalmente, determinados polipéptidos Sp35 solúveis compreendem os domínios LRR, domínio de Ig, região básica e/ou a totalidade do domínio extracelular (correspondente aos aminoácidos 34 a 532 da SEQ ID N°: 2) do polipéptido Sp35. Como um especialista na técnica entenderá, a totalidade do domínio extracelular de Sp35 pode compreender mais ou poucos aminoácidos na extremidade do C-terminal ou N-terminal do polipéptido do domínio extracelular. Como tal, os polipéptidos Sp35 solúveis para utilização nos métodos da presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo de aminoácidos 41 a 525 da SEQ ID N°: 2; 40 a 526 da SEQ ID N°: 2; 39 a 527 da SEQ ID N°: 2; 38 a 528 da SEQ ID N°: 2; 37 a 529 da SEQ ID N°: 2; 36 a 530 da SEQ ID N°: 2; 35 a 531 da SEQ ID N°: 2; 34 a 531 da SEQ ID N°: 2; 46 a 520 da SEQ ID N°: 2; 45 a 521 da SEQ ID N°: 2; 44 a 522 da SEQ ID N°: 2; 43 a 523 da SEQ ID N°: 2; e 42 a 524 da SEQ ID N°: 2 ou fragmentos, variantes ou derivados de tais polipéptidos. Os antagonistas do polipéptido Sp35 podem incluir qualquer combinação de domínios como descrito na Tabela 1.

Os polipéptidos Sp35 solúveis adicionais para utilização nos métodos da presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo dos aminoácidos 1 a 33 da SEQ ID N°: 2; 1 a 35 da SEQ ID N°: 2; 34 a 64 da SEQ ID N°: 2; 36 a 64 da SEQ ID N°: 2; 66 a 89 da SEQ ID N°: 2; 90 a 113 da SEQ ID N°: 2; 114 a 137 da SEQ ID N°: 2; 138 a 161 da SEQ ID N°: 2; 162 a 185 da SEQ ID N°: 2; 186 a 209 da SEQ ID N°: 2; 210 a 233 da SEQ ID N°: 2; 234 a 257 da SEQ ID N°: 2; 258 a 281 da SEQ ID N°: 2; 282 a 305 da SEQ ID N°: 2; 306 a 329 da SEQ ID N°: 2; 330 a 353 da SEQ ID N°: 2; 363 a 416 da

SEQ ID N°: 2; 417 a 424 da SEQ ID N°: 2; 419 a 493 da SEQ ID N°: 2; e 494 a 551 da SEQ ID N°: 2 ou fragmentos, variantes ou derivados de tais polipéptidos.

Os polipéptidos Sp35 solúveis adicionais para utilização nos métodos da presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo dos aminoácidos 1 a 33 da SEQ ID N°: 2; 1 a 35 da SEQ ID N°: 2; 1 a 64 da SEQ ID N°: 2; 1 a 89 da SEQ ID N°: 2; 1 a 113 da SEQ ID N°: 2; 1 a 137 da SEQ ID N°: 2; 1 a 161 da SEQ ID N°: 2; 1 a 185 da SEQ ID N°: 2; 1 a 209 da SEQ ID N°: 2; 1 a 233 da SEQ ID N°: 2; 1 a 257 da SEQ ID N°: 2; 1 a 281 da SEQ ID N°: 2; 1 a 305 da SEQ ID N°: 2; 1 a 329 da SEQ ID N°: 2; 1 a 353 da SEQ ID N°: 2; 1 a 416 da SEQ ID N°: 2; 1 a 424 da SEQ ID N°: 2; 1 a 493 da SEQ ID N°: 2; 1 a 551 da SEQ ID N°: 2; 1 a 531 da SEQ ID N°: 2 e 1 a 532 da SEQ ID N°: 2 ou fragmentos, variantes ou derivados de tais polipéptidos.

Ainda mais polipéptidos Sp35 solúveis para utilização nos métodos da presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo dos aminoácidos 34 a 64 da SEQ ID N°: 2; 34 a 89 da SEQ ID N°: 2; 34 a 113 da SEQ ID N°: 2; 34 a 137 da SEQ ID N°: 2; 34 a 161 da SEQ ID N°: 2; 34 a 185 da SEQ ID N°: 2; 34 a 209 da SEQ ID N°: 2; 34 a 233 da SEQ ID N°: 2; 34 a 257 da SEQ ID N°: 2; 34 a 281 da SEQ ID N°: 2; 34 a 305 da SEQ ID N°: 2; 34 a 329 da SEQ ID N°: 2; 34 a 353 da SEQ ID N°: 2; 34 a 416 da SEQ ID N°: 2; 34 a 424 da SEQ ID N°: 2; 34 a 493 da SEQ ID N°: 2; e 34 a 551 da SEQ ID N°: 2 ou fragmentos, variantes ou derivados de tais polipéptidos.

Os polipéptidos Sp35 solúveis adicionais para utilização nos métodos da presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo dos aminoácidos 34 a 530 da SEQ ID N°: 2; 34 a 531 da SEQ ID N°: 2; 34 a 532 da SEQ ID N°: 2; 34 a 533 da SEQ ID N°: 2; 34 a 534 da SEQ ID N°: 2; 34 a 535 da SEQ ID N°: 2; 34 a 536 da SEQ ID N°: 2; 34 a 537 da SEQ ID N°: 2; 34 a 538 da SEQ ID N°: 2; 34 a 539 da SEQ ID N°: 2; 30 a 532 da SEQ ID N°: 2; 31 a 532 da SEQ ID N°: 2; 32 a 532 da SEQ ID N°: 2; 33 a 532 da SEQ ID N°: 2; 34 a 532 da SEQ ID N°: 2; 35 a 532 da SEQ ID N°: 2; 36 a 532 da SEQ ID N°: 2; 30 a 531 da SEQ ID N°: 2; 31 a 531 da SEQ ID N°: 2; 32 a 531 da SEQ ID N°: 2; 33 a 531 da SEQ ID N°: 2; 34 a 531 da SEQ ID N°: 2; 35 a 531 da SEQ ID N°: 2; e 36 a 531 da SEQ ID N°: 2 ou fragmentos, variantes ou derivados de tais polipéptidos.

Ainda mais polipéptidos Sp35 solúveis para utilização nos métodos da presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo dos aminoácidos 36 a 64 da SEQ ID N°: 2; 36 a 89 da SEQ ID N°: 2; 36 a 113 da SEQ ID N°: 2; 36 a 137 da SEQ ID N°: 2; 36 a 161 da SEQ ID N°: 2; 36 a 185 da SEQ ID N°: 2; 36 a 209 da SEQ ID N°: 2; 36 a 233 da SEQ ID N°: 2; 36 a 257 da SEQ ID N°: 2; 36 a 281 da SEQ ID N°: 2; 36 a 305 da SEQ ID N°: 2; 36 a 329 da SEQ ID N°: 2; 36 a 353 da SEQ ID N°: 2; 36 a 416 da SEQ ID N°: 2; 36 a 424 da SEQ ID N°: 2; 36 a 493 da SEQ ID N°: 2; e 36 a 551 da SEQ ID N°: 2 ou fragmentos, variantes ou derivados de tais polipéptidos.

Os polipéptidos Sp35 solúveis adicionais para utilização nos métodos da presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo dos aminoácidos 36 a 530 da SEQ ID N°: 2; 36 a 531 da SEQ ID N°: 2; 36 a 532 da SEQ ID N°: 2; 36 a 533 da SEQ ID N°: 2; 36 a 534 da SEQ ID N°: 2; 36 a 535 da SEQ ID N°: 2; 36 a 536 da SEQ ID N°: 2; 36 a 537 da SEQ ID N°: 2; 36 a 538 da SEQ ID N°: 2; e 36 a 539 da SEQ ID N°: 2; ou fragmentos, variantes ou derivados de tais polipéptidos.

Os polipéptidos Sp35 solúveis adicionais, seus fragmentos, variantes ou derivados incluem polipéptidos compreendendo o domínio de Ig de Sp35. Por exemplo, um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo de aminoácidos 417 a 493 da SEQ ID N°: 2; 417 a 494 da SEQ ID N°: 2; 417 a 495 da SEQ ID N°: 2; 417 a 496 da SEQ ID N°: 2; 417 a 497 da SEQ ID N°: 2; 417 a 498 da SEQ ID N°: 2; 417 a 499 da SEQ ID N°: 2; 417 a 500 da SEQ ID N°: 2; 417 a 492 da SEQ ID N°: 2; 417 a 491 da SEQ ID N°: 2; 412 a 493 da SEQ ID N°: 2; 413 a 493 da SEQ ID N°: 2; 414 a 493 da SEQ ID N°: 2; 415 a 493 da SEQ ID N°: 2; 416 a 493 da SEQ ID N°: 2; 411 a 493 da SEQ ID N°: 2; 410 a 493 da SEQ ID N°: 2; 410 a 494 da SEQ ID N°: 2; 411 a 494 da SEQ ID N°: 2; 412 a 494 da SEQ ID N°: 2; 413 a 494 da SEQ ID N°: 2; 414 a 494 da SEQ ID N°: 2; 415 a 494 da SEQ ID N°: 2; 416 a 494 da SEQ ID N°: 2; 417 a 494 da SEQ ID N°: 2; e 418 a 494 da SEQ ID N°: 2 ou fragmentos, variantes ou derivados de tais polipéptidos.

Os polipéptidos Sp35 solúveis adicionais para utilização nos métodos da presente divulgação incluem um polipéptido Sp35

compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo de péptidos do domínio de Ig de Sp35 ou fragmentos, variantes ou derivados de tais polipéptidos. Especificamente, polipéptidos compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo das seguintes sequências polipeptídicas: ITX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> (SEQ ID N°: 6), ACX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> (SEQ ID N°: 7), VCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> (SEQ ID N°: 8) e SPX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> (SEQ ID N°: 9) onde X<sub>1</sub> é lisina, arginina, histidina, glutamina, ou asparagina, X<sub>2</sub> é lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina e X<sub>3</sub> é lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina. Por exemplo, os péptidos do antagonista do domínio de Ig de Sp35 incluem um polipéptido compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo das seguintes sequências polipeptídicas: SPRKH (SEQ ID N°: 10), SPRKK (SEQ ID N°: 11), SPRKR (SEQ ID N°: 12), SPKKH (SEQ ID N°: 13), SPHKH (SEQ ID N°: 14), SPRRH (SEQ ID N°: 15), SPRHH (SEQ ID N°: 16), SPRRR (SEQ ID N°: 17), SPHHH (SEQ ID N°: 18) SPKKK (SEQ ID N°: 19), LSPRKH (SEQ ID N°: 61), LSPRKK (SEQ ID N°: \_), LSPRKR (SEQ ID N°: \_), LSPKKH (SEQ ID N°: \_), LSPHKH (SEQ ID N°: \_), LSPRRH (SEQ ID N°: \_), LSPRHH (SEQ ID N°: \_), LSPRRR (SEQ ID N°: \_), LSPHHH (SEQ ID N°: \_) LSPKKK (SEQ ID N°: \_), WLSPRKH (SEQ ID N°: \_), WLSPRKK (SEQ ID N°: \_), WLSPRKR (SEQ ID N°: \_), WLSPKKH (SEQ ID N°: \_), WLSPHKH (SEQ ID N°: \_), WLSPRRH (SEQ ID N°: \_), WLSPRHH (SEQ ID N°: \_), WLSPRRR (SEQ ID N°: \_), WLSPHHH (SEQ ID N°: \_) WLSPKKK (Id SEQ N°: \_). Estes polipéptidos Sp35 solúveis incluem a "ansa RKH" básico (aminoácidos 456-458 de Arginina-Lisina-Histidina) no domínio de Ig de Sp35. Pensa-se que este tripéptido básico seja importante para ligação do polipéptido do antagonista de Sp35 solúvel ao polipéptido Sp35 nativo. Os péptidos Sp35 solúveis adicionais que incluem um tripéptido básico são ITPKRR (SEQ ID N°: 20), ACHHK (SEQ ID N°: 21) e VCHHK (SEQ ID N°: 22).

Os polipéptidos Sp35 solúveis adicionais para utilização nos métodos da presente divulgação incluem um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo de péptidos do domínio de Ig de Sp35 ou fragmentos, variantes ou derivados de tais polipéptidos. Especificamente, péptidos compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo das seguintes sequências polipeptídicas: X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>RKH (SEQ ID N°: 23), X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>RRR (SEQ ID N°: 24), X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>KK (SEQ ID N°: 25), X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>HHH (SEQ ID N°: 26), X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>RKK (SEQ ID N°: 27), X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>RKR (SEQ ID N°: 28), X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>KKH (SEQ ID N°: 29), X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>HKH (SEQ ID N°: 30), X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>RRH (SEQ ID N°: 31) e X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>RHH (SEQ ID N°:32) onde X<sub>4</sub> é qualquer aminoácido e X<sub>5</sub> é aminoácido.

Noutros exemplos, os polipéptidos Sp35 solúveis para utilização nos métodos da presente divulgação incluem um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo de péptidos do domínio de Ig de Sp35 ou fragmentos, variantes ou derivados de tais polipéptidos. Especificamente, polipéptidos compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo das seguintes sequências polipeptídicas: ITX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub> (SEQ ID N°: 68), ACX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub> (SEQ ID N°: 69), VCX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub> (SEQ ID N°: 70) e SPX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub> (SEQ ID N°: 71) onde X<sub>6</sub> é lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina, X<sub>7</sub> é qualquer aminoácido e X<sub>8</sub> é lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina. Por exemplo, os péptidos do antagonista do domínio Ig de Sp35 incluem um polipéptido compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo da seguinte sequência polipeptídica: SPRLH (SEQ ID N°:72).

Noutros exemplos da presente divulgação, os polipéptidos Sp35 solúveis para utilização nos métodos da presente divulgação incluem um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo dos péptidos que contêm

aminoácidos 452-458 no domínio de Ig de Sp35, ou os seus derivados, em que o aminoácido 452 é um resíduo de triptofano ou fenilalanina.

Os polipéptidos Sp35 solúveis adicionais para utilização nos métodos da presente divulgação incluem um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo de péptidos do domínio básico de Sp35. Especificamente, péptidos compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo das seguintes sequências polipeptídicas: RRARIRDRK (SEQ ID N°: 33), KVKVKEKR (SEQ ID N°: 34), RRLRLRDRK (SEQ ID N°: 35), RRGGRDRK (SEQ ID N°: 36) e RRIRARDRK (SEQ ID N°: 37).

Os vários polipéptidos Sp35 solúveis exemplificativos e métodos e materiais para obter estas moléculas para realizar a presente divulgação são descritos abaixo e/ou podem ser encontrados, e. g., no Pedido de Patente Internacional N° PCT/US2004/008323.

Os polipéptidos Sp35 solúveis para utilização nos métodos da presente divulgação aqui descritos podem ser cíclicos. A ciclização dos polipéptidos Sp35 solúveis reduz a liberdade conformacional de péptidos lineares e resulta numa molécula estruturalmente mais estrangida. Muitos métodos de ciclização peptídica são conhecidos na técnica. Por exemplo, ciclização "estrutura para estrutura" através da formação de uma ligação amida entre os resíduos aminoacídicos do N-terminal e C-terminal do péptido. O método de ciclização "estrutura para estrutura" inclui a formação de pontes persulfureto entre dois resíduos aminoacídicos  $\omega$ -tio (e. g., cisteína, homocisteína). Determinados péptidos Sp35 solúveis da presente divulgação incluem modificações no N- e C-terminal do péptido para formar um polipéptido Sp35 cíclico. Tais modificações incluem, mas não



estão limitadas, aos resíduos de cisteína, resíduos de cisteína acetilados, resíduos de cisteína com uma unidade NH<sub>2</sub> e biotina. Outros métodos de ciclização peptídica são descritos em Li & Roller. *Curr. Top. Med. Chem.* 3: 325–341 (2002).

Os polipéptidos Sp35 cíclicos para utilização nos métodos da presente divulgação aqui descritos incluem, mas não estão limitados a, C<sub>1</sub>LSPX<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>C<sub>2</sub> (SEQ ID N°:\_) onde X<sub>1</sub> é lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina, X<sub>2</sub> é lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina, X<sub>3</sub> é lisina, arginina, histidina, glutamina ou asparagina, C<sub>1</sub> tem opcionalmente uma unidade ligada para promover a ciclização (e. g., um grupo acetilo ou biotina) e C<sub>2</sub> tem opcionalmente uma unidade ligada para promover a ciclização (e. g., uma unidade NH<sub>2</sub>).

Os polipéptidos Sp35 solúveis aqui descritos podem ter várias alterações, tais como substituições, inserções ou deleções. Por exemplo, as substituições incluem, mas não estão limitadas, às seguintes substituições: valina na posição 6 do polipéptido Sp35 da SEQ ID N°: 2 para metionina; serina na posição 294 do polipéptido Sp35 da SEQ ID N°: 2 para glicina; valina na posição 348 do polipéptido Sp35 da SEQ ID N°: 2 para alanina; arginina na posição 419 do polipéptido Sp35 para histidina; arginina na posição 456 para ácido glutâmico; e histidina na posição 458 da SEQ ID N°:2 para valina.

Estão também contemplados fragmentos correspondentes de polipéptidos Sp35 solúveis, pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% idênticos aos polipéptidos da SEQ ID N°: 2 aqui descritos.

Como conhecido na técnica, a "identidade de sequência" entre dois polipéptidos é determinada por comparação da sequência de aminoácidos de um polipéptido com a sequência de um segundo polipéptido. Quando aqui discutido, pode ser determinado se qualquer polipéptido particular é, pelo menos, cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% idêntico a um outro, utilizando métodos e programas de computador/software conhecidos na técnica, tais como, mas não limitados a, Programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, versão 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Science Drive 575, Madison, WI 53711). BESTFIT utiliza 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. Ao utilizar BESTFIT ou qualquer outro programa de alinhamento de sequências para determinar se uma sequência particular é, por exemplo, 95% idêntica a uma sequência de referência, de acordo com a presente divulgação, os parâmetros são estabelecidos, naturalmente, de modo que a percentagem de identidade seja calculada ao longo do tamanho total da sequência polipeptídica de referência e que sejam permitidas lacunas em homologia até 5% do número total de aminoácidos na sequência da referência.

Os polipéptidos Sp35 solúveis para utilização nos métodos da presente divulgação podem incluir qualquer combinação de dois ou mais polipéptidos Sp35 solúveis.

#### Anticorpos ou os Seus Fragmentos Imuno-específicos

Os antagonistas de Sp35 para utilização nos métodos da presente divulgação também incluem anticorpos específicos de Sp35 ou fragmentos, variantes de ligação ao antigénio, ou

derivados que são antagonistas da actividade de Sp35. Por exemplo, a ligação de determinados anticorpos de Sp35 a Sp35, como expresso em oligodendrócitos, bloqueia a inibição do crescimento ou diferenciação dos oligodendrócitos, ou bloqueia a desmielinização ou dismielinização de neurónios do SNC.

Determinados anticorpos antagonistas para utilização nos métodos aqui descritos, ligam-se especificamente ou de um modo preferido a um fragmento ou domínio particular do polipéptido Sp35. Tais fragmentos do polipéptido Sp35 incluem, mas não estão limitados a, um polipéptido Sp35 compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo dos aminoácidos 34 a 532; 34 a 417, 34 a 425, 34 a 493, 66 a 532, 66 a 417 (domínio LRR), 66 a 426, 66 a 493, 66 a 532, 417 a 532, 417 a 425 (a região básica de Sp35), 417 a 424 (a região básica de Sp35), 417 a 493, 417 a 532, 419 a 493 (a região Ig de Sp35) ou 425 a 532 da SEQ ID N°: 2 ou um polipéptido 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 Ig de Sp35) ou 425 a 532 da SEQ ID N°:2.

Os fragmentos adicionais do péptido Sp35, aos quais determinados anticorpos específicos de Sp35, ou fragmentos, variantes de ligação ao antigénio, ou os seus derivados da presente divulgação incluem, mas não estão limitados, àqueles fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo de uma ou mais repetições ricas em leucina (LRR) de Sp35. Tais fragmentos incluem, por exemplo, fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo dos 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 N°: 2. Estão também contemplados fragmentos correspondentes de um polipéptido 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 N°: 2.

Os fragmentos do péptido Sp35 adicionais, aos quais determinados anticorpos, ou fragmentos, variantes de ligação ao antigénio, ou os seus derivados da presente divulgação incluem, mas não estão limitados, àqueles fragmentos compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo de uma ou mais regiões ricas em cisteína que flanqueiam a LRR de Sp35. Tais fragmentos, incluem, por exemplo, um fragmento compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo dos aminoácidos 34 a 64 da SEQ ID N°: 2 (a região que flanqueia LRR N-terminal (LRRNT)), ou um fragmento compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo de aminoácidos 363 a 416 da SEQ ID N°: 2 (a região que flanqueia LRR C-terminal (LRRCT)). Estão também contemplados fragmentos correspondentes de um polipéptido Sp35 variante, pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% idêntico aos aminoácidos 34 a 64 e 363 a 416 da SEQ ID N°: 2.

Noutros exemplos, a presente divulgação inclui um anticorpo, ou fragmento, variante de ligação ao antigénio, ou os seus derivados que se ligam especificamente ou de um modo preferido a, pelo menos, um epitopo de Sp35, em que o epitopo compreende, consiste essencialmente ou consiste de, pelo menos, cerca de quatro a cinco aminoácidos da SEQ ID N°: 2, pelo menos sete, pelo menos nove ou entre, pelo menos, cerca de 15 a cerca de 30 aminoácidos da SEQ ID N°: 2. Os aminoácidos de um determinado epitopo da SEQ ID N°: 2 como descrito, podem ser, mas não necessitam ser, contíguos ou lineares. Em determinados exemplos,

o, pelo menos um, epitopo de Sp35 compreende, consiste essencialmente ou consiste de um epitopo não linear, formado pelo domínio extracelular de Sp35 como expresso na superfície de uma célula ou como um fragmento solúvel, e. g., fundido a uma região Fc de IgG. Assim, em determinadas exemplos o, pelo menos um, epitopo de Sp35 compreende, consiste essencialmente ou consiste de, 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 N°: 2, em que os aminoácidos não contíguos formam um epitopo através de enrolamento proteico.

Noutros exemplos, a presente divulgação inclui um anticorpo, ou fragmento, variantes de ligação ao antigénio, ou os seus derivados que se ligam especificamente ou de um modo preferido a, pelo menos, um epitopo de Sp35, em que o epitopo compreende, consiste essencialmente ou consiste de, além de um, dois, três, quatro, cinco, seis ou mais aminoácidos contíguos ou não mais contíguos da SEQ ID N°: 2 como acima descrito, e uma unidade adicional que modifica a proteína, e. g., uma unidade de hidrato de carbono pode ser incluída de modo que o anticorpo de Sp35 se ligue com maior afinidade à proteína alvo modificada do que com uma versão não modificada da proteína. Alternativamente, o anticorpo de Sp35 não se liga de todo à versão não modificada da proteína alvo.

Em determinados exemplos, um anticorpo, ou fragmento, variante de ligação ao antigénio, ou os seus derivados da divulgação ligam-se especificamente a, pelo menos, um epitopo de Sp35 ou fragmento ou variante acima descrito, i. e., liga-se a tal epitopo mais prontamente do que se ligaria a um epitopo não

relacionado, ou aleatório; liga-se de um modo preferido a, pelo menos, um epitopo de Sp35 ou fragmento ou variante acima descrito, *i. e.*, liga-se a tal epitopo mais prontamente do que se ligaria a um epitopo relacionado, semelhante, homólogo ou análogo; inibe competitivamente a ligação de um anticorpo de referência que ele próprio se liga especificamente ou, de um modo preferido, a um determinado epitopo de Sp35 ou fragmento ou variante acima descrito; ou liga-se, pelo menos, a um epitopo de Sp35 ou fragmento ou variante acima descrito com uma afinidade caracterizada por uma constante de dissociação  $K_D$  menor que cerca de  $5 \times 10^{-2}$  M, cerca de  $10^{-2}$  M, cerca de  $5 \times 10^{-3}$  M, cerca de  $10^{-3}$  M, cerca de  $5 \times 10^{-4}$  M, cerca de  $10^{-4}$  M, cerca de  $5 \times 10^{-5}$  M, cerca de  $10^{-5}$  M, cerca de  $5 \times 10^{-6}$  M, cerca de  $10^{-6}$  M, cerca de  $5 \times 10^{-7}$  M, cerca de  $10^{-7}$  M, cerca de  $5 \times 10^{-8}$  M, cerca de  $10^{-8}$  M, cerca de  $5 \times 10^{-9}$  M, cerca de  $10^{-9}$  M, cerca de  $5 \times 10^{-10}$  M, cerca de  $10^{-10}$  M, cerca de  $5 \times 10^{-11}$  M, cerca de  $10^{-11}$  M, cerca de  $5 \times 10^{-12}$  M, cerca de  $10^{-12}$  M, cerca de  $5 \times 10^{-13}$  M, cerca de  $10^{-13}$  M, cerca de  $5 \times 10^{-14}$  M, cerca de  $10^{-14}$  M, cerca de  $5 \times 10^{-15}$  M ou cerca de  $10^{-15}$  M. Num aspecto particular, o anticorpo ou o seu fragmento liga-se, de um modo preferido, a um polipéptido Sp35 humano ou o seu fragmento, relativamente a um polipéptido Sp35 murino ou o seu fragmento.

Como utilizado no contexto de constantes de dissociação de ligação a anticorpo, a expressão "cerca de" permite o grau de variação inerente aos métodos utilizados para medir a afinidade de anticorpo. Por exemplo, dependendo do nível de precisão da instrumentação utilizada, o erro padrão baseado no número de amostras medidas, e arredondando do erro, a expressão "cerca de  $10^{-2}$  M" pode incluir, por exemplo, desde 0,05 M a 0,005 M.

Em exemplos específicos, um anticorpo, ou fragmento, variante de ligação ao antigénio, ou os seus derivados da divulgação, liga-se a polipéptidos Sp35 ou os seus fragmentos ou variantes com uma velocidade de dissociação ( $k(\text{off})$ ) menor ou igual a  $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ou  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Alternativamente, um anticorpo, ou fragmento, variante de ligação ao antigénio, ou os seus derivados da divulgação, liga-se a polipéptidos Sp35 ou os seus fragmentos ou variantes com uma velocidade de dissociação ( $k(\text{off})$ ) menor ou igual a  $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , ou  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  ou  $10^{-7} \text{ s}^{-1}$ .

Noutros exemplos, um anticorpo, ou fragmento, variante de ligação ao antigénio, ou os seus derivados da divulgação, liga-se a polipéptidos Sp35 ou os seus fragmentos ou variantes com uma velocidade de ligação ( $k(\text{on})$ ) 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  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Alternativamente, um anticorpo, ou fragmento, variante de ligação ao antigénio, ou os seus derivados da divulgação, liga-se a polipéptidos Sp35 ou os seus fragmentos ou variantes com uma velocidade de ligação ( $k(\text{on})$ ) 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  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Num exemplo, um antagonista de Sp35 para utilização nos métodos da divulgação é uma molécula de anticorpo, ou o seu fragmento imuno específico. A menos que seja especificamente assinalado, como aqui utilizado um "seu fragmento" em referência a um anticorpo, refere-se a um fragmento imuno específico, *i. e.*, um fragmento específico de antigénio. Num exemplo, um anticorpo da divulgação é uma molécula de ligação biespecífica, polipéptido de ligação, ou anticorpo, *e. g.*, um anticorpo biespecífico, minicorpo, anticorpo com domínio removido, ou proteína de fusão que tem uma especificidade de ligação para

mais de um epitopo, e. g., mais de um antigénio ou mais de um epitopo no mesmo antigénio. Num exemplo, um anticorpo biespecífico tem, pelo menos, um domínio de ligação específico para, pelo menos, um epitopo em Sp35. Um anticorpo biespecífico pode ser um anticorpo tetravalente que tenha dois domínios de ligação alvo, específicos para um epitopo de Sp35 e dois domínios de ligação alvo, específicos para um segundo alvo. Assim, um anticorpo biespecífico tetravalente pode ser bivalente para cada especificidade.

Determinados exemplos da presente divulgação compreendem a administração de um anticorpo antagonista de Sp35, ou um seu fragmento imuno específico, em que, pelo menos uma fracção de um ou mais dos domínios de região constante foi removida ou então alterada de modo a proporcionar características bioquímicas desejadas, tais como funções efectoras reduzidas, capacidade para dimerizar não covalentemente, capacidade aumentada para se localizar no local de um tumor, semi-vida sérica reduzida, ou semi-vida sérica aumentada quando comparada com um anticorpo inteiro, não alterado, de aproximadamente a mesma imunogenicidade. Por exemplo, determinados anticorpos para utilização nos métodos de tratamento aqui descritos, são anticorpos com domínios removidos que compreendem uma cadeia polipeptídica semelhante a uma cadeia pesada de imunoglobulina, mas que carecem, pelo menos, de uma porção de um ou mais domínios de cadeia pesada. Por exemplo, em determinados anticorpos, um domínio inteiro da região constante do anticorpo modificado será removido, por exemplo, toda ou parte do domínio C<sub>H</sub>2 será removida.

Em determinados anticorpos antagonistas de Sp35 ou os seus fragmentos imuno específicos para utilização nos métodos terapêuticos aqui descritos, a porção Fc pode ser mutada para



diminuir a função efectora utilizando técnicas conhecidas no campo técnico. Por exemplo, a deleção ou inactivação (através de mutações pontuais ou outros meios) de um domínio de região constante pode reduzir ligação do receptor de Fc do anticorpo modificado circulante, aumentando, assim, a localização do tumor. Noutros casos pode ser que as modificações da região constante consistentes com a presente divulgação moderem a ligação do complemento e assim reduzam a semi-vida sérica e a associação não específica de uma citotoxina conjugada. Contudo, outras modificações da região constante podem ser utilizadas para modificar ligações perssulfureto ou unidades oligossacarídeas que permitem localização melhorada devido a especificidade antigénica ou flexibilidade aumentada de anticorpo. O perfil fisiológico resultante, a biodisponibilidade e outros efeitos bioquímicos das modificações, tais como localização do tumor, biodistribuição e semi-vida sérica, podem ser facilmente medidos e quantificados utilizando técnicas imunológicas sem experimentação supérflua.

As formas modificadas de anticorpos ou os seus fragmentos imuno-específicos para utilização nos métodos de diagnóstico e terapêuticos aqui divulgados, podem ser feitas a partir de anticorpos parentais ou precursores inteiros utilizando técnicas conhecidas no campo técnico. As técnicas exemplificativas são aqui discutidas mais detalhadamente.

Em determinados exemplos, as regiões variáveis e constantes de anticorpos antagonistas de Sp35 ou os seus fragmentos imuno-específicos para utilização nos métodos de tratamento aqui divulgados, são inteiramente humanas. Os anticorpos totalmente humanos podem ser produzidos utilizando técnicas conhecidas no campo técnico e como aqui descritas. Por exemplo, os anticorpos totalmente humanos contra um antigénio específico podem ser

preparados por administração do antígeno a um animal transgénico que foi modificado para produzir tais anticorpos em resposta ao desafio antigénico, mas cujos loci endógenos foram desactivados. As técnicas exemplificativas que podem ser utilizadas para produzir tais anticorpos estão descritas nas Patentes U.S.: 6150584; 6458592; 6420140. Outras técnicas são conhecidas no campo técnico. Os anticorpos totalmente humanos podem igualmente ser produzidos por várias tecnologias de apresentação, *e. g.*, apresentação de fago ou outros sistemas virais de apresentação, como aqui descritos mais detalhadamente.

Os anticorpos antagonistas de Sp35 ou os seus fragmentos imuno-específicos para utilização nos métodos de diagnóstico e tratamento aqui divulgados, podem ser produzidos ou preparados utilizando técnicas conhecidas no campo técnico. Em determinados exemplos, as moléculas de anticorpo ou os seus fragmentos são "produzidos recombinantemente", *i. e.*, são produzidos utilizando tecnologia de ADN recombinante. As técnicas exemplificativas para produzir moléculas de anticorpo ou os seus fragmentos são aqui discutidos mais detalhadamente.

Os anticorpos antagonistas de Sp35 ou os seus fragmentos imuno-específicos para utilização nos métodos de tratamento aqui divulgados, incluem derivados que são modificados, *e. g.*, pela ligação covalente de qualquer tipo de molécula ao anticorpo de modo que a ligação covalente não previne que o anticorpo se ligue especificamente a seu epitopo aparentado. Por exemplo, mas não a título de limitação, os derivados de anticorpo incluem anticorpos que foram modificados, *e. g.*, por glicosilação, acetilação, pegilação, fosforilação, amidação, derivatização por grupos de protecção/bloqueamento conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligando celular ou outra proteína, etc. Qualquer das numerosas modificações químicas pode ser

realizada por 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.

Em exemplos preferidos, um anticorpo antagonista de Sp35 ou o seu fragmento imuno específico para utilização nos métodos de tratamento aqui divulgados, não induzirá uma resposta imune prejudicial no animal a ser tratado, e.g., num humano. Num exemplo, os anticorpos antagonistas de Sp35 ou os seus fragmentos imuno específicos para utilização nos métodos de tratamento aqui divulgados, são modificados para reduzir a sua imunogenicidade utilizando técnicas reconhecidas no campo técnico. Por exemplo, os anticorpos podem ser humanizados, primatizados, desimunizados, ou podem ser produzidos anticorpos quiméricos. Estes tipos de anticorpos são derivados de um anticorpo não humano, tipicamente um anticorpo murino ou de primata, que retenha ou retenha substancialmente as propriedades de ligação ao antigénio do anticorpo parental, mas que seja menos imunogénico em humanos. Isto pode ser conseguido por vários métodos, incluindo (a) enxerto da totalidade dos domínios variáveis não humanos em regiões constantes humanas para produzir anticorpos quiméricos; (b) enxerto, pelo menos, de uma parte de uma ou mais das regiões determinantes de complementaridade (CDR) não humanas numa estrutura humana e regiões constantes com ou sem retenção de resíduos críticos de estrutura; ou (c) transplante da totalidade dos domínios variáveis não humanos, mas "mascarando" os mesmos com uma secção de tipo humano, por substituição de resíduos de superfície. Tais métodos são divulgados 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 Pat. U.S. N° 5585089, 5693761, 5693762 e 6190370.

A Desimunização pode também ser utilizada para diminuir a imunogenicidade de um anticorpo. Como aqui utilizado, o termo "desimunização" inclui a alteração de um anticorpo para modificar epitopos de células T (ver, e. g., documentos WO9852976A1, WO0034317A2). Por exemplo, as sequências de V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> do anticorpo inicial podem ser analisadas e um "mapa" de epitopos da célula T humano de cada região V que mostra a posição dos epitopos em relação a regiões determinantes de complementaridade (CDR) e a outros resíduos chave dentro da sequência. Os epitopos das células T individuais do mapa de epitopos da célula T são analisados de modo a identificar substituições alternativas de aminoácidos com um baixo risco de alterar a actividade do anticorpo final. É concebida uma gama alternativa de sequências V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> compreendendo combinações de substituições de aminoácidos e estas sequências são subsequentemente incorporadas numa gama de polipéptidos de ligação, e. g., anticorpos antagonistas de Sp35 ou os seus fragmentos imuno específicos para utilização nos métodos de diagnóstico e tratamento aqui divulgados, que são depois testados para a função. Tipicamente, entre 12 e 24 anticorpos variantes são produzidos e testados. Os genes completos da cadeia leve e pesada compreendendo regiões C e V humanas modificadas são depois clonados em vectores de expressão e os plasmídeos subsequentes introduzidos em linhas celulares para a produção de anticorpo inteiro. Os anticorpos são depois comparados em ensaios bioquímicos e biológicos apropriados e a variante óptima é identificada.

Os anticorpos antagonistas de Sp35 ou os seus fragmentos para utilização nos métodos da presente divulgação, podem ser produzidos por qualquer método adequado conhecido na técnica. Os anticorpos policlonais podem ser produzidos por vários processos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, um fragmento imuno específico de Sp35 pode ser administrado a vários animais hospedeiros incluindo, mas não limitados a, coelhos, murganhos, ratos, etc., para induzir a produção de soros contendo anticorpos policlonais específicos para o antigénio. Podem ser utilizados vários adjuvantes para aumentar a resposta imunológica, dependendo da espécie do hospedeiro, e incluem mas não estão limitados a, adjuvante de Freund (completo e incompleto), géis minerais, tal como hidróxido de alumínio, substâncias tensioactivas, tais como lisolecitina, polióis pluronic, polianiões, péptidos, emulsões de óleo, hemocianinas da lapa Californiana, dinitrofenol e adjuvantes humanos potencialmente úteis, tais como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) e *Corynebacterium parvum*. Tais adjuvantes são também bem conhecidos na técnica.

Os anticorpos monoclonais podem ser preparados utilizando uma vasta variedade de técnicas conhecidas no campo técnico, incluindo a utilização de tecnologias de hibridoma, recombinante e de apresentação de fagos, ou uma sua combinação. Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser produzidos utilizando técnicas de hibridoma incluindo aquelas conhecidas no campo técnico 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 Antibodies and T-Cell Hybridomas*, Elsevier, N.Y., 563-681 (1981). A expressão "anticorpo monoclonal" como aqui utilizada, não está limitada a anticorpos produzidos através de tecnologia de hibridoma. A expressão "anticorpo monoclonal" refere-se a um anticorpo que é

derivado de um único clone, incluindo qualquer clone eucariótico, procariótico ou fago, e não o método através do qual é produzido. Assim, a expressão "anticorpo monoclonal" não está limitada a anticorpos produzidos através de tecnologia de hibridoma. Os anticorpos monoclonais podem ser preparados utilizando uma vasta variedade de técnicas conhecidas no campo técnico, incluindo a utilização de tecnologias de hibridoma e recombinante e de apresentação de fagos.

Utilizando protocolos reconhecidos na técnica, num exemplo, os anticorpos são produzidos em mamíferos através de múltiplas injeções subcutâneas ou intraperitoneais do antigénio relevante (e. g., antigénios de Sp35 purificados ou células ou extractos celulares compreendendo tais antigénios) e um adjuvante. Esta imunização induz tipicamente uma resposta imune que compreende a produção de anticorpos reactivos a antigénio a partir de esplenócitos ou linfócitos activados. Embora os anticorpos resultantes possam ser recolhidos a partir do soro do animal para proporcionar preparações de policlonais, é frequentemente desejável isolar linfócitos individuais a partir do baço, nódulos linfáticos ou sangue periférico para proporcionar preparações homogéneas de anticorpos monoclonais (MAb). De um modo preferido, os linfócitos são obtidos a partir do baço.

Neste processo bem conhecido (Kohler *et al.*, *Nature* 256: 495 (1975)) os linfócitos de vida relativamente curta, ou mortais, de um mamífero que foi injectado com antigénio, são fundidos com uma linha imortal de células tumorais (e. g., uma linha celular de mieloma), produzindo assim células híbridas ou "hibridomas" que são imortais e capazes de produzir o anticorpo geneticamente codificado da célula B. Os híbridos resultantes são segregados em estirpes genéticas únicas por selecção, diluição e novo cultivo, com cada estirpe individual compreendendo genes

específicos para a formação de um único anticorpo. Estes produzem anticorpos que são homogêneos contra um antigénio desejado e, com referência à sua parentalidade genética pura, são denominados "monoclonais".

As células de hibridoma assim preparadas são inoculadas e cultivadas num meio de cultura adequado que contém, de um modo preferido, uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma parentais, não fundidas. Os especialistas na técnica entenderão que os reagentes, linhas celulares e meios para a formação, selecção e crescimento de hibridomas estão comercialmente disponíveis a partir de uma variedade de fontes e estão bem estabelecidos protocolos convencionais. Geralmente, o meio de cultura em que as células de hibridoma são cultivadas é ensaiado para a produção de anticorpos monoclonais contra o antigénio desejado. De um modo preferido, a especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada por ensaios *in vitro*, tais como imunoprecipitação, radioimunoensaio (RIA) ou imunoensaio de adsorção ligado à enzima (ELISA). Após serem identificadas as células de hibridoma que produzem anticorpos da especificidade, afinidade e/ou actividade desejadas, os clones podem ser subclonados através de processos de diluição limitante e cultivados por métodos convencionais (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pp 59-103 (1986)). Será ainda entendido que os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones podem ser separados do meio de cultura, fluido ascítico ou soro, por processos convencionais de purificação, tais como, por exemplo, proteína-A, cromatografia de hidroxapatita, electroforese em gel, dialise ou cromatografia de afinidade.

Os fragmentos de anticorpo que reconhecem epitopos específicos podem ser produzidos por técnicas conhecidas. Por exemplo, os fragmentos Fab e F(ab')<sub>2</sub> pode ser produzidos por clivagem proteolítica de moléculas de imunoglobulina, utilizando enzimas, tais como papaína (para produzir fragmentos Fab) ou pepsina (para produzir fragmentos F(ab')<sub>2</sub>). Os fragmentos F(ab')<sub>2</sub> contêm a região variável, a região constante da cadeia leve e o domínio C<sub>H1</sub> da cadeia pesada.

Os especialistas na técnica entenderão também que anticorpos ou fragmentos de anticorpo codificados por ADN (e. g., locais de ligação ao antigénio) podem também ser derivados de bibliotecas de fago de anticorpos. Em particular, esse fago pode ser utilizado para apresentar domínios de ligação ao antigénio expressos a partir de um repertório ou biblioteca combinatória de anticorpos (e. g., humano ou murino). Um fago que expressa um domínio de ligação ao antigénio que se liga ao antigénio de interesse pode ser seleccionado ou identificado com antigénio, e. g., utilizando antigénio marcado ou antigénio ligado ou capturado numa superfície sólida ou num grânulo. Os fagos utilizados nestes métodos são tipicamente fagos filamentosos incluindo domínios de ligação a fd e M13 expressos de fagos com domínios de anticorpo Fab, Fv ou Fv estabilizado com persulfureto, fundidos recombinantemente ao gene III de fago ou à proteína do gene VIII. Os métodos exemplificativos são apresentados, por exemplo, no documento EP 368684 B1; Patente U.S. 5969108, 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). Diversas publicações (e. g., Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992)) descreveram a produção de anticorpos humanos de elevada afinidade por arranjo combinatório de cadeias, assim como infecção combinatória e recombinação



*in vivo* como uma estratégia para construir grandes bibliotecas de fagos. Noutro exemplo, pode ser utilizada apresentação ribossomal para substituir o bacteriófago como a plataforma de apresentação (ver, e. g., 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)). Ainda noutro exemplo, as bibliotecas de superfície celular podem ser seleccionadas para anticorpos (Boder *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10701 (2000); Daugherty *et al.*, *J. Immunol. Methods* 243:211 (2000)). Tais processos proporcionam alternativas às técnicas tradicionais de hibridoma para o isolamento e clonagem subsequente de anticorpos monoclonais.

Nos métodos de apresentação de fagos, os domínios funcionais de anticorpo são apresentados à superfície de partículas fágicas que contêm as sequências de polinucleótido que as codificam. Em particular, as sequências de ADN que codificam as regiões V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> são amplificadas a partir de bibliotecas de ADNc de animal (e. g., bibliotecas de ADNc de humano ou murino de tecidos linfóides) ou bibliotecas de ADNc sintético. Em determinados exemplos, o ADN que codifica as regiões V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> é ligado, em conjunto, por um ligante scFv através de PCR e clonado num vector fagemídeo (e. g., pCANTAB 6 ou pComb 3 HSS). O vector é electroporado em *E. coli* e a *E. coli* é infectada com fago auxiliar. Os fagos utilizados nestes métodos são tipicamente fagos filamentosos incluindo fd e M13 e as regiões V<sub>H</sub> ou V<sub>L</sub> são geralmente fundidas recombinantemente ao gene III ou gene VIII do fago. O fago que expressa um domínio de ligação ao antigénio que se liga a um antigénio de interesse (*i. e.*, um polipéptido Sp35 ou um seu fragmento) podem ser seleccionados ou identificados com antigénio, e. g., utilizando antigénio marcado ou antigénio ligado ou capturado numa superfície sólida ou num grânulo.

Os exemplos adicionais de métodos de apresentação de fagos que podem ser utilizados para produzir os anticorpos incluem aqueles divulgados 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 PCT N° PCT/GB91/01134; Publicações PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; e Pat. U.S. N° 5698426; 5223409; 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516637; 5780225; 5658727; 5733743 e 5969108.

Como descrito nas referências acima, após selecção do fago, as regiões codificantes de anticorpo do fago podem ser isoladas e utilizadas para produzir anticorpos inteiros, incluindo anticorpos humanos, ou qualquer outro fragmento de ligação ao antigénio desejado, e expressos em qualquer hospedeiro desejado, incluindo células de mamífero, células de insecto, células vegetais, leveduras e bactérias. Por exemplo, técnicas para produzir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' e F(ab')<sub>2</sub> podem também ser empregues utilizando métodos conhecidos na técnica, tal como aqueles divulgados na publicação 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).

Os exemplos de técnicas que podem ser utilizada para produzir Fv de cadeia simples e anticorpos incluem aqueles descritos na Pat. U.S. N° 4946778 e 5258498; 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 algumas utilizações, incluindo a utilização *in vivo* de

anticorpos em humanos e ensaios de detecção *in vitro*, pode ser preferível utilizar anticorpos quiméricos, humanizados ou humanos. Um anticorpo quimérico é uma molécula em que diferentes porções do anticorpo são derivadas de diferentes espécies de animais, tal como anticorpos que têm uma região variável derivada de um anticorpo monoclonal de murino e uma região constante de imunoglobulina humana. Os métodos para produzir anticorpos quiméricos são conhecidos na técnica. Ver, e. g., Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi et al., *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies et al., *J. Immunol. Methods* 125: 191-202 (1989); Pat. U.S. N° 5807715; 4816567; e 4816397. Os anticorpos humanizados são moléculas de anticorpos de espécies não humanas que se ligam o antigénio desejado que tem um ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDR) das espécies não humanas e regiões de estrutura de uma molécula de imunoglobulina humana. Frequentemente, os resíduos de estrutura nas regiões de estrutura humanas serão substituídas com o resíduo correspondente do anticorpo dador de CDR para alterar, de um modo preferido, melhorar a ligação ao antigénio. Estas substituições de estrutura são identificadas por métodos bem conhecidos na técnica, e. g., por modelação das interacções da CDR e resíduos de estrutura para identificar resíduos de estrutura importantes para ligação ao antigénio e comparação de sequência para identificar resíduos de estrutura não comuns em posições particulares. (ver, e. g., Queen et al., Pat. U.S. N° 5585089; Riechmann et al., *Nature* 332: 323 (1988)). Os anticorpos podem ser humanizados utilizando uma variedade de técnicas conhecidas no campo técnico incluindo, por exemplo, enxerto de CDR (Documento EP 239400; Publicação PCT WO 91/09967; Pat. U.S. N° 5225539; 5530101; e 5585089), folheamento ou renovação da superfície (documentos EP 592106; EP 519596; 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 arranjo combinatório de cadeia (Pat. U.S. N° 5565332).

Os anticorpos totalmente humanos são particularmente desejáveis para tratamento terapêutico de doentes humanos. Os anticorpos humanos podem ser produzidos por uma variedade de métodos conhecidos na técnica, incluindo métodos de apresentação de fagos descritos acima, utilizando bibliotecas de anticorpos derivadas de sequências de imunoglobulina humana. Ver também, Pat. U.S. N° 4444887 e 4716111; e publicações PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, e WO 91/10741.

Os anticorpos humanos podem também ser produzidos utilizando murganhos transgênicos que são incapazes de expressar imunoglobulinas funcionais endógenas, mas que podem expressar genes de imunoglobulinas humanas. Por exemplo, os complexos dos genes de imunoglobulina das cadeias pesada e leve humana podem ser introduzidos aleatoriamente ou por recombinação homóloga em células estaminais embrionárias de murganho. Alternativamente, a região variável humana, a região constante e a região de diversidade podem ser introduzidas em células estaminais embrionárias de murganho, além dos genes da cadeia pesada e leve humana. Os genes de imunoglobulina da cadeia pesada e leve de murganho podem ser tornados não funcionais, separadamente ou simultaneamente, com a introdução de loci de imunoglobulina humana por recombinação homóloga. Em particular, a deleção homozigótica da região JH previne a produção de anticorpo endógeno. As células estaminais embrionárias modificadas são expandidas e microinjectadas em blastocistos para produzir murganhos quiméricos. Os murganhos quiméricos são depois reproduzidos para produzir prole homozigótica que expressa anticorpos humanos. Os murganhos transgênicos são imunizados de

forma normal com um antigénio seleccionado, e. g., toda ou uma porção do polipéptido alvo desejado. Os anticorpos monoclonais dirigidos contra o antigénio podem ser obtidos a partir dos murganhos imunizados, transgénicos, utilizando tecnologia de hibridoma convencional. Os transgenes de imunoglobulina humana abrigados pelos murganhos transgénicos reorganizam-se durante a diferenciação de células B e submetem-se subsequentemente à permuta de classe e à mutação somática. Assim, utilizando tal técnica, é possível produzir anticorpos de IgG, IgA, IgM e IgE terapêuticamente úteis. Para uma vista geral desta tecnologia para produzir anticorpos humanos, ver Lonberg e Huszar, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995). Para uma discussão detalhada desta tecnologia para produzir anticorpos humanos e anticorpos monoclonais humanos e protocolos para produzir tais anticorpos, ver, e. g., publicações PCT WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; Pat. U.S. N° 5413923; 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806; 5814318; e 5939598. Além disso, companhias tais como Abgenix, Inc. (Freemont, Califórnia) e GenPharm (San Jose, Califórnia) podem ser contratadas para proporcionar anticorpos humanos dirigidos contra um antigénio seleccionado utilizando tecnologia semelhante àquela acima descrita.

Os anticorpos totalmente humanos que reconhecem um epitopo seleccionado podem ser produzidos utilizando uma técnica referida como "selecção guiada". Nesta abordagem, um anticorpo monoclonal não humano seleccionado, e. g., um anticorpo de murganho, é utilizado para guiar a selecção de um anticorpo totalmente humano que reconhece o mesmo epitopo (Jespers *et al.*, *Bio/Technology* 12: 899-903 (1988)). Ver também, Patente U.S. N° 5565332.

Noutro exemplo, o ADN que codifica anticorpos monoclonais desejados pode ser prontamente isolado e sequenciado utilizando processos convencionais (e. g., através da utilização de sondas oligonucleotídicas que são capazes de se ligarem especificamente a genes que codificam as cadeias pesada e leve de anticorpos murinos). As células de hibridoma isoladas e subclonadas servem como uma fonte preferida de tal ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vectores de expressão que são depois transfectados 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 de outro modo não produzem imunoglobulinas. Mais particularmente, o ADN isolado (que pode ser sintético como aqui descrito) pode ser utilizado para clonar sequências da região constante e variável para a produção de anticorpos como descrito em Newman *et al.*, Pat. U.S. N° 5658570, apresentada em 25 de Janeiro de 1995. Essencialmente, esta requer extracção de ARN a partir das células seleccionadas, conversão em ADNc e amplificação por PCR utilizando iniciadores específicos de Ig. Os iniciadores adequados para este objectivo são também descritos na Pat. U.S. N° 5658570. Como será discutido mais detalhadamente abaixo, as células transformadas que expressam o anticorpo desejado podem ser cultivadas em quantidades relativamente grandes para proporcionar fontes clínicas e comerciais da imunoglobulina.

Num exemplo específico, a sequência de aminoácidos dos domínios variáveis da cadeia pesada e/ou leve pode ser inspeccionada para identificar as sequências das regiões determinantes de complementaridade (CDR) por métodos que são bem conhecidos na técnica, e. g., por comparação com sequências de aminoácidos conhecidas de outras regiões variáveis de cadeia pesada e leve, para determinar as regiões de hipervariabilidade

sequencial. Utilizando técnicas de ADN recombinante rotineiras, uma ou mais das CDR podem ser introduzidas em regiões de estrutura, e. g., 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, de um modo preferido, regiões de estrutura humanas (ver, e. g., Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 278:457-479 (1998) para uma lista de regiões de estrutura humanas). De um modo preferido, o polinucleótido produzido pela combinação das regiões de estrutura e CDR que codificam um anticorpo que especificamente se liga a, pelo menos, um epítipo de um polipéptido desejado, e. g., Sp35. De um modo preferido, uma ou mais substituições de aminoácidos podem ser realizadas dentro das regiões de estrutura e, de um modo preferido, as substituições de aminoácidos melhoram a ligação do anticorpo ao seu antigénio. Adicionalmente, tais métodos podem ser utilizados para fazer substituições ou deleções de aminoácidos de um ou mais resíduos de cisteína da região variável que participa numa ligação de perssulfureto de intra-cadeia para produzir moléculas de anticorpo que carecem de uma ou mais ligações de perssulfureto intra-cadeia. Outras alterações ao polinucleótido estão abrangidas pela presente divulgação e dentro da especialidade da técnica.

Além disso, podem ser utilizadas 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 *splice* de genes de uma molécula de anticorpo de murganho de especificidade antigénica apropriada, em conjunto, com genes de uma molécula de anticorpo humana de actividade biológica apropriada. Como aqui utilizado, um anticorpo quimérico é uma molécula em que diferentes porções são derivadas de diferentes

espécies animais, tais como aquelas que têm uma região variável derivada de um anticorpo monoclonal murino e uma região constante de imunoglobulina humana, e. g., anticorpos humanizados.

Alternativamente, as técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia simples (pat. U.S. N° 4694778; 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. Os anticorpos de cadeia simples são formados por ligação dos fragmentos da cadeia pesada e leve da região Fv através de uma ponte aminoacídica, resultando num anticorpo de cadeia simples. Também podem ser utilizadas técnicas para a montagem de fragmentos Fv funcionais em *E. coli* (Skerra *et al.*, *Science* 242:1038-1041 (1988)).

Os anticorpos antagonistas de Sp35 podem também ser anticorpos humanos ou substancialmente humanos produzidos em animais transgênicos (e. g., murganhos) que são incapazes de produção de imunoglobulina endógena (ver, e. g., Pat. U.S. N° 6075181, 5939598, 5591669 e 5589369). Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigótica da região de ligação da cadeia pesada de anticorpo em murganhos mutantes quiméricos e da linha germinal, resulta em inibição completa da produção de anticorpo endógeno. A transferência de uma série de genes de imunoglobulina humana para tal murganho mutante da linha germinal resultará na produção de anticorpos humanos após desafio antigênico. Outros meios preferidos para produzir anticorpos humanos que utilizam murganhos SCID são divulgados na Pat. U.S. N° 5811524. Deve ser entendido que o material genético associado com estes anticorpos humanos também pode ser isolado e manipulado como aqui descrito.



Ainda outros meios altamente eficientes para produzir anticorpos recombinantes são divulgados por Newman, *Biotechnology* 10: 1455-1460 (1992). Especificamente, esta técnica resulta na produção de anticorpos primatizados que contêm domínios variáveis de macaco e sequências constantes humanas. Além disso, esta técnica é também descrita nas Pat. U.S. N° 5658570, 5693780 e 5756096 da presente requerente.

Noutro exemplo, os linfócitos podem ser seleccionados por micromanipulação e os genes variáveis isolados. Por exemplo, as células mononucleares de sangue periférico podem ser isoladas a partir de um mamífero imunizado e cultivadas *in vitro* durante cerca de 7 dias. As culturas podem ser rastreadas para IgG específicos que reúnem os critérios de rastreio. As células de poços positivos podem ser isoladas. As células B individuais que produzem Ig podem ser isoladas por FACS ou pela sua identificação num ensaio de placa hemolítica mediada por complemento. As células B que produzem Ig podem ser micromanipuladas num tubo e os genes de  $V_H$  e  $V_L$  podem ser amplificados utilizando, e. g., RT-PCR. Os genes de  $V_H$  e  $V_L$  podem ser clonados num vector de expressão de anticorpo e transfectados em células (e. g., células procarióticas ou eucarióticas) para a expressão.

Alternativamente, as linhas celulares produtoras de anticorpos podem ser seleccionadas e cultivadas utilizando técnicas bem conhecidas do especialista no campo técnico. Tais técnicas são descritas numa variedade de manuais laboratoriais e publicações originais. A este respeito, as técnicas adequadas para utilização na divulgação como descrita abaixo, são descritas em *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates e Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Nova Iorque (1991).

Os anticorpos para utilização nos métodos terapêuticos aqui divulgados podem ser produzidos por qualquer método conhecido na técnica para a síntese de anticorpos, em particular, por síntese química ou, de um modo preferido, por técnicas de expressão recombinante como aqui descritas.

Será ainda entendido que o âmbito desta divulgação ainda abrange todos os alelos, variantes e mutações de sequências de ADN de ligação ao antigénio.

Como é bem sabido, o ARN pode ser isolado a partir das células de hibridoma originais ou a partir de outras células transformadas por técnicas convencionais, tais como extracção e precipitação com isotiocianato de guanidínio, seguida por centrifugação ou cromatografia. Sempre que desejável, o ARNm pode ser isolado a partir de ARN total por técnicas convencionais, tais como cromatografia em celulose oligo dT. As técnicas adequadas são familiares no campo técnico.

Num exemplo, os ADNC que codificam as cadeias leve e pesada do anticorpo podem ser produzidos, simultaneamente ou separadamente, utilizando transcriptase reversa e ADN polimerase de acordo com métodos bem conhecidos. A PCR pode ser iniciada por iniciadores de regiões constantes de consenso ou por iniciadores mais específicos baseados nas sequências publicadas de aminoácidos e de ADN da cadeia pesada e leve. Como acima discutido, a PCR também pode ser utilizada para isolar clones de ADN que codificam as cadeias pesada e leve de anticorpo. Neste caso, as bibliotecas podem ser rastreadas por iniciadores de consenso ou maiores sondas homólogas, tal como sondas da região constante de murganho.

O ADN, tipicamente ADN plasmídico, pode ser isolado a partir das células utilizando técnicas conhecidas no campo técnico, submetido a mapeamento de restrição e sequenciado de acordo com técnicas convencionais bem conhecidas, apresentadas em detalhe, e. g., nas referências anteriores que se relacionam com técnicas de ADN recombinante. Naturalmente, o ADN pode ser sintético de acordo com a presente divulgação, em qualquer momento durante o processo de isolamento ou análise subsequente.

A expressão recombinante de um anticorpo, ou o seu fragmento, derivado ou análogo, e. g., uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo que é um antagonista de Sp35, requer a construção de um vector de expressão contendo um polinucleótido que codifica o anticorpo. Uma vez obtido um polinucleótido que codifica uma molécula de anticorpo ou uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo, ou a sua porção (de um modo preferido, contendo o domínio variável da cadeia pesada ou leve) da divulgação, o vector para a produção da molécula de anticorpo pode ser produzido por tecnologia de ADN recombinante, utilizando técnicas bem conhecidas no campo técnico. Assim, são aqui descritos métodos para preparar uma proteína por expressão de um polinucleótido contendo uma sequência de nucleótidos que codifica um anticorpo. Os métodos que são bem conhecidos dos especialistas na técnica podem ser utilizados para construir vectores de expressão contendo sequências codificadoras de anticorpo e sinais de controlo transcricionais e de tradução apropriados. Estes métodos incluem, por exemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas e recombinação genética *in vivo*. A divulgação proporciona, assim, vectores replicáveis compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica uma molécula de anticorpo da divulgação, ou uma sua cadeia pesada ou leve, ou um domínio variável da cadeia pesada ou leve, operativamente ligado a um promotor. Tais vectores

podem incluir a sequência de nucleótidos que codifica a região constante da molécula de anticorpo (ver, e. g., Publicação PCT WO 86/05807; Publicação PCT WO 89/01036; e Pat. U.S. Nº 5122464) e o domínio variável de anticorpo pode ser clonado em tal vector para expressão da totalidade da cadeia pesada ou leve.

O vector de expressão é transferido para uma célula hospedeira por técnicas convencionais e as células transfectadas são depois cultivadas por técnicas convencionais para produzir um anticorpo para utilização nos métodos aqui descritos.

Assim, a divulgação inclui células hospedeiras contendo um polinucleótido que codifica um anticorpo da divulgação, ou uma sua cadeia pesada ou leve, operativamente ligado a um promotor heterólogo. Em exemplos preferidos para a expressão de anticorpos de cadeia dupla, os vectores que codificam as cadeias pesada e leve podem ser co-expressos na célula hospedeira para a expressão da totalidade da molécula de imunoglobulina, como detalhado abaixo.

Pode ser utilizada uma variedade de sistemas de vector de expressão-hospedeiro para expressar moléculas de anticorpo para utilização nos métodos aqui descritos. Tais sistemas de expressão-hospedeiro representam veículos através dos quais as sequências codificantes de interesse podem ser produzidas e subsequentemente purificadas, mas também representam células que podem, quando transformadas ou transfectadas com as sequências nucleotídicas codificantes apropriadas, expressar *in situ* uma molécula de anticorpo da divulgação. Estes incluem, mas não estão limitados a, microrganismos, tais como bactérias (e. g., *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas com ADN recombinante de bacteriófago, ADN plasmídico ou vectores de expressão de ADN cosmídico contendo sequências codificantes de anticorpo;

levedura (e. g., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada com vectores de expressão de levedura recombinantes contendo sequências codificantes de anticorpo; sistemas de células de insecto infectados com vectores de expressão de vírus recombinantes (e. g., baculovírus) contendo sequências codificantes de anticorpo; sistemas de células vegetais infectados com vectores de expressão de vírus recombinantes (e. g., vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformados com vectores de expressão de plasmídeo recombinantes (e. g., plasmídeo Ti) contendo sequências codificantes de anticorpo; ou sistemas de célula de mamífero (e. g., células COS, CHO, BLK, 293, 3T3) que contêm construções de expressão recombinante contendo promotores derivados do genoma de células de mamíferos (e. g., promotor de metalotioneína) ou de vírus de mamíferos (e. g., promotor tardio de adenovírus; o promotor de 7,5K do vírus vaccinia). De um modo preferido, as células bacterianas, tal como *Escherichia coli*, e, de um modo mais preferido, células eucarióticas, especialmente para a expressão da totalidade da molécula de anticorpo recombinante, são utilizadas para a expressão de uma molécula de anticorpo recombinante. Por exemplo, as células de mamífero, tal como as células de ovário de hamster chinês (CHO), em conjunto com um vector, tal como o principal elemento promotor génico precoce intermediário de citomegalovírus humano é um sistema de expressão eficaz para anticorpos (Foecking *et al.*, *Gene* 45: 101 (1986); Cockett *et al.*, *Bio/Technology* 8: 2 (1990)).

Em sistemas bacterianos, uma variedade de vectores de expressão pode ser vantajosamente seleccionada dependendo da utilização pretendida para a molécula de anticorpo a ser expressa. Por exemplo, quando é para ser produzida uma grande quantidade de tal proteína, para a produção de composições farmacêuticas de uma molécula de anticorpo, podem ser desejáveis

vectores que direccionam a expressão de elevados níveis de produtos proteicos de fusão que são prontamente purificados. Tais vectores incluem, mas não estão limitados, ao vector de expressão de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., *EMBO J.* 2: 1791 (1983)), em que a sequência codificante de anticorpo pode ser ligada individualmente no vector em grelha com a região codificante do lacZ de modo que seja produzida uma proteína de fusão; vectores pIN (Inouye & Inouye, *Nucleic Acid Res.* 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509 (1989)); e semelhantes. Os vectores pGEX também podem ser utilizados para expressar polipéptidos estranhos como proteínas de fusão com glutathione S-transferase (GST). Em geral, tais proteínas de fusão são solúveis e podem ser facilmente purificadas a partir de células lisadas por adsorção e ligação a esferas com matriz de glutathione-agarose, seguida por eluição na presença de glutathione livre. Os vectores pGEX são concebidos de forma a incluir locais de clivagem de protease da trombina ou factor Xa, de modo que o produto génico alvo clonado possa ser libertado da unidade de GST.

Num sistema de insecto, o vírus da poli-hedrose nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) é utilizado tipicamente como um vector para expressar genes estranhos. O vírus cresce em células de *Spodoptera frugiperda*. A sequência codificante de anticorpo pode ser clonada individualmente em regiões não essenciais (por exemplo o gene da poli-hedrina) do vírus e colocada sob controlo de um promotor de AcNPV (por exemplo, o promotor da poli-hedrina).

Em células hospedeiras de mamífero, pode ser utilizada uma variedade de sistemas de expressão baseados em vírus. Nos casos em que é utilizado um adenovírus como um vector de expressão, a sequência codificante do anticorpo de interesse pode ser ligada

a um complexo de controlo de transcrição/tradução do adenovírus, e. g., ao promotor tardio e à sequência líder tripartida. Este gene quimérico pode depois ser introduzido no genoma de adenovírus por recombinação *in vitro* ou *in vivo*. A inserção numa região não essencial do genoma viral (e. g., região E1 ou E3) resultará num vírus recombinante que é viável e capaz de expressar a molécula de anticorpo em hospedeiros infectados (e. g., ver Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:355-359 (1984)). Podem também ser requeridos sinais específicos de iniciação para a tradução eficiente das sequências codificantes de anticorpo introduzidas. Estes sinais incluem o codão de iniciação ATG e sequências adjacentes. Além disso, o codão de iniciação deve estar em fase com a grelha de leitura da sequência codificante desejada, para assegurar a tradução da totalidade da inserção. Estes sinais de controlo de tradução exógenos e codões de iniciação podem ser de uma variedade de origens naturais e sintéticas. A eficiência da expressão pode ser aumentada por inclusão de elementos intensificadores de transcrição, terminais de transcrição apropriados, etc. (ver Bittner *et al.*, *Methods in Enzymol.* 153:51-544 (1987)).

Além disso, pode ser escolhida uma estirpe de célula hospedeira que module a expressão das sequências introduzidas, ou modifica e processa o produto génico na forma específica desejada. Tais modificações (e. g., glicosilação) e processamento (e. g., clivagem) de produtos proteicos podem ser importantes para a função da proteína. Diferentes células hospedeiras têm mecanismos característicos e específicos para o processamento pós-tradução e modificação das proteínas e produtos génicos. Podem ser escolhidas linhas celulares ou sistemas de hospedeiro apropriados, para assegurar a modificação e processamento correctos da proteína estranha expressa. Para este fim, podem ser utilizadas células hospedeiras eucarióticas

que possuem a maquinaria celular para o processamento apropriado do transcrito primário, glicosilação e fosforilação do produto génico. Tais células hospedeiras de mamífero incluem, mas não estão limitadas a, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38 e, em particular, linhas celulares do cancro da mama, tais como, por exemplo, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 e T47D, e linhas celulares de glândula mamária normal, tais como, por exemplo, CRL7030 e Hs578Bst.

Para a produção a longo prazo e de elevado rendimento de proteínas recombinantes, é preferida a expressão estável. Por exemplo, as linhas celulares que expressam estavelmente a molécula de anticorpo podem ser manipuladas. Em vez de utilizar vectores de expressão que contêm origens de replicação virais, as células hospedeiras podem ser transformadas com ADN controlado por elementos de controlo de expressão apropriados (e. g., promotor, intensificador, sequências, terminadores de transcrição, locais de poliadenilação, etc.) e um marcador de selecção. Após introdução do ADN estranho, as células manipuladas podem ser deixadas a crescer durante 1-2 dias em meio enriquecido e depois são mudadas para um meio selectivo. O marcador de selecção no plasmídeo recombinante confere resistência à selecção e permite que as células integrem estavelmente o plasmídeo nos seus cromossomas e cresçam para formar loci que por sua vez são clonados e expandidos em linhas celulares. Este método pode vantajosamente ser utilizado para manipular linhas celulares que expressam estavelmente a molécula de anticorpo.

Pode ser utilizada uma variedade de sistemas de selecção, incluindo, mas não limitado, ao genes da timidina cinase do vírus do herpes simplex (Wigler *et al.*, *Cell* 11:223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (Szybalska &



Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48: 202 (1992)) e adenina fosforribosiltransferase (Lowy et al., *Cell* 22:817, 1980) que podem ser utilizados nas células tk, hgp<sup>rt</sup> ou apr<sup>t</sup>, respectivamente. Além disso, pode ser utilizada a resistência a antimetabolito como a base de seleção para os seguintes genes: dhfr que confere 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 que confere resistência ao ácido micofenólico (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2072 (1981)); neo que confere a resistência ao aminoglicósido 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 que confere resistência à higromicina (Santerre et al., *Gene* 30:147 (1984)). Podem ser utilizados métodos habitualmente conhecidos na técnica de tecnologia de ADN recombinante como descritos em Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); e nos capítulos 12 e 13, Dracopoli et al. (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981).

Os níveis de expressão de uma molécula de anticorpo podem ser aumentados por amplificação de vector (para revisão, ver Bebbington e 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 vector que expressa o anticorpo é amplificável, o aumento no nível do inibidor

presente em cultura da célula hospedeira, irá aumentar o número de cópias do gene marcador. Uma vez que a região amplificada está associada com o gene do anticorpo, a produção de anticorpo também irá aumentar (Crouse *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 3:257 (1983)).

A célula hospedeira pode ser co-transfectada com dois vectores de expressão da divulgação, o primeiro vector que codifica um polipéptido derivado da cadeia pesada e o segundo vector que codifica um polipéptido derivado da cadeia leve. Os dois vectores podem conter marcadores de selecção idênticos que permitem expressão igual de polipéptidos da cadeia pesada e leve. Alternativamente, pode ser utilizado um único vector que codifica ambos os polipéptidos da cadeia pesada e leve. Em tais situações, a cadeia leve é vantajosamente colocada antes da cadeia pesada para evitar um excesso da cadeia pesada livre tóxica (Proudfoot, *Nature* 322: 52 (1986); Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2197 (1980)). As sequências codificantes para as cadeias pesada e leve podem compreender ADNc ou ADN genómico.

Uma vez expressa recombinantemente, uma molécula de anticorpo da divulgação, pode ser purificada por qualquer método conhecido na técnica para purificação de uma molécula de imunoglobulina, por exemplo, por cromatografia (e. g., permuta iónica, afinidade, particularmente por afinidade para o antigénio específico após cromatografia de coluna de proteína A e de exclusão de tamanho), centrifugação, solubilidade diferencial, ou por qualquer outra técnica convencional para a purificação de proteínas. Alternativamente, um método preferido para aumentar a afinidade de anticorpos da divulgação é divulgado no documento U.S. 20020123057 A1.

Num exemplo, uma molécula de ligação ou uma molécula de ligação ao antigénio para utilização nos métodos da divulgação compreende uma região constante sintética, em que um ou mais domínios estão parcial ou totalmente removidos ("anticorpos de domínio removido"). Em determinados exemplos, os anticorpos modificados compatíveis irão compreender construções ou variantes de domínio removido, em que a totalidade do domínio C<sub>H2</sub> foi removida (construções ΔC<sub>H2</sub>). Para outros exemplos, um péptido curto de ligação pode ser substituído pelo domínio removido para proporcionar flexibilidade e liberdade de movimento para a região variável. Os especialistas na técnica entenderão que tais construções são particularmente preferidas devido às propriedades reguladoras do domínio C<sub>H2</sub> na taxa catabólica do anticorpo.

Em determinados exemplos, os anticorpos modificados para utilização nos métodos aqui divulgados são minicorpos. Os minicorpos podem ser produzidos utilizando métodos descritos na técnica (ver, e. g., Patente U.S. 5837821 ou documento WO 94/09817A1).

Noutro exemplo, os anticorpos modificados para utilização nos métodos aqui divulgados são anticorpos com domínios C<sub>H2</sub> removidos que são conhecidos na técnica. As construções de domínio removido podem ser derivadas utilizando um vector (e. g., da Biogen IDEC Incorporated) codificando um domínio constante humano de IgG<sub>1</sub> (ver, e. g., documentos WO 02/060955A2 e W002/096948A2). Este vector exemplificativo foi manipulado para remover o domínio C<sub>H2</sub> e proporcionar um vector sintético que expressa uma região constante de IgG<sub>1</sub> de domínio removido.

Num exemplo, um anticorpo antagonista de Sp35 ou o seu fragmento para utilização nos métodos de tratamento aqui divulgados, compreende uma cadeia pesada de imunoglobulina que tem deleção ou substituição de alguns, ou mesmo de um único aminoácido, desde que permita a associação entre as subunidades monoméricas. Por exemplo, a mutação de um único aminoácido em áreas seleccionadas do domínio C<sub>H</sub>2 pode ser suficiente para reduzir substancialmente a ligação de Fc e, assim, aumentar a localização do tumor. De modo semelhante, pode ser desejável simplesmente remover essa parte de um ou mais domínios de região constante que controla a função efectora (e. g., ligação do complemento) a ser modulada. Tais deleções parciais das regiões constantes podem melhorar características seleccionadas do anticorpo (semi-vida sérica), enquanto deixa intactas outras funções desejáveis associadas com o domínio constante em causa. Além disso, como aludido acima, as regiões constantes dos anticorpos divulgados podem ser sintéticas através da mutação ou substituição de um ou mais aminoácidos que aumentam o perfil da construção resultante. A este respeito, pode ser possível interromper a actividade proporcionada por um local de ligação conservado (e. g., ligação a Fc) enquanto se mantém substancialmente a configuração e o perfil imunogénico do anticorpo modificado. Ainda outros exemplos compreendem a adição de um ou mais aminoácidos à região constante para aumentar características desejáveis, tais como a função efectora ou para proporcionar mais ligação de citotoxina ou hidrato de carbono. Em tais exemplos pode ser desejável introduzir ou replicar sequências específicas derivadas de domínios de região constante seleccionados.

A presente divulgação também proporciona a utilização de anticorpos que compreendem, consistem essencialmente ou consistem de variantes (incluindo derivados) de moléculas de

anticorpo aqui descritas (e. g., as regiões  $V_H$  e/ou as regiões  $V_L$ ), cujos anticorpos ou os seus fragmentos se ligam imuno-especificamente a um polipéptido Sp35. As técnicas convencionais conhecidos dos especialistas na técnica podem ser utilizadas para introduzir mutações na sequência de nucleótidos que codifica uma molécula de ligação, incluindo, mas não limitadas a, mutagénese dirigida e mutagénese mediada por PCR que resulta em substituições de aminoácidos. De um modo preferido, as variantes (incluindo derivados) codificam menos de 50 substituições de aminoácidos, menos de 40 substituições de aminoácidos, menos de 30 substituições de aminoácidos, menos de 25 substituições de aminoácidos, menos de 20 substituições de aminoácidos, menos de 15 substituições de aminoácidos, menos de 10 substituições de aminoácidos, menos de 5 substituições de aminoácidos, menos de 4 substituições de aminoácidos, menos de 3 substituições de aminoácidos ou menos de 2 substituições de aminoácidos relativamente à região  $V_H$  de referência,  $V_H$ CDR1,  $V_H$ CDR2,  $V_H$ CDR3, região  $V_L$ ,  $V_L$ CDR1,  $V_L$ CDR2 ou  $V_L$ CDR3. Uma "substituição conservadora de aminoácido" é uma em que o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral com uma carga semelhante. As famílias de resíduos aminoacídicos que têm cadeias laterais com cargas semelhantes foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (e. g., lisina, arginina, histidina), cadeias laterais acídicas (e. g., ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (e. g., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (e. g., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (e. g., treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (e. g., tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Alternativamente, podem ser introduzidas mutações

aleatoriamente em toda ou apenas em parte da sequência codificante, tal como por mutagénesis de saturação, e os resultantes mutantes são rastreados para actividade biológica para identificar mutantes que retêm a actividade.

Por exemplo, é possível introduzir mutações apenas em regiões de estrutura ou apenas em regiões CDR de uma molécula de anticorpo. As mutações introduzidas podem ser mutações de sentido alterado neutras ou silenciosas, *i. e.*, têm pouco ou nenhum efeito na capacidade do anticorpo de se ligar ao antigénio. Estes tipos de mutações podem ser úteis para otimizar a utilização de codão, ou melhorar a produção de anticorpos do hibridoma. Alternativamente, as mutações de sentido alterado não neutras podem alterar a capacidade do anticorpo para se ligar ao antigénio. A posição da maioria das mutações de sentido alterado neutras ou silenciosas é provável ser nas regiões de estrutura, enquanto a posição da maioria das mutações de sentido alterado não neutras é provável ser nas CDR, embora isto não seja um requisito absoluto. Uma especialista na técnica seria capaz de conceber e testar moléculas mutantes com as propriedades desejadas e sem nenhuma alteração na actividade de ligação ao antigénio ou alteração na actividade de ligação (*e. g.*, melhorias na actividade de ligação ao antigénio ou alteração na especificidade do anticorpo). Após mutagénesis, a proteína codificada pode ser rotineiramente expressa e a actividade funcional e/ou biológica da proteína codificada pode ser determinada utilizando técnicas aqui descritas ou por técnicas de modificação rotineiras conhecidas no campo técnico.

## Proteínas de Fusão e Polipéptidos Conjugados e Anticorpos

Os polipéptidos Sp35 e os anticorpos para utilização nos métodos de tratamento aqui divulgados podem ser ainda fundidos recombinantemente a um polipéptido heterólogo no N- ou C-terminal ou conjugados quimicamente (incluindo conjugações covalentes e não covalentes) a polipéptidos ou a outras composições. Por exemplo, os polipéptidos ou anticorpos antagonistas de Sp35 podem ser fundidos recombinantemente ou conjugados a moléculas úteis como marcadores em ensaios de detecção e a moléculas efectoras, tais como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionuclídeos ou toxinas. Ver, *e. g.*, publicações PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; Patente U.S. N° 5314995; e documento EP 396387.

Os polipéptidos e anticorpos antagonistas de Sp35 para utilização nos métodos de tratamento aqui divulgados incluem derivados que são modificados, *i. e.*, pela ligação covalente de qualquer tipo de molécula de modo que a ligação covalente não previne o polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35 de inibir a função biológica de Sp35. Por exemplo, mas não a título de limitação, os polipéptidos e anticorpos antagonistas de Sp35 da presente divulgação podem ser modificados, *e. g.*, por glicosilação, acetilação, pegilação, fosfilação, fosforilação, amidação, derivatização por grupos de protecção/bloqueamento conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligando celular ou outra proteína, etc. Qualquer de numerosas modificações químicas pode ser realizada por técnicas conhecidas, incluindo, mas não limitadas a, clivagem química específica, acetilação, formilação, síntese metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, os derivados podem conter um ou mais aminoácidos não clássicos.

Os polipéptidos e anticorpos antagonistas de Sp35 para utilização nos métodos de tratamento aqui divulgados podem ser compostos de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas ou ligações peptídicas modificadas, *i. e.*, isoésteres peptídicos, e podem conter aminoácidos, além dos 20 aminoácidos codificados por genes. Os polipéptidos e anticorpos antagonistas de Sp35 podem ser modificados por processos naturais, tal como processamento pós-tradução, ou por técnicas de modificação química que são bem conhecidas no campo técnico. Tais modificações são bem descritas em textos básicos e em monografias mais detalhadas, assim como numa volumosa literatura de investigação. As modificações podem ocorrer em qualquer local no polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35, incluindo a estrutura peptídica, nas cadeias laterais do aminoácidos e nos terminais amino ou carboxilo, ou em unidades, tal como hidratos de carbono. Deve ser entendido que o mesmo tipo de modificação pode estar presente no mesmo ou em vários graus em diversos locais num dado polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35. Além disso, um dado polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35 pode conter muitos tipos de modificações. Os polipéptidos ou anticorpos antagonistas de Sp35 podem ser ramificados, por exemplo, como resultado de ubiquitinação, e podem ser cíclicos, com ou sem ramificação. Os polipéptidos ou anticorpos antagonistas de Sp35 cíclicos, ramificados e ramificados cíclicos podem resultar de processos naturais de pós-tradução ou podem produzidos por métodos sintéticos. As modificações incluem acetilação, acilação, ADP-ribosilação, amidação, ligação covalente de flavina, ligação covalente de uma unidade hémica, ligação covalente de um nucleótido ou derivado de nucleótido, ligação covalente de um lípido ou derivado de lípido, ligação covalente de fosfatidilinositol, reticulação, ciclização, formação de ligação persulfureto, desmetilação, formação de reticulações covalentes, formação de cisteína, formação de



piroglutamato, formilação, gama-carboxilação, glicosilação, formação de âncora de GPI, hidroxilação, iodinação, metilação, miristoilação, oxidação, pegilação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, racemização, selenoilação, sulfatação, adição mediada por ARN de transferência de aminoácidos a proteínas, tais como arginilação e ubiquitinação (ver, por exemplo, *Proteins - Structure And Molecular Properties*, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nova Iorque 2<sup>a</sup> Ed., (1993); *Posttranslational Covalent Modification Of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nova Iorque, pg. 1-12 (1983); Seifter et al., *Meth Enzymol* 182:626-646 (1990); Rattan et al., *Ann NY Acad Sci* 663:48-62 (1992)).

A presente divulgação também proporciona proteínas de fusão compreendendo, consistindo essencialmente ou consistindo de uma fusão de polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35 que iniba a função de Sp35. De um modo preferido, o polipéptido heterólogo ao qual o polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35 é fundido, é útil para a função ou é útil para direccionar o polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35. Em determinados exemplos da divulgação, um polipéptido antagonista de Sp35 solúvel, e. g., um polipéptido Sp35 compreendendo os domínios LRR, domínio de Ig, ou o domínio extracelular inteiro (que corresponde aos aminoácidos 34 a 532 da SEQ ID N°: 2), é fundido a uma unidade de polipéptido heterólogo para formar um polipéptido de fusão antagonista de Sp35. As proteínas e anticorpos de fusão antagonistas de Sp35 podem ser utilizadas para atingir vários objectivos, e. g., semi-vida sérica aumentada, biodisponibilidade melhorada, direccionamento *in vivo* a um tipo específico de órgão ou tecido, eficiência de expressão recombinante melhorada, secreção de célula hospedeira melhorada, facilidade de purificação e avidéz mais elevada. Dependendo do objectivo ou objectivos a serem atingidos, a unidade heteróloga

pode ser inerte ou biologicamente activa. Além disso, pode ser escolhido que esta seja fundida estavelmente ao polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35 ou que seja clivável, *in vitro* ou *in vivo*. As unidades heterólogas para realizar estes outros objectivos são conhecidas na técnica.

Como uma alternativa à expressão de um polipéptido ou anticorpo de fusão antagonista de Sp35, uma unidade heteróloga escolhido pode ser pré-formada e quimicamente conjugada ao polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35. Na maioria dos casos, uma unidade heteróloga escolhida funcionará de modo semelhante, se fundida ou conjugada ao polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35. Deste modo, na seguinte discussão de sequências de aminoácidos heterólogas, salvo indicação em contrário, é para ser entendido que a sequência heteróloga pode ser ligada ao polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35 na forma de uma proteína de fusão ou como um conjugado químico.

Os polipéptidos farmacologicamente activos, tais como polipéptidos ou anticorpos antagonistas de Sp35, apresentam frequentemente rápida eliminação *in vivo*, necessitando de grandes doses para atingir concentrações terapêuticamente eficazes no corpo. Além disso, os polipéptidos menores do que cerca de 60 kDa sofrem potencialmente de filtração glomerular, o que, por vezes, conduz a nefrotoxicidade. A fusão ou conjugação de polipéptidos relativamente pequenos, tais como polipéptidos ou anticorpos antagonistas de Sp35, pode ser utilizada para reduzir ou evitar o risco de tal nefrotoxicidade. São conhecidas várias sequências de aminoácidos heterólogas, *i. e.*, unidades ou "veículos" polipeptídicos para aumentar a estabilidade *in vivo*, *i. e.*, semi-vida sérica, de polipéptidos terapêuticos.

Devido à sua longa semi-vida, larga distribuição *in vivo* e ausência de função enzimática ou imunológica, a albumina de soro humano (HSA) essencialmente de tamanho total, ou um fragmento de HSA, é utilizado geralmente como uma unidade heteróloga. Através da aplicação de métodos e materiais tal como aqueles ensinados em Yeh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1904-08 (1992) e Syed *et al.*, *Blood* 89: 3243-52 (1997), a HSA pode ser utilizada para formar um polipéptido ou anticorpo ou conjugado de polipéptido/anticorpo de fusão antagonista de Sp35 que apresenta actividade farmacológica devido à unidade Sp35, enquanto apresenta uma estabilidade *in vivo* significativamente aumentada, *e. g.*, 10 vezes a 100 vezes mais alta. O C-terminal da HSA pode ser fundido ao N-terminal da unidade Sp35 solúvel. Uma vez que a HSA é uma proteína naturalmente segregada, a sequência de sinal de HSA pode ser explorada para obter secreção da proteína de fusão Sp35 solúvel no meio de cultura celular, quando a proteína de fusão é produzida num sistema de expressão eucariótica, *e. g.*, de mamífero.

A sequência de sinal é um polinucleótido que codifica uma sequência de aminoácidos que inicia o transporte de uma proteína através da membrana do reticulo endoplasmático. As sequências de sinal úteis para construir uma imunofusina incluem sequências de sinal da cadeia leve de anticorpo, *e. g.*, anticorpo 14.18 (Gillies *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 125:191-202 (1989)), sequência de sinal de cadeia pesada de anticorpo, *e. g.*, a sequência de sinal da cadeia pesada de anticorpo MOPC141 (Sakano *et al.*, *Nature* 286: 5774 (1980)). Alternativamente, podem ser utilizadas outras sequências de sinal. Ver, *e. g.*, Watson, *Nucl. Acids Res.* 12: 5145 (1984). O péptido de sinal é clivado geralmente no lúmen do reticulo endoplasmático por peptidases de sinal. Isto resulta na secreção de uma proteína imunofusina contendo a região Fc e a unidade Sp35 solúvel.

Em alguns exemplos, a sequência de ADN pode codificar um local de clivagem proteolítica entre a cassete de secreção e a unidade Sp35 solúvel. Tal local de clivagem pode proporcionar, e. g., a clivagem proteolítica da proteína de fusão codificada, separando assim o domínio de Fc da proteína alvo. Os locais de clivagem proteolítica úteis incluem sequência de aminoácidos reconhecidas por enzimas proteolíticas, tais como tripsina, plasmina, trombina, factor Xa ou enterocinase K.

A cassete de secreção pode ser incorporada num vector de expressão replicável. Os vectores úteis incluem ácidos nucleicos lineares, plasmídeos, fagemídeos, cosmídeos e semelhantes. Um vector de expressão exemplificativo é pdC, em que a transcrição do ADN de imunofusina é colocada sob controlo do intensificador e promotor do citomegalovírus humano. Ver, e. g., Lo et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1088:712 (1991); e Lo et al., *Protein Engineering* 11:495-500 (1998). Uma célula hospedeira apropriada pode ser transformada ou transfectada com um ADN que codifica um polipéptido Sp35 solúvel e utiliza para a expressão e secreção do polipéptido Sp35 solúvel. As células hospedeiras que são tipicamente utilizadas incluem células imortais de hibridoma, células de mieloma, células 293, células de ovário de hamster Chinês (CHO), células Hela e células COS.

Num exemplo, um polipéptido Sp35 solúvel é fundido a uma região de charneira e Fc, i. e., a porção C-terminal de uma região constante de cadeia pesada de Ig. As vantagens potenciais de uma fusão Sp35-Fc incluem solubilidade, estabilidade *in vivo* e multivalência, e. g., dimerização. A região Fc utilizada pode ser uma região Fc de IgA, IgD ou IgG (charneira-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3). Alternativamente, pode ser uma região Fc de IgE ou IgM (charneira-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3-C<sub>H</sub>4). Uma região Fc de IgG é geralmente utilizada, e. g., região Fc de IgG<sub>1</sub> ou região Fc de IgG<sub>4</sub>. Num

exemplo, uma sequência que começa na região de charneira imediatamente a montante do local de clivagem da papaína que define Fc de IgG quimicamente (i. e., resíduo 216, tomando o primeiro resíduo da região constante da cadeia pesada como sendo 114 de acordo com o sistema de Kabat), ou locais análogos de outras imunoglobulinas é utilizado na fusão. O local preciso em que a fusão é realizada não é crítico; locais particulares são bem conhecidos e podem ser seleccionados de modo a optimizarem a actividade biológica, secreção ou características de ligação da molécula. Os materiais e métodos para construir e expressar ADN que codifica fusões de Fc são conhecidos na técnica e podem ser aplicados para obter fusões Sp35 solúveis sem experimentação supérflua. Alguns exemplos da divulgação utilizam uma proteína de fusão Sp35 tal como aquelas descritas em Capon *et al.*, Patente U.S. Nº 5428130 e 5565335.

As regiões Fc de tipo selvagem, totalmente intactas, apresentam funções efectoras que são normalmente desnecessárias e indesejadas numa proteína de fusão Fc utilizada nos métodos da presente divulgação. Deste modo, determinados locais de ligação são tipicamente removidos da região Fc durante a construção da cassette de secreção. Por exemplo, uma vez que a co-expressão com a cadeia leve é desnecessária, o local de ligação para a proteína de ligação à cadeia pesada, Bip (Hendershot *et al.*, *Immunol. Today* 8:111-14 (1987)), é removido do domínio C<sub>H</sub>2 da região Fc de IgE, de modo que este local não interfira com a secreção eficiente da imunofusina. As sequências do domínio transmembranar, tal como aquelas presentes em IgM, geralmente são também removidas.

A região Fc de IgG<sub>1</sub> é a mais frequentemente utilizada. Alternativamente, a região Fc das outras subclasses de gama imunoglobulina (gama-2, gama-3 e gama-4) é utilizada na cassette

de secreção. A região Fc de IgG<sub>1</sub> da imunoglobulina gama-1 é utilizada geralmente na cassette de secreção e inclui, pelo menos, parte da região de charneira, da região C<sub>H</sub>2 e da região C<sub>H</sub>3. Em alguns exemplos, a região Fc da imunoglobulina gama-1 é um Fc com C<sub>H</sub>2 removido, que inclui parte da região de charneira e da região C<sub>H</sub>3, mas não a região C<sub>H</sub>2. Um Fc com C<sub>H</sub>2 removido foi descrito por Gillies *et al.*, *Hum. Antibod. Hybridomas* 1:47 (1990). Em alguns exemplos, é utilizada a região Fc de um de IgA, IgD, IgE ou IgM.

As proteínas de fusão Sp35-Fc podem ser construídas em diversas configurações diferentes. Numa configuração o C-terminal da unidade Sp35 solúvel é fundido directamente ao N-terminal da unidade de charneira de Fc. Numa configuração ligeiramente diferente, um polipéptido curto, *e. g.*, 2-10 aminoácidos, é incorporado na fusão entre o N-terminal da unidade Sp35 solúvel e o C-terminal da unidade Fc. Tal ligante proporciona flexibilidade conformacional, que pode melhorar a actividade biológica em algumas circunstâncias. Se uma porção suficiente da região de charneira for retida na unidade Fc, a fusão Sp35-Fc irá dimerizar, formando assim a uma molécula divalente. Uma população homogénea de fusões FC monoméricas irá produzir dímeros bivalentes monoespecíficos. Uma mistura de duas fusões Fc monoméricas, cada tendo uma especificidade diferente irá produzir dímeros bivalentes biespecíficos.

Qualquer de uma variedade de ligantes de reticulação que contêm um grupo amino-reactivo correspondente e um grupo tio-reactivo pode ser utilizado para ligar polipéptidos antagonistas de Sp35 a albumina sérica. Os exemplos de ligantes adequados incluem ligantes de reticulação amino-reactivos que introduzem uma maleimida tio-reactiva, *e. g.*, SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS e GMBS. Outros ligantes adequados

introduzem um grupo haloacetato tio-reactivo, e. g., SBAP, SIA, SIAB. Os ligantes que proporcionam um tiol protegido ou não protegido para reacção com grupos sulfidrílicos para produzir uma ligação reduzível incluem SPDP, SMPT, SATA e SATP. Tais reagentes estão comercialmente disponíveis (e. g., Pierce Chemicals).

A conjugação não tem que envolver o N-terminal de um polipéptido Sp35 solúvel ou a unidade tiol na albumina sérica. Por exemplo, as fusões Sp35-albumina solúvel podem ser obtidas utilizando técnicas de engenharia genética, em que a unidade Sp35 solúvel é fundida ao gene da albumina sérica no seu N-terminal, C-terminal ou em ambos.

Os polipéptidos Sp35 solúveis podem ser fundidos a péptidos heterólogos para facilitar a purificação ou identificação da unidade Sp35 solúvel. Por exemplo, um marcador de histidina pode ser fundido a um polipéptido Sp35 solúvel para facilitar a purificação utilizando meios cromatográficos comercialmente disponíveis.

Em alguns exemplos da divulgação, é utilizada uma construção de fusão Sp35 solúvel para aumentar a produção de uma unidade Sp35 solúvel em bactérias. Em tais construções, uma proteína bacteriana normalmente expressa e/ou segregada a um nível elevado, é utilizada como o parceiro de fusão do N-terminal de um polipéptido Sp35 solúvel. Ver, e. g., Smith *et al.*, *Gene* 67: 31 (1988); Hopp *et al.*, *Biotechnology* 6:1204 (1988); La Vallie *et al.*, *Biotechnology* 11:187 (1993).

Ao fundir uma unidade Sp35 solúvel nos terminais amino e carboxilo de um parceiro de fusão adequado, podem ser obtidas formas bivalentes ou tetravalentes de um polipéptido Sp35

solúvel. Por exemplo, uma unidade Sp35 solúvel pode ser fundida aos terminais amino e carboxilo de uma unidade Ig para produzir um polipéptido monomérico bivalente contendo duas unidades Sp35 solúveis. Após dimerização de dois destes monómeros, por virtude da unidade de Ig, é obtida uma forma tetravalente de uma proteína Sp35 solúvel. Tais formas multivalentes podem ser utilizadas para atingir afinidade de ligação aumentada para o alvo. As formas multivalentes de Sp35 solúvel também podem ser obtidas através da colocação de unidades Sp35 solúveis em tandem para formar concatâmeros, os quais podem ser utilizados isoladamente ou fundidos a um parceiro de fusão, tais como Ig ou HSA.

#### Polímeros Conjugados (que não polipéptidos)

Alguns exemplos da divulgação envolvem um polipéptido Sp35 ou anticorpo Sp35 solúvel em que um ou mais polímeros são conjugados (ligados covalentemente) ao polipéptido ou anticorpo Sp35. Os exemplos de polímeros adequados para tal conjugação incluem polipéptidos (discutidos acima), polímeros de açúcar e cadeias de polialquilenoglicol. Tipicamente, mas não necessariamente, um polímero é conjugado ao polipéptido Sp35 ou anticorpo Sp35 solúvel com o objectivo de melhorar um ou mais do seguinte: solubilidade, estabilidade ou biodisponibilidade.

A classe de polímero geralmente utilizada para conjugação a um polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35 é um polialquilenoglicol. O polietilenoglicol (PEG) é utilizado muito frequentemente. As unidades PEG, e. g., 1, 2, 3, 4 ou 5 polímeros de PEG, podem ser conjugadas a cada polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35 para aumentar a semi-vida sérica, comparativamente ao polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35



isoladamente. As unidades PEG são não antigénicas e essencialmente biologicamente inertes. As unidades PEG utilizadas na prática da divulgação podem ser ramificadas ou não ramificadas.

O número de unidades PEG ligadas ao polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35 e o peso molecular das cadeias de PEG individuais pode variar. Em geral, quanto mais elevado for o peso molecular do polímero, menor é o número de cadeias de polímero ligadas ao polipéptido. Geralmente, a massa total do polímero ligado ao polipéptido ou anticorpo do antagonista de Sp35 é desde 20 kDa a 40 kDa. Assim, se uma cadeia de polímero for ligada, o peso molecular da cadeia é geralmente 20-40 kDa. Se duas cadeias forem ligadas, o peso molecular de cada cadeia é geralmente 10-20 kDa. Se três cadeias forem ligadas, o peso molecular é geralmente 7-14 kDa.

O polímero, *e. g.*, PEG, pode ser ligado ao polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35 através de qualquer grupo reactivo exposto adequado no polipéptido. O grupo ou os grupos reactivos expostos podem ser, *e. g.*, um grupo amino N-terminal ou o grupo amino épsilon de um resíduo interno de lisina, ou ambos. Um polímero activado pode reagir e ligar-se covalentemente em qualquer grupo amino livre no polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35. Também podem ser utilizados como grupos reactivos para ligação do polímero, grupos carboxílicos livres, grupos carbonilo apropriadamente activados, hidroxilo, guanidilo, imidazole, unidades oxidadas de hidrato de carbono e grupos mercapto do polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35 (se disponível).

Numa reacção de conjugação, é tipicamente utilizado desde cerca de 1,0 a cerca de 10 moles de polímero activado por mole de polipéptido, dependendo da concentração do polipéptido. Geralmente, a razão escolhida representa um balanço entre maximizar a reacção enquanto se minimiza as reacções secundárias (frequentemente não específicas) que podem danificar a actividade farmacológica desejada do polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35. De um modo preferido, é retida, pelo menos, 50% da actividade biológica (como demonstrado, *e. g.*, em qualquer dos ensaios aqui descritos ou conhecidos na técnica) do polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35 e, de um modo muito preferido, é retida quase 100%.

O polímero pode ser conjugado ao polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35 utilizando química convencional. Por exemplo, uma unidade polialquilenoglicol pode ser acoplada a um grupo amino épsilon de lisina do polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35. A ligação à cadeia lateral da lisina pode ser realizada com um éster activo de N-hidroxilsuccinimida (NHS), tais como succinato de succinimidilo (SS-PEG) e propionato de succinimidilo de PEG (SPA-PEG). As unidades adequadas de polialquilenoglicol incluem, *e. g.*, carboximetil-NHS e norleucina-NHS, SC. Estes reagentes estão comercialmente disponíveis. Os ligantes PEG amino-reactivos adicionais podem ser substituídos pela unidade succinimidilo. Estes incluem, *e. g.*, isotiocianatos, nitrofenilcarbonatos (PNP), epóxidos, carbonatos de benzotriazole, SC-PEG, tresilato, aldeído, epóxido, carbonilimidazole e carbonato de PNP. As condições são geralmente optimizadas para maximizar a selectividade e a extensão da reacção. Tal optimização de condições de reacção está dentro do conhecimento geral na matéria.

A PEGilação pode ser realizada através de qualquer das reacções de PEGilação conhecidas na técnica. Ver, e. g., *Focus on Growth Factors* 3:4-10 (1992), e Pedidos de Patente Europeia EP 0154316 e EP 0401384. A PEGilação pode ser realizada utilizando uma reacção de acilação ou uma reacção de alquilação com uma molécula reactiva de polietilenoglicol (ou um polímero hidrossolúvel analogamente reactivo).

A PEGilação por acilação envolve geralmente fazer reagir um derivado de éster activo de polietilenoglicol. Qualquer molécula de PEG reactiva pode ser utilizada na PEGilação. O PEG esterificado a N-hidroxissuccinimida (NHS) é um éster activado de PEG frequentemente utilizado. Como aqui utilizado, "acilação" inclui, sem limitação, os seguintes tipos de ligações entre a proteína terapêutica e um polímero hidrossolúvel, tal como PEG: amida, carbamato, uretano e semelhantes. Ver, e. g., *Bioconjugate Chem.* 5: 133-140, 1994. Os parâmetros de reacção são geralmente seleccionados para evitar condições de temperatura, solvente e pH que danifiquem ou inactivem o polipéptido Sp35 solúvel.

Geralmente, a ligação de conexão é uma amida e, tipicamente, pelo menos 95% do produto resultante é mono-, di- ou tri-PEGilado. Contudo, algumas espécies com graus mais elevados de PEGilação podem ser formadas em quantidades dependendo das condições de reacção específicas utilizadas. Opcionalmente, as espécies PEGiladas purificadas são separadas da mistura, particularmente espécie que não reagiram, por métodos convencionais de purificação, incluindo, e. g., diálise, precipitação com sal, ultrafiltração, cromatografia de permuta iónica, cromatografia de filtração gel, cromatografia de permuta hidrofóbica e electroforese.

A PEGilação por alquilação envolve geralmente reagir um derivado aldeído terminal de PEG com o polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35 na presença de um agente redutor. Além disso, podem-se manipular as condições de reacção para favorecer apenas a PEGilação substancialmente no grupo amino N-terminal do polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35, *i. e.*, uma proteína mono-PEGilada. Em qualquer dos casos de mono-PEGilação ou poli-PEGilação, os grupos PEG são tipicamente ligados à proteína através de um grupo  $-C_{H2}-NH-$ . Com referência particular ao grupo  $-C_{H2}-$ , este tipo de ligação é conhecido como uma ligação "alquilo".

A derivatização através de alquilação redutora para produzir um produto mono-PEGilado direccionado para o N-terminal, explora a reactividade diferencial de diferentes tipos de grupos amino primários (lisina *versus* N-terminal) disponíveis para derivatização. A reacção é realizada a um pH que permita tirar vantagem das diferenças de pKa entre os grupos amino épsilon dos resíduos de lisina e dos grupos amino N-terminal da proteína. Através de tal derivatização selectiva, a ligação de um polímero hidrossolúvel que contenha um grupo reactivo, tal como um aldeído, a uma proteína é controlada: a conjugação com o polímero ocorre predominantemente no N-terminal da proteína e não ocorre nenhuma modificação significativa de outros grupos reactivos, tal como grupos amino da cadeia lateral da lisina.

As moléculas de polímero utilizadas nas abordagens de acilação e alquilação são seleccionadas de entre polímeros hidrossolúveis. O polímero seleccionado é tipicamente modificado para ter um único grupo reactivo, tais como um éster activo para acilação ou um aldeído para alquilação, de modo que o grau de polimerização possa ser controlado, como proporcionado nos presentes métodos. Um aldeído PEG reactivo exemplificativo é

propionaldeído de polietilenoglicol que é estável em água, ou os seus derivados mono alcoxilo ou ariloxilo C1-C10 (ver, e. g., Harris *et al.*, Pat. U.S. N° 5252714). O polímero pode ser ramificado ou não ramificado. Para as reacções de acilação, o ou os polímeros têm tipicamente um único grupo éster reactivo. Para a alquilação redutora, o ou os polímeros seleccionados têm tipicamente um único grupo aldeído reactivo. Geralmente, o polímero hidrossolúvel não será seleccionado de resíduos glicosilo de ocorrência natural, porque estes são geralmente produzidos mais convenientemente por sistemas de expressão recombinante de mamíferos.

Os métodos para preparar um polipéptido ou anticorpo Sp35 solúvel PEGilado incluem geralmente os passos de (a) fazer reagir um polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35 com polietilenoglicol (tal como um derivado éster ou aldeído reactivo de PEG) sob condições em que a molécula se torna ligada a um ou mais grupos PEG, e (b) obter um ou mais produtos de reacção. Em geral, as condições óptimas de reacção para as reacções de acilação serão determinadas caso a caso, com base em parâmetros conhecidos e no resultado desejado. Por exemplo, uma maior razão de PEG para proteína, conduz geralmente a uma maior percentagem de produto poli-PEGilado.

A alquilação redutora para produzir uma população substancialmente homogénea de mono-polímero/anticorpo Sp35 ou polipéptido Sp35 solúvel inclui geralmente os passos de: (a) fazer reagir uma proteína ou polipéptido Sp35 solúvel com uma molécula reactiva de PEG sob condições de alquilação redutora, num pH adequado para permitir modificação selectiva do grupo amino N-terminal do polipéptido ou anticorpo; e (b) obter um ou mais produtos de reacção.

Para uma população substancialmente homogénea de monopolímero/polipéptido Sp35 ou anticorpo de Sp35 solúvel, as condições reaccionais de alquilação redutora são aquelas que permitem a ligação selectiva da unidade de polímero hidrossolúvel ao N-terminal do polipéptido ou anticorpo. Tais condições reaccionais geralmente proporcionam diferenças de pKa entre os grupos amino da cadeia lateral da lisina e o grupo amino N-terminal. Para objectivos da presente divulgação, o pH está geralmente na gama de 3-9, tipicamente, 3-6.

Os polipéptidos ou anticorpos Sp35 solúveis incluem um marcador, e. g., uma unidade que pode ser subsequentemente libertada por proteólise. Assim, a unidade de lisina pode ser selectivamente modificada fazendo reagir primeiramente um marcador-His modificado com um ligante de baixo peso molecular, tal como o reagente de Traut (Pierce) que irá reagir com a lisina e com o N-terminal, e depois libertando o marcador-His. O polipéptido conterà depois um grupo SH livre que pode ser selectivamente modificado com um grupo principal tio-reactivo contendo PEG, tais como um grupo maleimida, um grupo vinilsulfona, um grupo haloacetato ou um SH livre ou protegido.

O reagente de Traut pode ser substituído com qualquer ligante que estabeleça um local específico para ligação do PEG. Por exemplo, o reagente de Traut pode ser substituído com SPDP, SMPT, SATA ou SATP (Pierce). De modo semelhante, poder-se-ia reagir a proteína com um ligante amino-reactivo que introduz uma maleimida (por exemplo, SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS ou GMBS), um grupo haloacetato (SBAP, SIA, SIAB) ou um grupo vinilsulfona e fazer reagir o produto resultante com um PEG que contém um SH livre.

Em alguns exemplos, a unidade de polialquilenoglicol é acoplada a um grupo cisteína do polipéptido ou anticorpo antagonista de Sp35. O acoplamento pode ser efectuado utilizando, e. g., um grupo maleimida, um grupo vinilsulfona, um grupo haloacetato ou um grupo tiol.

Opcionalmente, o polipéptido ou anticorpo Sp35 solúvel é conjugado à unidade de polietilenoglicol através de uma ligação lábil. A ligação lábil pode ser clivada, e. g., em hidrólise bioquímica, proteólise ou clivagem sulfidrílica. Por exemplo, a ligação pode ser clivada sob condições *in vivo* (fisiológicas).

As reacções podem ocorrer através de qualquer método adequado utilizado para fazer reagir materiais biologicamente activos com polímeros inertes, geralmente a cerca de pH 5-8, e. g., pH 5, 6, 7 ou 8, se os grupos reactivos estiverem no grupo amino alfa no N-terminal. Geralmente o processo envolve a preparação de um polímero activado e posteriormente fazer reagir a proteína com o polímero activado para produzir a proteína solúvel adequada para a formulação.

#### Antagonistas do Polinucleótido Sp35

Exemplos específicos compreendem um método de tratamento de um distúrbio de desmielinização ou dismielinização, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um antagonista do polinucleótido Sp35 que compreende uma molécula de ácido nucleico que se liga especificamente a um polinucleótido que codifica Sp35. O antagonista do polinucleótido Sp35 previne a expressão de Sp35 (silenciamento). Os antagonistas do polinucleótido Sp35 incluem, mas não estão limitados a, moléculas anti-sentido, ribozimas, siARN, shARN e

ARNi. Tipicamente, tais moléculas de ligação são administradas separadamente ao animal (ver, por exemplo, O'Connor, J. *Neurochem.* 56: 560 (1991)), mas tais moléculas de ligação podem também ser expressas *in vivo* a partir de polinucleótidos incorporados por uma célula hospedeira e expressos *in vivo*. Ver também *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, FL (1988).

O ARNi refere-se à expressão de um ARN que interfere com a expressão do ARNm alvo. Especificamente, o ARNi silencia um gene alvo por interação com o ARNm específico (e. g. Sp35) através de um siARN (ARN de interferência curto). O complexo de ARN em cadeia dupla é depois direccionado para degradação pela célula. As moléculas adicionais de ARNi incluem ARN de gancho-de-cabelo pequeno (shARN); também gancho-de-cabelo pequeno de interferência. A molécula de shARN contém sequências de sentido e anti-sentido de um gene alvo ligadas por uma ansa. O shARN é transportado do núcleo para o citoplasma, é degradado em conjunto com ARNm. Os promotores Pol III ou U6 podem ser utilizados para expressar ARN para ARNi.

O ARNi é mediado por moléculas de ARN de cadeia dupla (dsARN) que têm homologia específica de sequência as seus ARNm "alvo" (Caplen *et al.*, *Proc Acad Natl Sci USA* 98:9742-9747, 2001). Estudos bioquímicos em lisados livres de célula de drosófila indicam que os mediadores de silenciamento génico dependente de ARN são duplexes de ARN de "interferência curto" de 21-25 nucleótidos (siARN). Desta forma, as moléculas de siARN são vantajosamente utilizadas nos métodos da presente divulgação. Os siARN são derivados do processamento de dsARN por uma RNase conhecida como DICER (Bernstein *et al.*, *Nature* 409:363-366, 2001). Parece que os produtos duplexes de siARN são



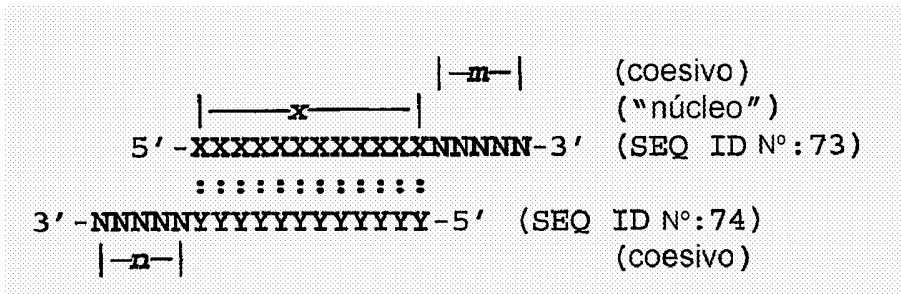
recrutados num complexo multi-proteína siARN denominado RISC (Complexo de Silenciamento Induzido por ARN). Sem se pretender estar limitado por qualquer teoria particular, crê-se que um RISC é guiado a um ARNm alvo, onde a duplex de siARN interage de um modo específico de sequência para mediar a clivagem de um modo catalítico (Bernstein *et al.*, *Nature* 409: 363-366, 2001; Boutla *et al.*, *Curr Biol* 11: 1776-1780, 2001).

O ARNi tem sido utilizado para analisar a função génica e para identificar genes essenciais em células de mamíferos (Elbashir *et al.*, *Methods* 26: 199-213, 2002; Harborth *et al.*, *J Cell Sci* 114:4557-4565, 2001), incluindo, a título de exemplo não limitativo, neurónios (Krichevsky *et al.*, *Proc Acad Natl Sci USA* 99: 11926-11929, 2002). O ARNi está também a ser avaliado para modalidades terapêuticas, tais como inibir ou bloquear a infecção, replicação e/ou crescimento de vírus, incluindo sem limitação poliovírus (Gitlin *et al.*, *Nature* 418: 379-380, 2002) e HIV (Capodici *et al.*, *J Immunol* 169: 5196-5201, 2002), e reduzir a expressão de oncogenes (e. g., o gene bcr-abl; Scherr *et al.*, *Blood* publicado electronicamente em 26 de Setembro, antes da publicação em papel, 2002). O ARNi foi utilizado para modular a expressão génica em embriões de mamífero (murganho) e anfíbio (*Xenopus*) (respectivamente, Calegari *et al.*, *Proc Acad Natl Sci USA* 99:14236-14240, 2002; e Zhou, *et al.*, *Nucleic Acids Res* 30:1664-1669, 2002), e em murganhos pós-nascimento (Lewis *et al.*, *Nat Genet* 32: 107-108, 2002), e para reduzir a expressão transgénica em murganhos transgénicos adultos (McCaffrey *et al.*, *Nature* 418:38-39, 2002). Os métodos foram descritos para determinar a eficácia e a especificidade de siARN em cultura celular e *in vivo* (ver, e. g., Bertrand *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 296:1000-1004, 2002; Lassus *et al.*, *Sci STKE*

2002(147):PL13, 2002; e Leirdal *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 295:744-748, 2002).

As moléculas que medeiam o ARNi, incluindo sem limitação siARN, podem ser produzidas *in vitro* por síntese química (Hohjoh, *FEBS Lett* 521:195-199, 2002), hidrólise de dsARN (Yang *et al.*, *Proc Acad Natl Sci USA* 99: 9942-9947, 2002), por transcrição *in vitro* com T7 ARN polimerase (Donzeet *et al.*, *Nucleic Acids Res* 30:e46, 2002; Yu *et al.*, *Proc Acad Natl Sci USA* 99: 6047-6052, 2002), e por hidrólise de ARN de cadeia dupla utilizando uma nucleasse, tal como a RNase III de *E. coli* (Yang *et al.*, *Proc Acad Natl Sci USA* 99:9942-9947, 2002).

As moléculas de siARN podem também ser formadas por emparelhamento entre si de dois oligonucleótidos, que têm tipicamente a seguinte estrutura geral, a qual inclui porções de cadeia dupla e de cadeia simples:



Em que N, X e Y são nucleótidos; X pontes de hidrogénio para Y; ":" significa uma ponte de hidrogénio entre duas bases; x é inteiro natural que tem um valor entre 1 e cerca de 100; e m e n são números inteiros que têm, independentemente, valores entre 0 e cerca de 100. Em alguns exemplos, N, X e Y são independentemente A, G, C e T ou U. Podem estar presentes bases e nucleótidos de ocorrência não natural, particularmente no caso de siARN sintético (*i. e.*, o produto do emparelhamento de dois oligonucleótidos). A secção central de cadeia dupla é denominada

o “núcleo” e tem pares de bases (pb) como unidades de medida; as porções de cadeia simples são coesivas, tendo nucleótidos (nt) como unidades de medida. As porções coesivas mostradas são coesivas 3', mas as moléculas com porções coesivas 5' estão também no âmbito da divulgação. Estão também no âmbito da divulgação moléculas de siARN sem porções coesivas (*i. e.*,  $m = 0$  e  $n = 0$ ), e aquelas que têm uma porção coesiva num lado do núcleo mas não no outro (*e. g.*,  $m = 0$  e  $n \geq 1$ , ou vice-versa).

Inicialmente, a tecnologia de ARNi não pareceu ser prontamente aplicável aos sistemas mamíferos. Isto é porque, nos mamíferos, o dsARN activa a proteína cinase activada por dsARN (PKR) resultando numa cascata apoptótica da cascata e morte celular (Der *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3279–3283, 1997). Além disso, já há muito se sabe que o dsARN activa a cascata do interferão em células de mamífero, o que pode também conduzir a fisiologia celular alterada (Colby *et al.*, *Annu. Rev. Microbiol.* 25:333, 1971; Kleinschmidt *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.* 41: 517, 1972; Lampson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58L782, 1967; Lomniczi *et al.*, *J. Gen Virol.* 8:55, 1970; e Younger *et al.*, *J. Bacteriol.* 92:862, 1966). Contudo, a activação mediada por dsARN da PKR e as cascatas de interferão requerem dsARN mais longo do que cerca de 30 pares de bases. Pelo contrário, foi demonstrado que o dsARN com menos do que 30 pares de bases de comprimento causa ARNi em célula de mamífero (Caplen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9742–9747, 2001). Assim, é esperado que efeitos indesejáveis, não específicos, associados com moléculas mais longas de dsARN possam ser evitadas através da preparação de ARN curto que está substancialmente livre de dsARN mais longos.

Referências a respeito de siARN: Bernstein *et al.*, *Nature* 409:363-366, 2001; Boutla *et al.*, *Curr Biol* 11: 1776-1780, 2001; Cullen, *Nat Immunol.* 3:597-599, 2002; Caplen *et al.*, *Proc Acad Natl Sci USA* 98: 9742-9747, 2001; Hamilton *et al.*, *Science* 286: 950-952, 1999; Nagase *et al.*, *DNA Res.* 6:63-70, 1999; Napoli *et al.*, *Plant Cell* 2:279-289, 1990; Nicholson *et al.*, *Mamm. Genome* 13: 67-73, 2002; Parrish *et al.*, *Mol Cell* 6:1077-1087, 2000; Romano *et al.*, *Mol Microbiol* 6:3343-3353, 1992; Tabara *et al.*, *Cell* 99:123-132, 1999; e Tuschl, *Chembiochem.* 2:239-245, 2001.

Paddison *et al.* (*Genes & Dev.* 16: 948-958, 2002) utilizaram pequenas moléculas de ARN enroladas em gancho-de-cabelo como meios para afectar o ARNi. Desta forma, tais moléculas de ARN de gancho-de-cabelo pequeno (shARN) são também utilizadas vantajosamente nos métodos da divulgação. O comprimento da haste e ansa de shARN funcionais varia; os comprimentos da hança podem variar desde cerca de 25 até cerca de 30 nt sem afectar a actividade de silenciamento e o tamanho da ansa pode variar entre 4 até cerca de 25 nt sem afectar a actividade de silenciamento. Sem se pretender estar limitado por qualquer teoria particular, crê-se que estes shARN se assemelham aos produtos do dsARN da RNase DICER e, em qualquer evento, têm a mesma capacidade para inibir a expressão de um gene específico.

Em alguns exemplos da divulgação, o shARN é expresso a partir de um vector lentiviral (pLL3.7) como descrito no Exemplo 1.

A tecnologia anti-sentido pode ser utilizada para controlar a expressão génica através de ADN ou ARN anti-sentido, ou através da formação de tripla-hélice. As técnicas anti-sentido são discutidas, por exemplo, em Okano, *J. Neurochem.* 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene

Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988). A formação de tripla hélice é discutida, por exemplo, em Lee *et al.*, *Nucleic Acids Research* 6: 3073 (1979); Cooney *et al.*, *Science* 241: 456 (1988); e Dervan *et al.*, *Science* 251:1300 (1991). Os métodos são baseados na ligação de um polinucleótido a um ADN complementar ou ARN.

Por exemplo, a porção codificante 5' de um polinucleótido que codifica Sp35 pode ser utilizada para conceber um oligonucleótido de ARN anti-sentido desde cerca de 10 a 40 pares de bases de comprimento. Um oligonucleótido de ADN é concebido para ser complementar a uma região do gene envolvida na transcrição, prevenindo assim a transcrição e a produção da proteína alvo. O oligonucleótido de ARN anti-sentido hibrida com o ARNm *in vivo* e bloqueia a tradução da molécula de ARNm no polipéptido alvo.

Num exemplo, os ácidos nucleicos anti-sentido específicos para o gene Sp35 são produzidos intracelularmente por transcrição a partir de uma sequência exógena. Por exemplo, um vector ou uma sua porção, é transcrito, produzindo um ácido nucleico anti-sentido (ARN). Tal vector pode permanecer episomal ou torna-se integrado cromossomicamente, desde que possa ser transcrito para produzir o ARN anti-sentido desejado. Tais vectores podem ser construídos por métodos de tecnologia de ADN recombinante, convencionais na técnica. Os vectores podem ser plasmídicos, virais ou outros conhecidos na técnica utilizada para replicação e expressão em células de vertebrados. A expressão da molécula anti-sentido pode ser através de qualquer promotor conhecido na técnica para actuar em vertebrados, de um modo preferido, células humanas, tal como aquelas aqui descritas.

A complementaridade absoluta de uma molécula anti-sentido, embora preferida, não é requerida. Uma sequência complementar a, pelo menos, uma porção de um ARN que codifica Sp35, significa uma sequência que tem suficiente complementaridade para ser capaz de hibridar com o ARN, formando uma duplex estável; ou pode ser ensaiada formação de triplex. A capacidade para hibridar dependerá do grau de complementaridade e do comprimento do ácido nucleico anti-sentido. Geralmente, quanto maior o ácido nucleico que hibrida, mais falsos emparelhamentos de base podem conter e ainda formar um duplex estável (ou triplex, se assim for o caso). O especialista na técnica poderá verificar um grau tolerável de falsos emparelhamentos por utilização de processos convencionais para determinar o ponto de fusão do complexo hibridado.

Oligonucleótidos que são complementares à extremidade 5' de um ARN mensageiro, e. g., a sequência 5' não traduzida até, e incluindo, o codão de iniciação AUG, devem trabalhar mais eficientemente na inibição da tradução. Contudo, foi demonstrado que as sequências complementares às sequências 3' não traduzidas dos ARNm são também eficazes na inibição da tradução de ARNm. Ver genericamente, Wagner, R., *Nature* 372: 333-335 (1994). Assim, os oligonucleótidos complementares a regiões não traduzidas, não codificantes, 5'- ou 3'-, poderiam ser utilizados numa abordagem anti-sentido para inibir a tradução de Sp35. Os oligonucleótidos complementares à região 5' não traduzida do ARNm devem incluir o complemento do codão de iniciação AUG. Os oligonucleótidos anti-sentido complementares às regiões codificantes de ARNm são inibidores menos eficientes da tradução mas poderiam ser utilizados de acordo com a divulgação. Os ácidos nucleicos anti-sentido devem ter, pelo menos, seis nucleótidos de comprimento e são, de um modo preferido, oligonucleótidos que variam desde 6 a cerca de

50 nucleótidos de comprimento. Em aspectos específicos, o oligonucleótido tem, pelo menos, 10 nucleótidos, pelo menos 17 nucleótidos, pelo menos 25 nucleótidos ou, pelo menos, 50 nucleótidos.

Os polinucleótidos para utilização dos métodos terapêuticos aqui divulgados podem ser ADN ou ARN ou misturas quiméricas ou derivados ou as suas versões modificadas, de cadeia simples ou cadeia dupla. O oligonucleótido pode ser modificado na unidade da base, na unidade de açúcar ou na estrutura de fosfato, por exemplo, para melhorar a estabilidade da molécula, hibridação, etc. O oligonucleótido pode incluir outros grupos apensos, tais como péptidos (e. g., para direccionar a receptores da célula hospedeira *in vivo*), ou agentes que facilitam o transporte através da membrana celular (ver, e. g., Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 6553-6556 (1989); Lemaitre *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:648-652 (1987)); Publicação PCT N° WO88/09810, publicada em 15 de Dezembro de 1988) ou a barreira hemato-encefálica (ver, e. g., publicação PCT N° WO89/10134, publicada em 25 de Abril de 1988), agentes de clivagem despoletados por hibridação. (ver, e. g., Krol *et al.*, *BioTechniques* 6: 958-976 (1988)) ou agentes intercalantes. (Ver, e. g., Zon, *Pharm. Res.* 5:539-549 (1988)). Para este fim, o oligonucleótido pode ser conjugado a outra molécula, e. g., um péptido, agente de reticulação despoletado por hibridação, agente de transporte, agente de clivagem despoletado por hibridação, etc.

Um oligonucleótido anti-sentido para utilização nos métodos terapêuticos aqui divulgados pode compreender, pelo menos, uma unidade de base modificada que é seleccionada do grupo incluindo, mas não limitado a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina,

4-acetilcitosina, 5-(carboxi-hidroxiimetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, di-hidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N-6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N-6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N-6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster do ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3(3-amino-3-N2-carboxipropil)uracilo (acp3)w e 2,6-diaminopurina.

Um oligonucleótido anti-sentido para utilização nos métodos terapêuticos aqui divulgados pode também compreender, pelo menos, uma unidade de açúcar modificada seleccionada do grupo incluindo, mas não limitada a, arabinose, 2-fluoroarabinose, xilulose e hexose.

Ainda noutro exemplo, um oligonucleótido anti-sentido para utilização nos métodos terapêuticos aqui divulgados compreende, pelo menos, uma estrutura de fosfato modificada seleccionada do grupo incluindo, mas não limitada a, um fosforotioato, um fosforoditioato, um fosforamidotioato, um fosforamidato, um fosfordiamidato, um metilfosfonato, um fosfotriéster alquílico e um formacetal ou um seu análogo.

Ainda noutro exemplo, um oligonucleótido anti-sentido para utilização nos métodos terapêuticos aqui divulgados é um oligonucleótido  $\alpha$ -anomérico. Um oligonucleótido  $\alpha$ -anomérico forma híbridos de cadeia dupla específicos com ARN complementar



em que, contrariamente à situação habitual, as cadeias correm paralelamente umas às outras (Gautier *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 15:6625-6641 (1987)). O oligonucleótido é um 2'-O-metilribonucleótido (Inoue *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 15:6131-6148 (1987)), ou um análogo quimérico de ARN-ADN (Inoue *et al.*, *FEBS Lett.* 215:327-330(1987)).

Os polinucleótidos da divulgação pode ser sintetizados por métodos convencionais conhecidos na técnica, *e. g.*, por utilização de um sintetizador de ADN automatizado (como estão comercialmente disponíveis a partir da Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como exemplos, os oligonucleótidos de fosforotioato podem ser sintetizados pelo método de Stein *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988), os oligonucleótidos de metilfosfonato podem ser preparados por utilização de suportes de polímero de vidro de poro controlado (Sarin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:7448-7451(1988)), etc.

As composições de polinucleótido para utilização nos métodos terapêuticos aqui divulgados incluem ainda ARN catalítico, ou uma ribozima (ver, *e. g.*, Publicação Internacional PCT WO 90/11364, publicada em 4 de Outubro de 1990; Sarver *et al.*, *Science* 247: 1222-1225 (1990)). A utilização de ribozimas *hammerhead* é preferida. As ribozimas *hammerhead* clivam ARNm em posições ditadas por regiões flanqueadoras que formam pares de bases complementares com o ARNm alvo. O único requisito é que o ARNm alvo tem a seguinte sequência de duas bases: 5'-UG-3'. A construção e produção de ribozimas *hammerhead* é bem conhecida na técnica e é descrita mais detalhadamente em Haseloff e Gerlach, *Nature* 334:585-591 (1988). De um modo preferido, a ribozima é manipulada de modo que o local de reconhecimento de clivagem esteja localizado próximo da extremidade 5' do ARNm alvo; *i. e.*,

para aumentar a eficiência e minimizar a acumulação intracelular de transcritos de ARNm não funcional.

Como na abordagem anti-sentido, as ribozimas para utilização nos métodos de diagnóstico e terapêuticos aqui divulgados são compostas de oligonucleótidos modificados (e. g., para estabilidade melhorada, direcionamento, etc.) e podem ser distribuídas às células que expressam Sp35 *in vivo*. As construções de ADN que codificam a ribozima podem ser introduzidas na célula do mesmo modo que acima descrito para a introdução de ADN anti-sentido. Um método preferido de distribuição envolve a utilização de uma construção de ADN que "codifica" a ribozima sob o controlo de um forte promotor constitutivo, tal como, por exemplo, o promotor pol III ou pol II, de modo que as células transfectadas irão produzir quantidades suficientes de ribozima para destruir mensagens de Sp35 endógenas e para inibir a tradução. Uma vez que as ribozimas são catalíticas, ao contrário das moléculas anti-sentido, é requerida uma concentração intracelular mais baixa para eficiência.

#### Vectores

Os vectores compreendendo ácidos nucleicos que codificam os antagonistas de Sp35 podem também ser utilizados para produzir antagonistas para utilização nos métodos da divulgação. A escolha do vector e das sequências de controlo da expressão, aos quais tais ácidos nucleicos estão operativamente ligados, depende das propriedades funcionais desejadas, e. g., da expressão proteica e da célula hospedeira a ser transformada.

Os elementos de controlo da expressão úteis para regular a expressão de uma sequência codificante ligada operativamente, são conhecidos na técnica. Os exemplos incluem, mas não estão limitados a, promotores indutíveis, promotores constitutivos, sinais de secreção e outros elementos reguladores. Quando um promotor indutível for utilizado, este pode ser controlado, e. g., por uma alteração no estado nutritivo ou uma alteração na temperatura, no meio da célula hospedeira.

O vector pode incluir um replicação procariótico, *i. e.*, uma sequência de ADN que tem a capacidade para dirigir a replicação autónoma e a manutenção da molécula de ADN recombinante extra-cromossomicamente numa célula hospedeira bacteriana. Tais replicões são bem conhecidos na técnica. Além disso, os vectores que incluem replicação procariótico podem também incluir um gene cuja expressão confere um marcador detectável, tal como uma resistência a fármaco. Os exemplos de genes bacterianos de resistência a fármaco são aqueles que conferem resistência à ampicilina ou tetraciclina.

Os vectores que incluem um replicação procariótico podem também incluir um promotor procariótico ou bacteriófago para dirigir a expressão das sequências génicas codificantes numa célula hospedeira bacteriana. As sequências promotoras compatíveis com hospedeiros bacterianos são tipicamente proporcionadas em vectores plasmídicos contendo locais de restrição convenientes para inserção de um segmento de ADN a ser expresso. Os exemplos de tais vectores plasmídicos são pUC8, pUC9, pBR322 e pBR329 (BioRad), pPL e pKK223 (Pharmacia). Qualquer hospedeiro procariótico adequado pode ser utilizado para expressar uma molécula de ADN recombinante que codifica uma proteína utilizada nos métodos da divulgação.

Para os objectivos desta divulgação, podem ser utilizados numerosos sistemas de vector de expressão. Por exemplo, uma classe de vector utiliza elementos de ADN que são derivados de vírus de animais, tais como o vírus do papiloma bovino, vírus polioma, adenovírus, vírus vaccinia, baculovírus, retrovírus (RSV, MMTV ou MOMLV) ou vírus SV40. Outros envolvem a utilização de sistemas policistrónicos com locais de ligação ao ribossoma internos. Adicionalmente, as células que integraram o ADN no seu cromossoma podem ser seleccionadas por introdução de um ou mais marcadores que permitem a selecção de células hospedeiras transfectadas. O marcador pode proporcionar prototrofia a um hospedeiro auxotrófico, resistência a biocida (e. g., antibióticos) ou resistência a metais pesados, tal como cobre. O gene de marcador de selecção pode estar directamente ligado às sequências de ADN a serem expressas, ou introduzido na mesma célula por co-transformação. O gene da neomicina fosfotransferase (neo) é um exemplo de um gene de marcador de selecção (Southern *et al.*, *J. Mol. Anal. Genet.* 1:327-341 (1982)). Podem também ser necessários elementos adicionais para a síntese óptima de ARNm. Estes elementos podem incluir sequências de sinal, sinais de *splice*, assim como promotores transcripcionais, intensificadores e sinais de terminação.

Num exemplo, pode ser utilizado um vector de expressão, propriedade da Biogen IDEC, Inc., referido como NEOSPLA (Patente U.S. 6159730). Este vector contém o promotor/intensificador de citomegalovírus, o principal promotor da beta globina de murganho, a origem de replicação de SV40, a sequência de poliadenilação da hormona de crescimento bovino, exão 1 e exão 2 da neomicina fosfotransferase, o gene e sequência líder da di-hidrofolato redutase. Verificou-se que este vector resulta em nível de expressão muito elevado após transfecção em células CHO, seguida por selecção em meio contendo G418 e amplificação

por metotrexato. Naturalmente, qualquer vector de expressão que é capaz de induzir expressão em células eucarióticas pode ser utilizado na presente divulgação. Os exemplos de vectores adequados incluem, mas não estão limitados, aos plasmídeos pCDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 e pZeoSV2 (disponível a partir da Invitrogen, San Diego, CA) e o plasmídeo pCI (disponível a partir da Promega, Madison, WI). Vectores de expressão de célula eucariótica adicionais são conhecidos na técnica e estão comercialmente disponíveis. Tipicamente, tais vectores contêm locais convenientes de restrição para inserção do segmento desejado de ADN. Os vectores exemplificativos incluem pSVL e pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1, pML2d (International Biotechnologies), pTDT1 (ATCC 31255), vector de expressão retroviral pMIG e pLL3.7, vector shuttle de adenovírus pDC315 e vectores AAV. Outros sistemas exemplificativos de vectores são divulgados, e. g., na patente U.S. 6413777.

Em geral, o rastreio de grandes números de células transformadas para aquelas que expressam apropriadamente níveis elevados do antagonista, é experimentação de rotina que pode ser realizada, por exemplo, por sistemas robóticos.

As sequências reguladores frequentemente utilizadas para a expressão de célula hospedeira de mamífero incluem elementos virais que direccionam níveis elevados de expressão proteica em células de mamífero, tais como promotores e intensificadores derivados de LTR retrovirais, citomegalovírus (CMV) (tal como o promotor/intensificador de CMV), vírus símio 40 (SV40) (tal como o promotor/intensificador de SV40), adenovírus, (e. g., o principal promotor tardio de adenovírus (AdmLP)), polioma e fortes promotores de mamífero, tais como os promotores nativos de imunoglobulina e actina. Para uma descrição adicional de

elementos reguladores virais, e as suas sequências, ver, e. g., Stinski, Pat. U.S. N° 5168062; Bell, Pat. U.S. N° 4510245; e Schaffner, Pat. U.S. N° 4968615.

Os vectores de expressão recombinante podem conter sequências que regulam a replicação do vector em células hospedeiras (e. g., origens de replicação) e genes marcadores de selecção. O gene marcador de selecção facilita a selecção de células hospedeiras nas quais o vector foi introduzido (ver, e. g., Axel, Pat. U.S. N° 4399216; 4634665 e 5179017). Por exemplo, tipicamente o gene marcador de selecção confere resistência a um fármaco, tais como G418, higromicina ou metotrexato, numa célula hospedeira na qual o vector foi introduzido. Os genes marcadores de selecção frequentemente utilizados incluem o gene da di-hidrofolato redutase (DHFR) (para utilização em células hospedeiras dhfr com selecção/amplificação de metotrexato) e o gene neo (para selecção de G418).

Os vectores que codificam antagonistas de Sp35 podem ser utilizados para transformação de uma célula hospedeira adequada. A transformação pode ser através de qualquer método adequado. Os métodos para introdução de ADN exógeno em células de mamífero são bem conhecidos na técnica e incluem transfecção mediada por dextrano, precipitação com fosfato de cálcio, transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplastos, electroporação, encapsulação de um ou mais polinucleótidos em lipossomas e microinjecção directa de ADN em núcleos. Além disso, as moléculas de ácido nucleico podem ser introduzidas em células de mamífero através de vectores virais.

A transformação de células hospedeiras pode ser realizada por métodos convencionais adequados ao vector e à célula hospedeira utilizados. Para a transformação de células hospedeiras procarióticas, podem ser utilizados métodos de electroporação e de tratamento com sal (Cohen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110-14 (1972)). Para a transformação de células de vertebrado, podem ser utilizados métodos de electroporação, de lípido catiónico ou de tratamento com sal. Ver, *e. g.*, Graham *et al.*, *Virology* 52: 456-467 (1973); Wigler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1373-76 (1979).

A linha celular hospedeira utilizada para a expressão proteica é, de um modo muito preferido, de origem de mamífero; os especialistas na técnica têm a capacidade para determinar, de um modo preferido, as linhas celulares hospedeiras particulares que são mais bem adequadas para o produto génico desejado a ser aí expresso. As linhas celulares hospedeiras exemplificativas incluem, mas não estão limitadas a, NSO, células SP2, células de rim de hamster bebé (BHK), células de rim de macaco (COS), célula de carcinoma hepatocelular humano (*e. g.*, Hep G2), células A549, DG44 e DUXB11 (linhas de ovário de hamster Chinês, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (linha de rim de macaco), COS (um derivado de CVI com antigénio T de SV40), R1610 (fibroblasto de hamster chinês), BALBC/3T3 (fibroblasto de murganho), HAK (linha de rim de hamster), SP2/0 (mieloma de murganho), P3x63-Ag3.653 (mieloma de murganho), BFA-1c1BPT (células endoteliais bovinas), RAJI (linfócito humano) e 293 (rim humano). As linhas celulares hospedeiras estão tipicamente disponíveis a partir de serviços comerciais, na American Tissue Culture Collection ou a partir de literatura publicada.

A expressão de polipéptidos a partir de linhas celulares de produção pode ser aumentada utilizando técnicas conhecidas. Por exemplo, o sistema da glutamina sintetase (GS) é geralmente utilizado para aumentar a expressão sob determinadas condições. Ver, e. g., Patentes Europeias N° 0216846, 0256055 e 0323997 e Pedido de Patente Europeia N° 89303964.4.

### Células Hospedeiras

As células hospedeiras para expressão de um antagonista de Sp35 para utilização num método da divulgação podem ser procarióticas ou eucarióticas. As células hospedeiras eucarióticas exemplificativas incluem, mas não estão limitadas a, células de levedura e de mamífero, e. g., células de ovário de hamster chinês (CHO) (N° de acesso ATCC CCL61), células de embrião de murganho NIH Suíço NIH-3T3 (N° de acesso ATCC CRL1658) e células de rim de hamster bebé (BHK). Outras células hospedeiras eucarióticas úteis incluem células de insecto e células vegetais. As células hospedeiras procarióticas exemplificativas são *E. coli* e *Streptomyces*.

### Terapia Génica

Um antagonista de Sp35 pode ser produzido *in vivo* num mamífero, e. g., um doente humano, utilizando uma abordagem de terapia génica para tratamento de uma doença, distúrbio ou lesão do sistema nervoso, em que a promoção da sobrevivência, proliferação e diferenciação de oligodendrócitos ou a promoção da mielinização de neurónios seria terapêuticamente benéfica. Isto envolve a administração de um ácido nucleico que codifica um antagonista de Sp35 adequado, operativamente ligado a



sequências de controlo de expressão adequadas. Geralmente, estas sequências são incorporadas num vector viral. Os vectores virais adequados para tal terapia génica incluem um vector adenoviral, um vector alphavírus, um vector enterovírus, um vector pestivírus, um vector lentiviral, um vector baculoviral, um vector herpesvírus, um vector viral de Epstein Barr, um vector papovaviral, um vector poxvírus, um vector viral de vaccinia, um vector viral adeno-associado e um vector viral de herpes simplex. O vector viral pode ser um vector viral com replicação defeituosa. Os vectores adenovirais que têm uma deleção no seu gene E1 ou gene E3 são tipicamente utilizados. Quando um vector adenoviral for utilizado, o vector, geralmente, não tem um gene marcador de selecção.

#### Composições Farmacêuticas

Os antagonistas de Sp35 utilizados nos métodos da divulgação podem ser formulados em composições farmacêuticas para administração a mamíferos, incluindo humanos. As composições farmacêuticas utilizadas nos métodos desta divulgação compreendem veículos farmacêuticamente aceitáveis, incluindo, e. g., permutadores iónicos, alumina, estearato de alumínio, lecitina, proteínas séricas, tais como albumina de soro humano, substâncias tampão, tais como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potássio, misturas parciais de glicéridos de ácidos gordos vegetais saturados, água, sais ou eletrólitos, tais como sulfato de protamina, hidrogenofosfato dissódico, hidrogenofosfato de potássio, cloreto de sódio, sais de zinco, sílica coloidal, trissilicato de magnésio, polivinilpirrolidona, substâncias com base em celulose, polietilenoglicol, carboximetilcelulose de sódio, poliacrilatos, ceras, polímeros

de bloco de polietileno-polioxipropileno, polietilenoglicol e lanolina.

As composições utilizadas nos métodos da presente divulgação podem ser administradas através de qualquer método adequado, e. g., parentericamente, intraventricularmente, oralmente, por inalação de spray, topicamente, rectalmente, nasalmente, bucalmente, vaginalmente ou através de um reservatório implantado. Como aqui utilizado, o termo "parentérico" inclui injeção subcutânea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intra-esternal, intratecal, intra-hepática, intra-lesão e intracraniana ou técnicas de infusão. Como descrito previamente, os antagonistas de Sp35 utilizados nos métodos da divulgação actuam no sistema nervoso para promoverem a sobrevivência, proliferação e diferenciação de oligodendrócitos e a mielinização de neurónios. Desta forma, nos métodos da divulgação, os antagonistas de Sp35 são administrados de tal modo que atravessam a barreira hemato-encefálica. Esta passagem pode resultar de propriedades físico-químicas inerentes à própria molécula antagonista de Sp35, de outros componentes da formulação farmacêutica ou da utilização de um dispositivo mecânico, tais como uma agulha, cânula ou instrumentos cirúrgicos para atravessarem a barreira hemato-encefálica. Sempre que o antagonista de Sp35 é uma molécula que não atravessa inerentemente a barreira hemato-encefálica, e. g., uma fusão com uma unidade que facilita o atravessamento, as vias adequadas de administração são, e. g., intratecal ou intracraniana, e. g., directamente numa lesão crónica de EM. Sempre que o antagonista de Sp35 é uma molécula que atravessa inerentemente a barreira hemato-encefálica, a via de administração pode ser por uma ou mais das várias vias descritas abaixo.

As formas injectáveis estéreis das composições utilizadas nos métodos desta divulgação podem ser uma suspensão aquosa ou oleaginosa. Estas suspensões podem ser formuladas de acordo com técnicas conhecidas no campo técnico, utilizando agentes adequados de dispersão ou molhantes e agentes de suspensão. A preparação injectável estéril pode também ser uma solução ou suspensão injectável estéril num diluente ou solvente parentericamente aceitável não tóxico, por exemplo como uma suspensão em 1,3-butanodiol. Entre os veículos e solventes aceitáveis que podem ser utilizados estão a água, solução de Ringer e solução isotónica de cloreto de sódio. Além disso, óleos fixos estéreis são convencionalmente utilizados como um solvente ou meio de suspensão. Para este objectivo, qualquer óleo fixo suave pode ser utilizado, incluindo mono- ou di-glicéridos sintéticos. Os ácidos gordos, tal como ácido oleico e os seus derivados glicéridos, são úteis na preparação de injectáveis, como são óleos naturais farmacologicamente aceitáveis, tais como azeite ou óleo de rícino, especialmente nas suas versões polioxietiladas. Estas soluções ou suspensões de óleo podem também conter um diluente ou dispersante alcoólico de cadeia longa, tais como carboximetilcelulose ou agentes dispersantes semelhantes que são geralmente utilizados na formulação de formas de dosagem farmacologicamente aceitáveis, incluindo emulsões e suspensões. Outros agentes tensioactivos geralmente utilizados, tais como Tweens, Spans e outros agentes emulsionantes ou intensificadores de biodisponibilidade que são geralmente utilizados no fabrico de formas de dosagem sólidas, líquidas, ou outras, farmacologicamente aceitáveis também podem ser utilizadas para os objectivos da formulação.

As formulações parentéricas podem ser uma dose única de bólus, uma infusão ou uma dose de bólus de carregamento, seguida por uma dose de manutenção. Estas composições podem ser

administradas em intervalos fixos ou variáveis específicos, e. g., uma vez por dia ou num base "sempre que necessário".

Determinadas composições farmacêuticas utilizadas nos métodos desta divulgação podem ser administradas oralmente numa forma de dosagem aceitável incluindo, e. g., cápsulas, comprimidos, suspensões ou soluções aquosas. Determinadas composições farmacêuticas também podem ser administradas por aerossol nasal ou inalação. Tais composições podem ser preparadas como soluções em soro fisiológico, empregando álcool benzílico ou outros conservantes, promotores de absorção para aumentar a biodisponibilidade e/ou outros agentes solubilizantes ou dispersantes convencionais adequados.

A quantidade de um antagonista de Sp35 que possa ser combinado com os materiais veículo para produzir uma forma de dosagem unitária varia dependendo do hospedeiro a ser tratado, do tipo de antagonista utilizado e do modo particular de administração. A composição pode ser administrada como uma dose única, doses múltiplas ou ao longo de um período de tempo estabelecido numa infusão. Os regimes de dosagem também podem ser ajustados para proporcionar a melhor resposta desejada (e. g., uma resposta terapêutica ou profiláctica).

Os métodos da divulgação utilizam um "quantidade terapêuticamente eficaz" ou "quantidade profilacticamente eficaz" de um antagonista de Sp35. Uma tal quantidade terapêuticamente ou profilacticamente eficaz pode variar de acordo com factores, tais como o estado da doença, idade, sexo e peso do indivíduo. Uma quantidade terapêuticamente ou profilacticamente eficaz é também uma em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais são compensados pelos efeitos terapêuticamente benéficos.

Um regime de tratamento e dosagem específicos para qualquer doente particular dependerão de uma variedade de factores, incluindo o antagonista de Sp35 particular utilizado, da idade do doente, do peso corporal, saúde geral, sexo e dieta, e do momento de administração, taxa de excreção, combinação de fármacos e da gravidade da doença particular a ser tratada. A avaliação de tais factores pelo técnico de saúde está dentro do conhecimento geral na matéria. A quantidade dependerá também do doente individual a ser tratado, da via de administração, do tipo de formulação, das características do composto utilizado, da gravidade da doença e do efeito desejado. A quantidade utilizada pode ser determinada por princípios farmacológicos e farmacocinéticos bem conhecidos na técnica.

Nos métodos da divulgação, os antagonistas de Sp35 são administrados geralmente directamente ao sistema nervoso, intracerebroventricularmente ou intratecalmente, e. g., numa lesão crónica de EM. As composições para administração de acordo com os métodos da divulgação podem ser formulados de modo que seja administrada uma dosagem de 0,001-10 mg/kg de peso corporal por dia do polipéptido antagonista de Sp35. Em alguns exemplos da divulgação, a dosagem é 0,01-1,0 mg/kg de peso corporal por dia. Em alguns exemplos, a dosagem é 0,001-0,5 mg/kg de peso corporal por dia.

Para o tratamento com um anticorpo antagonista de Sp35, a dosagem pode variar, e. g., desde cerca de 0,0001 a 100 mg/kg, e mais geralmente, 0,01 a 5 mg/kg (e. g., 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 corporal do hospedeiro. Por exemplo, as dosagens podem ser 1 mg/kg de peso corporal ou 10 mg/kg de peso corporal ou dentro da gama de 1-10 mg/kg, de um modo preferido, pelo menos 1 mg/kg. São também pretendidas doses intermédias nas gamas acima no âmbito da

divulgação. Aos indivíduos podem ser administradas tais doses diariamente, dia sim dia não, semanalmente ou de acordo com qualquer outro plano determinado por análise empírica. Um tratamento exemplificativo requer a administração em múltiplas dosagens ao longo de um período prolongado, por exemplo, de pelo menos seis meses. Regimes de tratamento exemplificativos adicionais requerem a administração uma vez por cada duas semanas ou uma vez por mês ou uma vez por cada 3 a 6 meses. Planos de dosagem exemplificativos incluem 1-10 mg/kg ou 15 mg/kg em dias consecutivos, 30 mg/kg em dias alternados ou 60 mg/kg semanalmente. Em alguns métodos, são administrados simultaneamente dois ou mais anticorpos monoclonais com diferentes especificidades de ligação, em cujos casos a dosagem de cada anticorpo administrado enquadra-se dentro das gamas indicadas.

Em determinados exemplos, um indivíduo pode ser tratado com uma molécula de ácido nucleico que codifica um polinucleótido antagonista de Sp35. As doses para ácidos nucleicos variam desde cerca de 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 µg a 10 mg ou 30-300 µg de ADN por doente. As doses para vectores virais infecciosos variam desde 10-100, ou mais, viriões por dose.

Compostos activos suplementares podem também ser incorporados nas composições utilizadas nos métodos da divulgação. Por exemplo, um polipéptido Sp35 solúvel ou uma proteína de fusão podem ser co-formulados e/ou co-administrados com um ou mais agentes terapêuticos adicionais.

A divulgação abrange qualquer método adequado de distribuição para um antagonista de Sp35 a um tecido alvo seleccionado, incluindo injeção de bólus de uma solução aquosa ou implantação de um sistema de libertação controlada. A

utilização de um implante de libertação controlada reduz a necessidade para injeções repetidas.

Os antagonistas de Sp35 utilizados nos métodos da divulgação podem ser infundidos directamente no cérebro. São conhecidos vários implantes para infusão cerebral directa de compostos e são eficazes na distribuição de compostos terapêuticos a doentes humanos que sofrem de distúrbios neurológicos. Estes incluem infusão crónica cerebral utilizando uma bomba, cateteres intersticiais temporários, implantados estereotaxicamente, implantes de cateteres intracranianos permanentes e implantes biodegradáveis implantados cirurgicamente. Ver, e. g., Gill et al., *supra*; Scharfen et al., "High Activity Iodine-125 Interstitial Implant For Gliomas" *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 24 (4):583-591 (1992); Gaspar et al., "Permanent 125I Implants for Recurrent Malignant Gliomas", *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 43(5):977-982 (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).

As composições podem também compreender um antagonista de Sp35 disperso num material veículo biocompatível que funcione como um sistema adequado de distribuição ou apoio para os compostos. Os exemplos adequados de veículos de libertação sustida, incluem matrizes poliméricas semipermeáveis na forma de artigos moldados, tais como supositórios ou cápsulas. As matrizes de libertação sustida implantáveis ou microcapsulares incluem polilactidas (Patente U.S. N° 3773319; documento

EP 58481), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama-etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, *Biopolymers* 22: 547-56 (1985)); poli(2-hidroxietil-metacrilato), etileno-vinil-acetato (Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277 (1981); Langer, *Chem. Tech.* 12:98-105 (1982)) ou ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico (documento EP 133988).

Em alguns exemplos da divulgação, um antagonista de Sp35 é administrado a um doente por infusão directa numa região apropriada do cérebro. Ver, e. g., Gill *et al.*, "Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease" *Nature Med.* 9: 589-95 (2003). Técnicas alternativas estão disponíveis e podem ser aplicadas para administrar um antagonista de Sp35 de acordo com a divulgação. Por exemplo, a colocação estereotáctica de um cateter ou implante pode ser realizada utilizando a unidade de Riechert-Mundinger e a unidade localizadora polivalente de ZD (Zamorano-Dujovny). Um varrimento tomográfico (CT) computarizado de contraste aumentado, injetando 120 mL de omnipaque, 350 mg de iodo/mL, com uma espessura de corte de 2 mm, pode permitir um plano de tratamento multiplanar tridimensional (STP, Fischer, Freiburg, Alemanha). Este equipamento permite o planeamento com base em estudos da imagiologia de ressonância magnética, fundindo a informação alvo de CT e MRI para clara confirmação do alvo.

O sistema estereotástico de Leksell (Downs Surgical, Inc., Decatur, GA) modificado para utilização com um sistema de varrimento CT da GE (General Electric Company, Milwaukee, WI), assim como o sistema estereotástico de Brown-Roberts-wells (BRW) (Radionics, Burlington, MA) podem ser utilizados para este objectivo. Assim, na manhã do implante, o anel de base anelar da grelha estereotástica de BRW pode ser ligado ao crânio do



doente. Podem ser obtidas secções em série de CT em intervalos de 3 mm através da região (tecido alvo), com uma grelha localizadora de haste de grafite presa à placa de base. Pode ser estabelecido um programa de planeamento de tratamento computarizado num computador VAX 11/780 (Digital Equipment Corporation, Maynard, Mass.) utilizando coordenadas de CT das imagens da haste de grafite para mapear entre espaço de CT e espaço de BRW.

Os métodos de tratamento de distúrbios de desmielinização ou dismielinização como aqui descritos são testados tipicamente *in vitro* e depois *in vivo* num modelo animal aceitável, para a actividade terapêutica ou profiláctica desejada, antes da utilização em humanos. Os modelos animais adequados, incluindo animais transgénicos, são conhecidos dos técnicos com conhecimento geral na matéria. Por exemplo, ensaios *in vitro* para demonstrar o efeito de diferenciação e sobrevivência dos antagonistas de Sp35 são aqui descritos. O efeito dos antagonistas de Sp35 na mielinização de axónios pode ser testado *in vitro* como descrito nos Exemplos. Por último, podem ser realizados testes *in vivo* por criação de murganhos transgénicos que expressam o antagonista de Sp35 ou por administração do antagonista de Sp35 a murganhos ou ratos em modelos, como aqui descritos.

## **Exemplos**

### **Exemplo 1**

Sp35 está envolvido na biologia dos oligodendrócitos

Os oligodendrócitos maturam através de várias fases de desenvolvimento desde células progenitoras A2B5 (que expressam A2B5), diferenciando-se em oligodendrócitos pré-mielinizantes (que expressam O1 e O4) e finalmente em oligodendrócitos mielinizantes maduros (que expressam O1, O4 e MBP). Assim, através da monitorização da presença e ausência dos marcadores A2B5, O1, O4 e MBP é possível determinar qual a fase de desenvolvimento de uma determinada célula e avaliar o papel de Sp35-Fc na biologia dos oligodendrócitos. Para uma revisão geral da biologia dos oligodendrócitos, ver, e. g., Baumann e Pham-Dinh, *Physiol. Rev.* 81: 871-927 (2001).

Os anticorpos monoclonais contra O4, MBP e CNPase foram da Stemberger Monoclonals; o anticorpo para APC (clone CC-1; ref. 29) foi da Calbiochem. Outros anticorpos foram para  $\beta$ III tubulina (Covance), Sp35 (Biogen Idec), Fyn (Santa Cruz Biotechnology) e fosfo-Fyn (Biosource). Os anticorpos monoclonais contra A2B5 estão disponíveis pela Chemicon.

Sp35 é expresso em oligodendrócitos

A expressão de Sp35 em neurónios CG P13 purificados de rato, oligodendrócitos P2 e culturas de astrócitos P4 foi analisada por reacção em cadeia da polimerase, após transcrição reversa (RT-PCR). Um Kit da Ambion, Inc. foi utilizado para extrair ARNm das células de cérebro de rato de acordo com as instruções do

fabricante. A RT-PCR semi-quantitativa foi realizada utilizando o iniciador para a frente 5' AGAGACATGCGATTGGTGA 3' (SEQ ID N°: 38) e o Iniciador inverso 5' AGAGATGTAGACGAGGTCATT 3' (SEQ ID N°: 39) e mostrou elevada expressão em neurónios, baixa expressão em oligodendrócitos e nenhuma expressão em astrócitos. (Fig. 5).

A expressão de Sp35 em oligodendrócitos foi confirmada por hibridação *in situ* em secções derivadas de nervo óptico de rato adulto. As secções do nervo óptico 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 ARN anti-sentido ou de sentido de Sp35 marcado com digoxigenina, utilizando os primeiros 500 nucleótidos da sequência codificante de Sp35. As secções foram coradas de acordo com as instruções do fabricante utilizando um kit de Tyramide Signal Amplification (Amersham Biosciences) e um kit de anticorpo conjugado com anti-digoxigenina fluorescente (Perkin Elmer). Para as análises combinadas de *in situ* e imunofluorescência, as secções foram primeiro sondadas com ARN marcados com digoxigenina e depois com anticorpos, e. g., anticorpo CC1 (Calbiochem; um marcador de oligodendrócitos maduros) ou anticorpo anti-Sp35. Observou-se que os oligodendrócitos que hibridaram com uma sonda Sp35 anti-sentido também co-coraram com um anticorpo para CC1 (dados não mostrados). Não foi observada marcação específico utilizando uma sonda Sp35 de sentido. A expressão de Sp35 em oligodendrócitos foi também confirmada por estudos de imunohistoquímica de secções de tecido da região ventricular lateral do córtex de rato P7. A maioria das células corticais que marcou com o anticorpo CC1 também marcou com o anticorpo anti-Sp35. Dados não mostrados. A especificidade da interação foi

confirmada por pré-adsorção do anticorpo anti-Sp35 com Sp35-Fc (ver Exemplo 2), que eliminou o sinal.

Silenciamento da expressão de Sp35 por ARNi específico de Sp35 promove o crescimento e a diferenciação de oligodendrócitos

Foi utilizado ARNi específico de Sp35 para abolir a expressão de Sp35 em células precursoras de oligodendrócitos, para examinar como o Sp35 contribui para o crescimento e diferenciação de oligodendrócitos. Foram infectadas 50000 células precursoras de oligodendrócitos A2B5 com lentivírus contendo a sequência de ARNi específica de Sp35 ou ARNi de controlo, preparados como se segue.

As sequências de ADN de Sp35 de murino e rato foram comparadas para encontrar regiões homólogas para utilizar como candidatos a ARN de gancho-de-cabelo pequeno (shARN). Foi contruído CH324, para a expressão em lentivírus de ARNi de Sp35, por emparelhamento dos oligonucleótidos LV1-035 e LV1-036 e ligado a pLL3.7 digerido com *HpaI* e *XhoI*. O vector pLL3.7, a metodologia adicional e a produção do vírus foram como descritas em Rubinson *et al.*, *Nat. Genet.* 33.401-06 (2003). Os oligonucleótidos de ARNi de Sp35 foram adquiridos à MWG e têm as seguintes sequências:

LV1-035 (oligo de sentido) 5'-TGATCGTCATCCTGCTAGACTTCAAGAGAGTCTAGCAGGATGACGATCTTTTTTC-3' (SEQ ID N°: 40) e

LV1-036 (oligo anti-sentido) 5'-TCGAGAAAAAAGATCGTCATCCTGCTAGACTCTCTGAAGTCTAGCAGGATGACGATCA-3' (SEQ ID N°: 41).

O ARNi de controlo foi concebido com as mesmas sequências de oligonucleótidos à exceção das alterações nucleotídicas indicadas em letras minúsculas:

5'-TGATCcTCATcCttCTAtACTTCAAGAGAGTgTAGCAGGATGAcGATCT  
TTTTTCTCGA-3' (SEQ ID N°: 42) e  
5'-TCGAGAAAAAAGATCGTCATCCTGCTAGACTCTCTTGAAGTaTAGaA  
GGATGACGATCA-3' (SEQ ID N°:43).

Antes de produzir o lentivírus, o ADN de pLL3.7 ou o shARN candidato em pLL3.7 foram cotransfectados com plasmídeo marcado com Sp35-HA de murino numa razão de 5 para 1 em células CHO em formato de 6 poços. O silenciamento foi analisado por detecção de transferência de Western do marcador Sp35-HA de lisados de células CHO transfectadas, assim como por transferência de Northern de ARN total preparado a partir de poços duplicados. A transferência foi sondada com um fragmento de ADNc de Sp35. Os ensaios foram realizados 48 horas pós-transfecção. Como esperado, verificou-se uma redução 10 vezes de ARNm de Sp35 em células CHO tratadas com ARNi CH324 relativamente às células tratadas com controlo. Dados não mostrados. Os ARNi de lentivírus contendo a proteína fluorescente verde (GFP) foram produzidos como descrito em Rubinson *et al.* Em culturas tratadas com controlo ou ARNi de Sp35, aproximadamente 80% dos oligodendrócitos foram positivos a GFP. O número total de células não foi alterado pelos tratamentos de ARNi. Para quantificar os efeitos de ARNi na diferenciação, foram contados apenas oligodendrócitos que expressam GFP.

Populações enriquecidas de oligodendrócitos foram cultivadas a partir de ratos fêmea Long Evans P2, como descrito por Conn, *Meth. Neurosci.* 2: 1-4 (Academic Press; 1990) com modificações como se seguem. Resumidamente, o prosencéfalo foi dissecado e colocado em solução salina tamponada de Hank (HBSS; Invitrogen). O tecido foi cortado em fragmentos de 1 mm e foi incubado a 37 °C durante 15 minutos em 0,01% de tripsina e 10 µg/mL de DNase. As células dissociadas foram plaqueadas em balões de

cultura de tecidos T75 revestidos com poli-L-lisina e foram crescidas a 37 °C durante 10 d em Meio DMEM com 20% de soro fetal de vitela (Invitrogen). Os precursores de oligodendrócitos (A2B5<sup>+</sup>) foram recolhidos por agitação do balão, de um dia para o outro, a 200 rpm a 37 °C, resultando numa população 95% pura. As culturas foram mantidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco de elevada glucose (DMEM) com FGF/PDGF (10 ng/mL; Peprotech) durante 1 semana. A remoção de FGF/PDGF permitiu às células A2B5<sup>+</sup> diferenciarem-se em oligodendrócitos premielinizantes O4<sup>+</sup> após 3-7 d, e a diferenciarem-se em oligodendrócitos maduros O4<sup>+</sup> e MBP<sup>+</sup> após 7-10 d. Estes estados de diferenciação são prontamente evidentes a partir de alterações de morfologia: as células A2B5<sup>+</sup> são bipolares em termos de forma, os oligodendrócitos premielinizantes O4<sup>+</sup> têm processos mais longos e mais ramificados e os oligodendrócitos maduros MBP<sup>+</sup> contêm estruturas de folha de mielina entre processos.

As células precursoras de oligodendrócitos A2B5 foram infectadas com o lentivírus contendo ARNi de CH324. As células resultantes foram cultivadas durante 3 dias e foi contado o número de oligodendrócitos O4-positivo (um marcador da diferenciação de oligodendrócitos). A expressão de Sp35 endógena foi reduzida por infecção com lentivírus de Sp35 ARNi e foi confirmada por RT-PCR (Fig 6A). A redução de Sp35 resultou em oligodendrócitos maduros altamente diferenciados, comparativamente com células infectadas de controlo, como foi evidente por aumentos no comprimento de processos celulares e pela presença de abundantes estruturas de folha de mielina (dados não mostrados). Em células que expressam Sp35 ARNi, existiam três vezes mais oligodendrócitos maduros (O4-positivo) que nas culturas de controlo (Fig. 6B). Estes dados indicam que o Sp35 pode regular negativamente a diferenciação de oligodendrócitos.

Sp35 negativo dominante promove o crescimento e diferenciação de oligodendrócitos

Foram construídos vectores lentivirais que expressam Sp35 de tipo selvagem e uma forma negativa dominante de Sp35. As sequências de ADN que codificam o Sp35 de tamanho total de murganho (FL-Sp35, resíduos aminoacídicos 34-614 da SEQ ID N°: 2) foram amplificadas por PCR utilizando os iniciadores 5'-GAGGATCTCGACGCGGCCGCATGGAGACAGACACACTCCTG-3' (SEQ ID N°: 44) e 5'-GGGGCGGAATTGGATCCTCACAGATCCTCTTCTGAGATGAG-3' (SEQ ID N°: 45) e introduzidas no vector lentiviral HRST-IRESeGFP nos locais *NotI* e *BamHI*. De modo semelhante, as sequências de ADN que codificam o Sp35 negativo dominante (DN-Sp35, resíduos aminoacídicos 34-581 da SEQ ID N°: 2) foram amplificadas por PCR utilizando os iniciadores 5'-GAGGATCTCGACGCGGCCGCATGGAGACAGACACACTCCTG-3' (SEQ ID N°: 46) e 5'-GATACGGATCCTCAGCCTTTGCCCCGGCTCCATAGAAACAGC-3' (SEQ ID N°: 47). Os plasmídeos FL-Sp35 e DN-Sp35 foram transfectados em células 293 para produzir lentivírus como descrito por Rubinson et al., "A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference" *Nat. Genet.* 33: 401-06 (2003). Os oligodendrócitos (preparados como descrito no Exemplo 4) foram infectados com lentivírus a 2 MOI por célula e confirmada a expressão de FL-Sp35 e DN-Sp35 por transferência de Western.

DN-Sp35 promoveu a diferenciação dos oligodendrócitos, produzindo um aumento no número de oligodendrócitos maduros. Pelo contrário, a sobreexpressão de Sp35 de tamanho total (FL-Sp35) teve o efeito oposto e inibiu a diferenciação, como foi evidente por uma redução no número de oligodendrócitos maduros comparativamente ao controlo (dados não mostrados).

## Exemplo 2

Construção e purificação da proteína de fusão Sp35-Fc

Foi feita uma construção fundindo a porção extra-celular do Sp35 humano (resíduos 1-532) à região de charneira e Fc de IgG1 humana, para estudar a função biológica de Sp35. Foi obtida uma sequência codificante parcial para Sp35 humano por PCR a partir do clone 227.2 utilizando o iniciador para a frente

5'-CAGCAGGTCGACGCGGCCGCATGCTGGCG GGGGCGT-3' (SEQ ID N°: 48) e o Iniciador inverso

5'-CAGCAGGTCGACCTCGCCCGGCTGGTTGGCCAACCAGCCGGGCGAGGTCGACCTCGAGG-3' (SEQ ID N°:49).

O produto de PCR de extremidades rombas foi subclonado no local *SrfI* do Vector PCR SCRIPT AMP (Stratagene) para criar o PCR SCRIPT AMP-Sp35. Um fragmento *SalI* foi isolado do PCR SCRIPT AMP-Sp35 e subclonado no vector PCRCAMP Ig (derivado do vector PCR SCRIPT AMP da Stratagene). No vector PCRCAMP Ig, a sequência de charneira e Fc gama é subclonada como um fragmento *SalI*(5') para *NotI*(3'). O fragmento Sp35 *SalI* foi subclonado no local *SalI* do vector PCRCAMP Ig, fundindo assim a sequência de sinal de Sp35 e o domínio extracelular (codões 1-532) em-grelha com as sequências que codificam a região de charneira e Fc da Ig1 humana. Os isolados correctos foram identificados e um fragmento *NotI* contendo o fragmento Fc de Sp35 foi subclonado no local de clonagem único *NotI* do vector de expressão de CHO, PV90 (Biogen Idec). O plasmídeo resultante foi confirmado por sequenciação de ADN e designado GT123.

As linhas celulares estáveis que expressam a proteína de fusão Sp35-Fc foram produzidas por electroporação de células hospedeiras CHO DG44 com o plasmídeo GT123. As células CHO



transfectadas foram cultivadas em MEM menos alfa na presença de 10% de soro dializado e 4 mM de glutamina para selecionar para crescimento independente de nucleósido. Quatorze dias pós-transfecção, as células foram alimentadas com meio fresco. Para rastrear para células que expressam Sp35-Fc, as células CHO foram marcadas com IgG anti-humana de cabra marcada com ficoeritrina (PE) (Jackson Labs) e submetidas a triagem de citometria de fluxo de alta velocidade num FACS Mo-Flo (Cytomation). As células que expressam os níveis mais elevados de Sp35-Fc foram seleccionadas. Estas células foram expandidas em cultura durante 7 dias, depois re-marcadas e novamente submetidas a triagem. As células que expressam os níveis mais elevados de Sp35-Fc foram isoladas como clones individuais em placas de 96 poços. Estes clones foram cultivados durante duas semanas e depois alimentados com meio fresco, um dia antes, submetidas à análise FACS para a verificação dos níveis de expressão. Os clones que expressam os níveis mais elevados de Sp35-Fc foram expandidos e foram estabelecidos bancos de células congeladas. As linhas celulares foram adaptadas para crescer em cultura de suspensão no meio sem soro BCM16. O título do Sp35-Fc produzido por estes clones foi determinado através do crescimento das linhas celulares a 37 °C durante 4-5 passagens, depois crescendo as células até 50% da densidade celular máxima e cultivando-as durante 10-15 dias a 28 °C, até a densidade de células viáveis cair para 75%. Neste instante, os meios de cultura foram recolhidos, limpos das células e restos por centrifugação, e os sobrenadantes de cultura titulados para níveis de Sp35-Fc por análise de transferência de Western utilizando um anticorpo Ig anti-humano (Jackson Labs) como a sonda.

A proteína de fusão Sp35-Fc foi purificada do meio de cultura límpido como se segue: 9 mL de HEPES 1 M pH 7,5 foram adicionados a 900 mL de meio condicionado. O meio aplicado em descontínuo durante 3 h a 4 °C em 3 mL de Protein A Sepharose (Amersham Bioscience). A resina foi recolhida numa coluna de 1,5 cm (I.D.) e lavada quatro vezes com 3 mL de PBS, duas vezes com 4 mL de PBS contendo 800 mM de NaCl e depois novamente com 3 mL de PBS. O Sp35-Fc foi eluído da coluna com 25 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2,8 e 100 mM de NaCl em fracções de 1,5 mL e neutralizado por adição de 75 µL de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M, pH 8.6. As fracções de pico contendo proteína foram identificadas por absorvência a 280 nm, agrupadas e submetidas a purificação adicional numa coluna de proteína A de 1 mL. Antes da aplicação, foi adicionado NaCl até 600 mM e HEPES, pH 7,5 até 50 mM. A coluna foi lavada duas vezes com 600 µL de HEPES 10 mM pH 7,5 e 1 M de NaCl, e depois com 1 mL de PBS. O Sp35-Fc foi eluído da coluna com NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM, pH 2,8 e 100 mM de NaCl, recolhendo fracções de 0,5 mL e neutralizado por adição de 25 µL de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M, pH 8,6. As fracções de pico contendo proteína foram identificadas por absorvência a 280 nm e agrupadas. Através de SDS-PAGE redutora, a proteína Sp35-Fc migrou como uma única banda (> 95% puro) com uma massa aparente de 90 kDa. Sob condições não redutoras, a proteína migrou como um dímero com uma massa aproximada de 180 kDa. A proteína Sp35-Fc purificada foi fraccionada e armazenada a -70 °C.

### Exemplo 3

Sp35-Fc exógeno promove a sobrevivência/proliferação/diferenciação dos oligodendrócitos

Foi avaliada a expressão de ARNm de Sp35 em oligodendrócitos em várias fases de desenvolvimento através do seguinte método. Os oligodendrócitos foram induzidos a se diferenciarem como descrito no Exemplo 1 e o ARNm isolado utilizando o kit Ambion. A quantificação da expressão de ARNm de Sp35 foi realizada utilizando o kit Taqman® RT-PCR (Applied Biosystems) de acordo com as especificações do fabricante, utilizando os seguintes iniciadores: 5'-CTTCCCCTTCGACATCAAGAC-3' (para a frente; SEQ ID N°: 50) e 5'-CAGCAGCACCAGGCAGAA-3' (reverso; SEQ ID N°:51); e uma sonda marcada com FAM, 5'-ATCGCCACCACCATGGGCTTCAT-3' (SEQ ID N°: 52). Os dados foram normalizados para os níveis de GAPDH como um controlo interno. Os oligodendrócitos de progenitor precoce (A2B5<sup>+</sup>) e os oligodendrócitos pre-mielinizantes (O4<sup>+</sup>) mostraram níveis equivalentes de ARNm de Sp35, mas o nível de ARNm de Sp35 mais do que duplicou em oligodendrócitos maduros (MBP<sup>+</sup>). Fig. 7.

Os oligodendrócitos A2B5<sup>+</sup>, preparados como descrito no Exemplo 1, foram tratados com concentrações crescentes de Sp35-Fc ou Fc de controlo durante 3 dias (o Sp35-Fc foi preparado como descrito no Exemplo 2). Para avaliar a diferenciação, as células de A2B5<sup>+</sup> foram plaqueadas em câmaras laminares de 4 poços em meio de crescimento sem FGF/PDGF suplementado com 10 ng/mL de CNTF e 15 nM de triiodo-L-tironina e foram imediatamente tratadas com concentrações crescentes de Sp35-Fc ou Fc de controlo. Após 48 h (72 h para ARNi), as culturas foram coradas com anticorpo para O4, e o número total de O4<sup>+</sup> e de oligodendrócitos O4<sup>+</sup> maduros foi quantificado. As

amostras foram analisadas em duplicado. O Sp35-Fc promoveu a diferenciação de células A2B5<sup>+</sup> em células O4<sup>+</sup> de um modo dependente da concentração. Fig. 8.

Os oligodendrócitos maduros têm uma semi-vida *in vitro* de cerca de 48 a 72 horas, com as células a sofrerem apoptose tipicamente após 72 horas. Quando as culturas de oligodendrócitos foram tratadas com Sp35-Fc (10 g/mL durante 5 dias), observou-se uma taxa de sobrevivência significativamente aumentada para oligodendrócitos maduros, como avaliado por coloração de células viáveis comparativamente a controlo tratado com Fc de controlo. A expressão de MBP foi monitorizada como um marcador para oligodendrócitos maduros. Foi observado um aumento de aproximadamente 3 vezes na expressão da proteína MBP em células tratadas com Sp35-Fc por coloração celular e transferência de Western, utilizando anticorpo anti-MBP comparativamente a células tratadas com controlo de Fc.

#### **Exemplo 4**

Antagonistas de Sp35 regulam RhoA e Fyn

Uma via de sinalização candidata forte que está implicada no controlo da diferenciação dos oligodendrócitos é a família Rho de GTPases. As GTPases Rho regulam a morfologia celular e são requeridas quantidades reduzidas de RhoA-GTP para a diferenciação dos oligodendrócitos. Ver Liang, X, *et al.*, *J. Neurosci.* 24:7140-7149 (2004). Para determinar se Sp35 sinaliza através da via RhoA, os níveis de RhoAGTP em lisados celulares de oligodendrócitos tratados com Sp35-Fc foram comparados com os níveis no controlo correspondente através de transferência de Western. Uma redução significativa de três vezes em RhoA-GTP foi

observada após Sp35-Fc (Fig. 9A), indicando que a atenuação da função de Sp35 pode induzir a diferenciação de oligodendrócitos por regulação negativa de RhoAGTP, com um aumento subsequente na expressão de MBP. Reduções semelhantes em quantidades de RhoA GTP foram observadas quando os oligodendrócitos foram tratados com DN-Sp35 ou com Sp35 ARNi (dados não mostrados).

A actividade da RhoA GTPase é regulada pela Fyn cinase, ver Liang, X, *et al.*, *J. Neurosci.* 24: 7140-7149 (2004). A expressão e fosforilação aumentada de Fyn correlaciona-se com a diferenciação de oligodendrócitos. *Id.* Ver também Osterhout, D. J., *et al.*, *J. Cell Biol.* 145:1209-1218 (1999). Para testar se os antagonistas de Sp35 afectam a função de Fyn, a expressão e fosforilação de Fyn forem medidas directamente por transferência de Western. O tratamento com DN-Sp35, como descrito no Exemplo 1, resultou em aumentos de duas vezes na proteína Fyn e na fosforilação de Fyn (Fig. 9B). Inversamente, quando as células que expressam FL-Sp35 foram analisadas, a expressão e fosforilação de Fyn foi reduzida em duas vezes (Fig. 9B).

### **Exemplo 5**

Sp35-Fc promove a mielinização *in vitro*

O papel de Sp35 na mielinização foi examinado *in vitro* por tratamento de co-culturas de neurónios ganglionares da raiz dorsal (DRG) e oligodendrócitos com Sp35-Fc e testando para mielinização por imuno-histoquímica e microscopia electrónica. Para estes estudos, foi necessário primeiro produzir culturas primárias de neurónios DRG e oligodendrócitos.

Gânglios de raiz dorsal embrionários de fêmeas de ratos E14-E17 Long Evans foram cultivados como descrito por Plant *et al.*, *J. Neurosci.* 22: 6083-91 (2002). Os DRG dissecados foram plaqueados em lamelas revestidas com poli-L-lisina (100 µg/mL) durante 2 semanas na presença de fluorodesoxiuridina durante os dias 2-6 e os dias 8-11 em meio NLA contendo 1xB27, 100 ng/mL de NGF (Invitrogen).

Os oligodendrócitos A2B5<sup>+</sup> foram preparados como descrito no Exemplo 1 e foram recolhidos por tripsinização.

Para estudos em co-cultura, os oligodendrócitos A2B5<sup>+</sup> foram adicionados às culturas em gota de neurónios DRG, na presença ou ausência de 10 µg/mL de Sp35-Fc. O meio de cultura (meio Neurobasal suplementado com B27 e 100 ng/mL de NGF) foi mudado e foi adicionado Sp35-Fc fresco às células cada 3 d. Para identificar as alterações na mielinização, culturas com 2 semanas foram coradas por coloração imuno-histoquímica ("IHC") para neurofilamentos, com anticorpo anti-BIII-tubulina para identificar axónios ou anticorpo anti-MBP para identificar oligodendrócitos, e as culturas de 4 semanas foram submetidas a SDS-PAGE, seguida por análises de transferência de Western para quantificar a MBP. Em exemplos seleccionados, as células foram fixas para estudos de microscopia electrónica por adição de 2,5% de gluteraldeído directamente sobre as lamelas. Os axónios mielinados nas culturas de 2 semanas foram quantificados por contagem do número de feixes internodais mielinizados que foram derivados de oligodendrócitos MBP<sup>+</sup> isolados. As amostras foram analisadas em duplicado. As barras de erro denotam determinações individuais. Os valores de P em todos os estudos foram determinados utilizando uma análise unidireccional de variância.

Nas culturas primárias de oligodendrócitos de rato e de neurónios ganglionares da raiz dorsal (DRG), foram observados baixas quantidades basais de mielinização. Pelo contrário, o tratamento com Sp35-Fc durante 2 semanas resultou em mielinização axonal robusta, como foi evidente através da presença de axónios mielinizados de MBP<sup>+</sup>, que se desenvolveram em culturas tratadas com Sp35-Fc de um modo dependente da dose (Fig. 10A). A análise de transferência de Western demonstrou que a expressão de MBP, o principal componente proteico da mielina, foi aumentada em culturas tratadas com Sp35-Fc (Fig. 10B). A mielinização na presença de Sp35-Fc foi ainda confirmada por microscopia confocal, a qual verificou que a MBP encapsulou os axónios (dados não mostrados). Foram observados múltiplos internódulos bem formados por microscopia electrónica em culturas tratadas com Sp35-Fc, assim como estruturas que se assemelham muito a nódulos de Ranvier (Fig. 10C). Foram detectados apenas segmentos ocasionalmente mielinizados e nenhum nódulo de Ranvier em culturas de controlo (Fig. 10D).

O efeito dos antagonistas de Sp35 na mielinização axonal foi ainda confirmado utilizando DN-Sp35. A expressão de DN-Sp35 aumentou o número total de células MBP<sup>+</sup> mielinizantes em cinco a dez vezes, quando comparada com controlos (Fig. 10E). Pelo contrário, a sobreexpressão de FL-Sp35 diminuiu o número de células MBP<sup>+</sup> mielinizantes em duas vezes, comparativamente aos controlos (Fig. 10E). A análise de transferência de Western foi utilizada para quantificar a MBP em culturas. DN-Sp35 produziu um aumento de dez vezes em MBP, enquanto FL-Sp35 causou uma redução de duas vezes em MBP (Fig. 10F). A expressão de proteínas de FL-Sp35 e DN-Sp35 em culturas foi confirmada por transferência de Western (Fig. 10F). Estes estudos indicam ainda que Sp35 endógeno inibe a mielinização e que o antagonismo de Sp35 pode reverter a inibição.

## Exemplo 6

Péptidos de domínio Ig de Sp35 promovem a mielinização *in vitro*

Diversos péptidos contendo porções do domínio Ig de Sp35 foram examinados *in vitro*, por tratamento de co-culturas de neurónios ganglionares da raiz dorsal (DRG) e oligodendrócitos com péptidos Ig de Sp35 e testando para a mielinização, como descrito no Exemplo 5.

Para estudos de co-cultura, os oligodendrócitos A2B5<sup>+</sup> foram adicionados às culturas em gota de neurónios DRG na presença ou ausência de 10 µg/mL de Sp35-Ig-Fc (aminoácidos Sp35 417-493 fundidos a Fc). O meio de cultura (meio Neurobasal suplementado com B27 e 100 ng/mL de NGF) foi mudado e foi adicionado Sp35-Ig-Fc fresco às células cada 3 d. Para identificar alterações na mielinização, culturas com 2 semanas foram coradas por coloração imuno-histoquímica ("IHC") para neurofilamentos, com anticorpo anti-BIII-tubulina para identificar axónios ou anticorpo anti-MBP para identificar oligodendrócitos, e as culturas de 4 semanas foram submetidas a SDS-PAGE, seguida por análises de transferência de Western para quantificar MBP.

Análise de transferência de Western demonstrou que a expressão de MBP, o principal componente proteico da mielina, foi aumentada em culturas tratadas com Sp35-Ig-Fc (Fig. 15). Um péptido Sp35-Ig-Fc mutado foi também testado no mesmo ensaio. Quando a arginina na posição 456 e a histidina na posição 458 foram mudadas para ácido glutâmico e valina, respectivamente, os péptidos não promoveram a mielinização, comparativamente ao péptido Sp35-Ig-Fc. (Fig. 15). A arginina na posição 456 faz parte da "ansa RKH" (aminoácidos 456-458 de Arginina-Lisina-



Histidina) no domínio Ig de Sp35 e pensa-se que seja importante para ligação do polipéptido antagonista de Sp35. O aumento na proteína MBP na presença de Sp35-Ig-Fc é comparável ao aumento na proteína MBP na presença da molécula de Sp35-Fc. (Fig. 15).

Péptidos cíclicos contendo porções do domínio Ig de Sp35 foram também testados para a sua capacidade para promover a mielinização no ensaio descrito no Exemplo 5. O péptido de Sp35 LSPRKH (aminoácidos 454-458) (SEQ ID N°: 61) foi ciclizado pela adição de uma cisteína no N-terminal e um resíduo de cisteína no C-terminal. O péptido foi capsulado com um grupo acetilo (Ac) no N-terminal e na unidade NH<sub>2</sub> no seu C-terminal. Adicionalmente, o péptido LSPRKH (SEQ ID N°: 61) foi também sintetizado com um grupo biotina ligado através do ligante aminoacídico GSGC no N-terminal e um resíduo de cisteína-NH<sub>2</sub> no C-terminal e está ciclizado. Os péptidos Sp35 cíclicos resultantes, Ac-CLSPRKH (SEQ ID N°: 66) e Biotina-GSGCLSPRKH (SEQ ID N°: 63) aumentaram a expressão de MBP, o principal componente proteico da mielina, em culturas tratadas como mostrado em transferências de Western. (Fig. 16). Outros péptidos cíclicos foram utilizados como controlos: biotina-GSGCLSPEKVC (SEQ ID N°: 65), biotina-GSGCKHSPLRC (SEQ ID N°: 64) e Ac-CLSPEKVC (SEQ ID N°: 67). Todos os péptidos de controlo não mostraram nenhum aumento de MBP em co-culturas tratadas. (Fig. 16).

Estes estudos indicam ainda que péptidos mais pequenos do domínio Ig de Sp35 podem actuar como um antagonista de Sp35 para libertar a inibição da mielinização por Sp35.

### **Exemplo 7**

DN-Sp35 actua em neurónios DRG e oligodendrócitos para promover a mielinização

Foram realizadas experiências para analisar as contribuições relativas ao processo de mielinização de Sp35 em neurónios DRG comparativamente a oligodendrócitos. Foram infectados neurónios DRG, oligodendrócitos e co-culturas (preparadas como descrito no Exemplo 5) com os vectores lentivirais FL-Sp35 e DN-Sp35 descritos no Exemplo 1 e foram realizadas colorações imuno-histoquímicas para células MBP<sup>+</sup> mielinizadas após duas semanas. Foi observado um aumento de 2 vezes nos níveis de MBP em co-culturas em que ambas as células expressam DN-Sp35 e uma diminuição de 2 vezes nos níveis de MBP em co-culturas em que ambas as células expressam FL-Sp35 (Fig. 10G).

A sobreexpressão de FL-Sp35 em qualquer um ou em ambos os tipos de células diminui significativamente os níveis basais da mielinização em comparação com o controlo (vector vazio). Por outro lado, a sobreexpressão de DN-Sp35 em qualquer ou em ambos os tipos de células aumentou os níveis basais da mielinização 2 a 3 vezes, comparativamente ao controlo (Fig. 10G). O Sp35-Fc adicionado exogenamente reverteu a inibição da mielinização por sobreexpressão de FL-Sp35 em qualquer um ou em ambos os tipos de células. Além disso, o Sp35-Fc exógeno aumentou ainda a mielinização se qualquer tipo de células sobreexpressar DN-Sp35 isoladamente e teve efeitos ligeiros se ambos os tipos de células sobreexpressarem DN-Sp35. Estes estudos indicam que a expressão de uma proteína Sp35 dominante negativa em oligodendrócitos e neurónios DRG, ou tratamento com proteína Sp35-Fc, contribui para mielinização eficaz.

### Exemplo 8

Murganhos silenciados para Sp35 apresentam início precoce de mielinização

Foram produzidos murganhos silenciados para Sp35 com um vector de substituição GFP/Neo (proteína verde fluorescente/neomicina) que foi direccionado para a sequência codificante inteira de exão único de Sp35, como descrito por Schiemann *et al.* (*Science* 293: 2111-2114 (2001)). O ADN 129/SvJ genómico de murganho foi isolado de uma biblioteca genómica lambda (Stratagene N° 946313). Um fragmento EcoRV de 14,6 kb foi subclonado em pBSK<sup>+</sup> e depois foi direccionado por recombinação homóloga em bactérias, para introduzir o gene repórter eGFP Q40 no ATG de iniciação. A construção final removeu a totalidade dos nucleótidos 1-1841 da sequência codificante de exão único de Sp35. Esta construção foi utilizada para direccionar o locus Sp35 em células estaminais embrionárias D3 (129/Sv). As células correctamente direccionadas foram identificadas por transferência de Southern de ADN de células estaminais embrionárias digerido com EcoRI e foram injectadas em blastocistos C57B1/6 para produzir murganhos quiméricos. Os murganhos quiméricos foram cruzados com murganhos C57B1/6 para produzir murganhos heterozigóticos iniciais. Os genótipos foram determinados por PCR com três iniciadores de ADN da cauda. O iniciador para a frente, 5'-CTATCCAAGCACTGCCTGCTC-3' (SEQ ID N°:53) e os dois iniciadores reversos, 5'-GAGTTCTAGCTCCTCCAGGTGTG-3' (SEQ ID N°: 54) e 5'-GATGCCCTTCAGCTCGATGCG-3' (SEQ ID N°: 55), produziram produtos de 275 pb de tipo selvagem e produtos de 356 pb de alelo mutante, respectivamente, numa reacção de 35 ciclos (94 °C durante 20 s, 65 °C durante 30 s, 72 °C durante 30 s). Ver Mi, S. *et al.*, *Nat. Neurosci.* 7: 221-228 (2004). A validação da

deleção do gene Sp35 foi realizada por análises de transferência de Southern, RT-PCR e transferência de Northern. As bandas proeminentes foram detectadas em transferência de Northern e RT-PCR em murganhos de tipo selvagem, mas uma completa ausência de bandas foi encontrada nos murganhos silenciados. A transferência de Southern dos heterozigotos mostrou o tipo selvagem e o alelo de Sp35 modificado. Os murganhos silenciados para Sp35 pareciam normais, sem quaisquer anomalias ou alterações físicas óbvias de comportamento, locomoção ou fecundidade. A ninhada de prole heterozigótica F1 variou em tamanho.

Os oligodendrócitos cultivados de murganhos silenciados para Sp35 foram avaliados por IHC para potenciais alterações na diferenciação. Foram observados oligodendrócitos que eram muito mais diferenciados e uma grande percentagem de oligodendrócitos maduros em Sp35 silenciado do que em culturas da ninhada de tipo selvagem. Porque o início da mielinização no desenvolvimento normal de murganhos ocorre tipicamente no dia 5 pós-nascimento (P), examinou-se a mielinização na espinha dorsal P1 de murganhos de tipo selvagem e de silenciados por microscopia electrónica. Consistente com as culturas *in vitro*, as espinhas dorsais de murganhos silenciados para Sp35 continham mais fibras axonais mielinizadas do que a ninhada de tipo selvagem. Fig. 11. Nenhuma alteração óbvia no nervo ciático do sistema nervoso periférico foi detectada nos murganhos silenciados, sugerindo que os efeitos da mielinização foram limitados ao SNC.

DRG e oligodendrócitos co-cultivados dos murganhos silenciados mostraram mais interação e mielinização em DRG e oligodendrócitos. DRG e oligodendrócitos co-cultivados dos murganhos silenciados para Sp35 mostram mais diferenciação e mielinização dos oligodendrócitos. Quando o tecido da espinha

dorsal dos murganhos silenciados foi examinado por microscopia electrónica, os murganhos silenciados para Sp35 recém-nascidos (dia 1 (P1) e dia 6 (P6) pós-nascimento) mostraram mais fibra de mielinização do que a ninhada de tipo selvagem.

Os murganhos transgênicos que sobreexpressam Sp35 de tipo selvagem foram também produzidos de acordo com o método de Hogan B., *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press (1986), pp. 153-183.* Quando os murganhos transgênicos que sobreexpressam Sp35 foram examinados por microscopia electrónica, os murganhos recém-nascidos (dia 8 (P8) pós-nascimento) mostraram menos fibra de mielinização do que a ninhada de tipo selvagem.

### **Exemplo 9**

Sp35-Fc promove a sobrevivência de oligodendrócitos e mielinização *in vivo*

Murganhos machos adultos C57B1/6 de tipo selvagem foram alimentados com cuprizona (0,2% em peso, moída com ração moída de murganho) durante 6 semanas para induzir desmielinização no corpo caloso. O Sp35-Fc foi injectado estereotacticamente no corpo caloso demielinizante a 2, 2,5 e 3 semanas de alimentação de cuprizona. Os murganhos de controlo foram injectados estereotacticamente nos mesmos intervalos de tempo, com meio esterilizado não contendo qualquer Sp35-Fc. Após 6 semanas de alimentação de cuprizona, os murganhos foram retornados a uma dieta normal durante 2, 4 e 6 semanas (apenas ração moída de murganho) para permitir a remielinização.

Os murganhos tratados com cuprizona foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (10 mg/kg de peso corporal) e posicionados num dispositivo de imobilização concebido para cirurgia estereotáctica (David Kopf Instruments). O escalpe foi aberto e os compostos estéreis injectados (1  $\mu$ M em 1 mL de HBSS) unilateralmente no corpo caloso demielinizado de forma aguda, dos murganhos recipientes de tipo selvagem com uma seringa Hamilton de 10 mL utilizando coordenadas estereotácticas de 0,7 mm posterior e 0,3 mm lateral à bregma a uma profundidade de 1,7 mm (Messier *et al.*, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 63(2): (1999)). Adicionalmente, murganhos recipientes de controlo foram injectados estereotacticamente com HBSS não contendo qualquer composto. A abertura no crânio foi preenchida com Gelfoam e a área foi limpa com penicilina e estreptomicina (Gibco) e a ferida foi suturada. Após a injeção, os murganhos foram sacrificados em cada semana da experiência e os seus cérebros foram removidos e processados para análise molecular, bioquímica e histológica.

Os animais que recebem tratamento com Sp35-Fc mostraram sobrevivência aumentada de oligodendrócitos maduros (com base em coloração com anticorpo CC1, Fig. 12) e mielinização axonal por IHC utilizando anticorpo anti-proteína MBP ou azul rápido de luxol (dados não mostrados).

### **Exemplo 10**

Transplantação *in vivo* de células transformadas com Sp35

Também foi investigada a função biológica de Sp35 na lesão da espinha dorsal. Foram infectadas células corticais primárias cultivadas (culturas mistas) com retrovírus que expressa Sp35 ou

um retrovírus de controlo, para distribuição no epicentro lesado de espinhas dorsais de rato. Foram introduzidas  $2 \times 10^6$  células e os ratos são sacrificados no dia 10. As espinhas dorsais são fixas em 4% de paraformaldeído, de um dia para o outro, depois desidratadas em 70% de etanol, seguido por 95% de etanol. As amostras de tecido são embebidas em parafina. São utilizadas secções (10 micrones de espessura) para coloração imuno-histoquímica. Monitoriza-se a sobrevivência dos oligodendrócitos e a mielinização axonal nos ratos lesados que recebem Sp35. Observa-se mais oligodendrócitos e mielinização axonal e menos retracção axonal nos animais que recebem células que expressam Sp35.

A construção de retrovírus Sp35 para estas experiências foi feita como se segue. O gene Sp35 foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores 5'-GATTACTCGAGATGCTGGCGGGGGCGTGAGG-3' (SEQ ID N°: 56), contendo um local *XhoI* e 5'-CGCGGGAATTCTCATATCATCTTCATGTTGAACTTG-3' (SEQ ID N°: 57), contendo um local *EcoRI*. O produto de PCR foi digerido com *XhoI* e *EcoRI*, depois ligado no vector de retrovírus pMIG (que contém IRES-GFP), que foi previamente clivado com *XhoI* e *EcoRI*. O novo vector foi denominado pMMC078. Todos os isolados de pMMC078 continham mutações pontuais inadvertidas, pelo que dois isolados de pMMC078 foram ligados em conjunto. O pMMC078.6 foi cortado com *XhoI* e *AccI* e o pMMC078.7 foi cortado com *XhoI* e *AccI*. Estes dois fragmentos foram ligados em conjunto para produzir o plasmídeo correcto final, pMMC089. A sequência de ADN da inserção foi confirmada por sequenciação de ADN. O retrovírus Sp35 foi feito como descrito. As células 293G foram divididas um dia antes da transfecção. Foram utilizados 8 µg de ADN de retrovírus Sp35 para transfectar  $5 \times 10^6$  células por lipofectamina (Invitrogen). O meio condicionante foi recolhido após 92 horas de pós-transfecção. O meio condicionado foi centrifugado a

5000 g durante 10 minutos e o sobrenadante utilizado como um stock de retrovírus Sp35. Este stock foi armazenado a 4 °C durante 1 semana ou -80 °C durante 6 meses.

### **Exemplo 11**

Sp35-Fc promove a sobrevivência neuronal e oligodendrócita após lesão da espinha dorsal (SCI) *in vivo*

A lesão da espinha dorsal foi induzida em ratos adultos fêmea Long Evans (190-210 g; Charles River). Uma hemisseção dorsal foi realizada em T6/T7, interrompendo totalmente os componentes do tracto corticoespinal (CST) principal dorsomedial e menor dorsolateral. A espinha foi transectada esterotaxicamente a uma profundidade de 1,8 mm da superfície utilizando um microbisturi. Imediatamente após transecção do CST, um cateter intratecal foi introduzido no espaço subaracnóide em T7 e conectado a uma bomba mini-osmótica iniciada (Alzet modelo 2004, Alza Corp.) introduzida no espaço subcutâneo. As bombas mini-osmóticas distribuíram 0,25 µL/h de 25 µM de proteína de fusão Sp35-Fc ou IgG humana (5 mg/mL) ou PBS como controlo. O cuidado pós-operatório compreendeu analgesia (Buprenorfina/Buprenex, Reckitt Benckiset Healthcare Ltd., 0,05 mg/kg subcutaneamente) cada 8-12 horas durante 3 dias e tratamento antibiótico (ampicilina, Bristol Myers Squibb, 100 mg/kg subcutaneamente duas vezes por dia) durante 7 dias após cirurgia. As bexigas foram esvaziadas manualmente duas vezes por dia na duração do estudo (4 semanas) ou até retorno da função. No final do estudo, os ratos foram anestesiados e perfundidos trans-cardiacamente com soro fisiológico heparinizado, seguido por 4% de paraformaldeído (PFA). As



espinhas dorsais foram removidas, fixas em parafina e foram cortadas secções de 10 µm para análise histológica.

Para quantificar a morte celular apoptótica após SCI, os animais foram sacrificados 3 ou 7 dias após SCI e corados utilizando anticorpo anti-Caspase-3-activada (Cell Signaling Technologies) e coloração de TUNEL (Promega). As secções foram também coradas com anticorpo anti-NeuN (Chemicon) e anticorpo anti-CC1 (Calbiochem) para identificar neurónios e oligodendrócitos, respectivamente.

Observou-se coloração de TUNEL extensiva tanto rostral como caudal ao local de transecção, 3 dias após SCI, e coloração com caspase-3-activada co-localizada com neurónios e oligodendrócitos. O número de neurónios e oligodendrócitos positivos à Caspase-3-activada foi significativamente menor nos animais tratados com Sp35-Fc do que nos controlos, 3 dias após SCI. Além disso, quatro semanas após SCI, mais neurónios e oligodendrócitos sobreviveram no tecido da espinha dorsal que circunda o local da lesão em animais tratados com Sp35-Fc, do que em controlos, com base na coloração com anticorpo anti-βIII-tubulina (sobrevivência neuronal) e anticorpo anti-O4 (sobrevivência oligodendrócita).

### **Exemplo 12**

Sp35-Fc reduz a activação da Caspase-3 e a morte celular *in vitro*

Células PC12 (Neuroscreen) foram diferenciadas em meio RPMI-1640 suplementado com 5% de soro fetal de bovino, 10% de soro de cavalo, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de

estreptomicina contendo 200 ng/mL de NGF durante 7 dias. Para as experiências, o meio de cultura foi substituído com meio de cultura sem NGF contendo Sp35-Fc, IgG humana como um controlo negativo (0,1-10  $\mu$ M) ou zVAD como um controlo positivo (0,1  $\mu$ M). 18 horas após retirada de NGF, a Caspase-3 activada foi quantificada utilizando o kit Caspase 3/7 Glo (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. 42 horas após a retirada de NGF, a morte celular apoptótica foi quantificada utilizando um kit de ELISA de detecção de morte celular (Roche) de acordo com as instruções do fabricante.

Observou-se que 0,1  $\mu$ M de Sp35-Fc reduziu a activação da Caspase-3 em células PC12 diferenciadas privadas de apoio trófico, 18 horas após a remoção de NGF do meio de cultura. O efeito de Sp35-Fc na activação da Caspase-3 foi dependente da dose e a doses mais elevadas (1 ou 10  $\mu$ M) foi tão eficaz quanto uma dose neuroprotectora do inibidor da caspase zVAD (0,1  $\mu$ M) (Fig. 14). Como uma medida adicional da morte celular, quantificou-se a apoptose utilizando um método de ELISA TUNEL e verificou-se que Sp35-Fc reduziu significativamente a morte celular medida 42 horas após a retirada de NGF (Fig. 13).

#### LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Biogen Idec

Mi, Sha

Pepinsky, R. Blake

McCoy, John

<120> Tratamento de estados que envolvem desmielinização

<212> 2159.046PC05

<140> n° a ser atribuído

<141> data

<150> 60/680475

<151> 2005-05-13

<150> 60/628435

<151> 2004-11-15

<150> 60/617297

<151> 2004-10-07

<150> 60/582966

<151> 2004-06-24

<160> 79

<151> PatentIn versão 3.2

<210> 1

<211> 1845

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
atgctggcgg ggggcgtgag gagcatgcc agccccctcc tggcctgctg gcagcccatc      60
ctcctgctgg tgctgggctc agtgctgtca ggctcggcca cgggctgccc gccccgctgc     120
gagtgtctccg cccaggaccg cgctgtgctg tgccaccgca agcgctttgt ggcagtcccc     180
gagggcatcc ccaccgagac ggcctgctg gacctaggca agaaccgcat caaaacgctc      240
aaccaggacg agttcgccag cttcccgcac ctggaggagc tggagctcaa cgagaacatc     300
gtgagcgccg tggagccccg cgccttcaac aacctttca acctccggac gctgggtctc     360
cgcagcaacc gcctgaagct catcccgcta ggcgtcttca ctggcctcag caacctgacc     420
```

aagctggaca	tcagcgagaa	caagattggt	atcctgctgg	actacatggt	tcaggacctg	480
tacaacctca	agtcactgga	ggttggcgac	aatgacctcg	tctacatctc	tcaccgcgcc	540
ttcagcggcc	tcaacagcct	ggagcagctg	acgctggaga	aatgcaacct	gacctccatc	600
cccaccgagg	cgctgtccca	cctgcacggc	ctcatcgtcc	tgaggctccg	gcacctcaac	660
atcaatgcca	tccgggacta	ctcettcaag	aggctctacc	gactcaagggt	cttggagatc	720
tcccactggc	cctacttggg	cacatgaca	cccaactgcc	tctacggcct	caacctgacg	780
tccctgtcca	tcacacactg	caatctgacc	gctgtgccct	acctggccgt	ccgccaccta	840
gtctatctcc	gcttcctcaa	cctctcctac	aaccccatca	gcaccattga	gggctccatg	900
ttgcatgagc	tgctccggct	gcaggagatc	cagctgggtg	gcgggcagct	ggccgtgggtg	960
gagccctatg	ccttccgcgg	cctcaactac	ctgcgcgtgc	tcaatgtctc	tggcaaccag	1020
ctgaccacac	tggaggaatc	agtcttccac	tcggtgggca	acctggagac	actcatcctg	1080
gactccaacc	cgctggcctg	cgactgtcgg	ctcctgtggg	tgttccggcg	ccgctggcgg	1140
ctcaacttca	accggcagca	gcccacgtgc	gccacgcccg	agtttgtcca	gggcaaggag	1200
ttcaaggact	tcctgatgtg	gctactgccc	aactacttca	cctgccgccg	cgcccgcatac	1260
cgggaccgca	aggcccagca	ggtgtttgtg	gacgagggcc	acacggtgca	gtttgtgtgc	1320
cgggccgatg	gcgacccgcc	gcccgccatc	ctctggctct	caccccgaaa	gcacctggtc	1380
tcagccaaga	gcaatgggcg	gctcacagtc	ttccctgatg	gcacgctgga	ggtgcgctac	1440
gcccaggtag	aggacaacgg	cacgtacctg	tgcatcgcgg	ccaacgcggg	cggcaacgac	1500
tccatgcccc	cccacctgca	tgtgcgcagc	tactcgcccc	actggcccca	tcagcccaac	1560
aagaccttcg	ctttcatctc	caaccagccg	ggcgagggag	aggccaacag	cacccgcgcc	1620
actgtgcctt	tccccttcga	catcaagacc	ctcatcatcg	ccaccacat	gggcttcatac	1680
tctttcctgg	gcgtcgtcct	cttctgcctg	gtgctgctgt	ttctctggag	ccggggcaag	1740
ggcaacacaa	agcacaacat	cgagatcgag	tatgtgcccc	gaaagtcgga	cgcaggcatc	1800
agctccgccg	acgcgccccg	caagttcaac	atgaagatga	tatga		1845

<210> 1  
 <211> 614  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Ala Gly Gly Val Arg Ser Met Pro Ser Pro Leu Leu Ala Cys  
1 5 10 15  
Trp Gln Pro Ile Leu Leu Leu Val Leu Gly Ser Val Leu Ser Gly Ser  
20 25 30  
Ala Thr Gly Cys Pro Pro Arg Cys Glu Cys Ser Ala Gln Asp Arg Ala  
35 40 45  
Val Leu Cys His Arg Lys Arg Phe Val Ala Val Pro Glu Gly Ile Pro  
50 55 60  
Thr Glu Thr Arg Leu Leu Asp Leu Gly Lys Asn Arg Ile Lys Thr Leu  
65 70 75 80  
Asn Gln Asp Glu Phe Ala Ser Phe Pro His Leu Glu Glu Leu Glu Leu  
85 90 95  
Asn Glu Asn Ile Val Ser Ala Val Glu Pro Gly Ala Phe Asn Asn Leu  
100 105 110  
Phe Asn Leu Arg Thr Leu Gly Leu Arg Ser Asn Arg Leu Lys Leu Ile  
115 120 125  
Pro Leu Gly Val Phe Thr Gly Leu Ser Asn Leu Thr Lys Leu Asp Ile  
130 135 140  
Ser Glu Asn Lys Ile Val Ile Leu Leu Asp Tyr Met Phe Gln Asp Leu  
145 150 155 160  
Tyr Asn Leu Lys Ser Leu Glu Val Gly Asp Asn Asp Leu Val Tyr Ile  
165 170 175  
Ser His Arg Ala Phe Ser Gly Leu Asn Ser Leu Glu Gln Leu Thr Leu  
180 185 190  
Glu Lys Cys Asn Leu Thr Ser Ile Pro Thr Glu Ala Leu Ser His Leu  
195 200 205  
His Gly Leu Ile Val Leu Arg Leu Arg His Leu Asn Ile Asn Ala Ile  
210 215 220  
Arg Asp Tyr Ser Phe Lys Arg Leu Tyr Arg Leu Lys Val Leu Glu Ile  
225 230 235 240

Ser His Trp Pro Tyr Leu Asp Thr Met Thr Pro Asn Cys Leu Tyr Gly  
 245 250 255  
 Leu Asn Leu Thr Ser Leu Ser Ile Thr His Cys Asn Leu Thr Ala Val  
 260 265 270  
 Pro Tyr Leu Ala Val Arg His Leu Val Tyr Leu Arg Phe Leu Asn Leu  
 275 280 285  
 Ser Tyr Asn Pro Ile Ser Thr Ile Glu Gly Ser Met Leu His Glu Leu  
 290 300  
 Leu Arg Leu Gln Glu Ile Gln Leu Val Gly Gly Gln Leu Ala Val Val  
 305 310 315 320  
 Glu Pro Tyr Ala Phe Arg Gly Leu Asn Tyr Leu Arg Val Leu Asn Val  
 325 330 335  
 Ser Gly Asn Gln Leu Thr Thr Leu Glu Glu Ser Val Phe His Ser Val  
 340 345 350  
 Gly Asn Leu Glu Thr Leu Ile Leu Asp Ser Asn Pro Leu Ala Cys Asp  
 355 365  
 Cys Arg Leu Leu Trp Val Phe Arg Arg Arg Trp Arg Leu Asn Phe Asn  
 370 375 380  
 Arg Gln Gln Pro Thr Cys Ala Thr Pro Glu Phe Val Gln Gly Lys Glu  
 385 390 395 400  
 Phe Lys Asp Phe Pro Asp Val Leu Leu Pro Asn Tyr Phe Thr Cys Arg  
 405 410 415  
 Arg Ala Arg Ile Arg Asp Arg Lys Ala Gln Gln Val Phe Val Asp Glu  
 420 425 430  
 Gly His Thr Val Gln Phe Val Cys Arg Ala Asp Gly Asp Pro Pro Pro  
 435 440 445  
 Ala Ile Leu Trp Leu Ser Pro Arg Lys His Leu Val Ser Ala Lys Ser  
 450 455 460  
 Asn Gly Arg Leu Thr Val Phe Pro Asp Gly Thr Leu Glu Val Arg Tyr  
 465 470 475 480

Ala Gln Val Gln Asp Asn Gly Thr Tyr Leu Cys Ile Ala Ala Asn Ala  
485 490 495

Gly Gly Asn Asp Ser Met Pro Ala His Leu His Val Arg Ser Tyr Ser  
500 505 510

Pro Asp Trp Pro His Gln Pro Asn Lys Thr Phe Ala Phe Ile Ser Asn  
515 520 525

Gln Pro Gly Glu Gly Glu Ala Asn Ser Thr Arg Ala Thr Val Pro Phe  
530 535 540

Pro Phe Asp Ile Lys Thr Leu Ile Ile Ala Thr Thr Met Gly Phe Ile  
545 550 555 560

Ser Phe Leu Gly Val Val Leu Phe Cys Leu Val Leu Leu Phe Leu Trp  
565 570 575

Ser Arg Gly Lys Gly Asn Thr Lys His Asn Ile Glu Ile Glu Tyr Val  
580 585 590

Pro Arg Lys Ser Asp Ala Gly Ile Ser Ser Ala Asp Ala Pro Arg Lys  
595 600 605

Phe Asn Met Lys Met Ile  
610

<210> 3  
<211> 1845  
<212> ADN  
<213> Mus sp.

<400> 3

atgctggcag ggggtatgag aagcatgccc agccccctcc tggcctgctg gcagcccatc	60
ctcctgctgg tactgggctc agtgctgtca ggctctgcta caggctgccc gccccgctgc	120
gagtgctcag cgcaggaccg agccgtgctc tgccaccgca aacgctttgt ggcggtgccc	180
gagggcatcc ccaccgagac tcgcctgctg gacctgggca aaaaccgcat caagacactc	240
aaccaggacg agtttgccag cttccacac ctggaggagc tagaactcaa tgaaaacatc	300

gtgagcgccg	tggagccagg	cgccttcaac	aacctttca	acctgaggac	tctggggctg	360
cgcagcaacc	gcctgaagct	tatcccgctg	ggcgtcttca	ccggcctcag	caacttgacc	420
aagctggaca	tcagtgagaa	caagatcgtc	atcctgctag	actacatggt	ccaagaccta	480
tacaacctca	agtcgctgga	ggtcggcgac	aacgacctcg	tctacatctc	ccatcgagcc	540
ttcagcggcc	tcaacagcct	ggaacagctg	acgctggaga	aatgcaatct	gacctccatc	600
cccacggagg	cgctctcca	cctgcacggc	ctcatcgtcc	tgcggctacg	acatctcaac	660
atcaatgcca	tcagggacta	ctccttcaag	aggctgtacc	gacttaagggt	cttagagatc	720
tcccactggc	cctacctgga	caccatgacc	cccaactgcc	tctacggcct	caacctgaca	780
tccttatcca	tcacgactg	caacctgaca	gccgtgccct	atctggcagt	gcgtcacctg	840
gtctatctcc	gtttctcaa	cctttcttac	aaccaatcg	gtacaatcga	gggctccatg	900
ctgcatgagc	tgctgcggtt	gcaggagatc	cagctgggtg	gcgggcagct	ggccgtggtg	960
gagccctatg	cctttcgtgg	gctcaactac	ctgcgtgtgc	tcaatgtctc	tggcaaccag	1020
ctgaccaccc	tggaggagtc	agccttccat	tcggtgggca	acctggagac	gctcatcctg	1080
gactccaacc	cactggcctg	tgactgccgg	ctgctgtggg	tgttccggcg	ccgctggcgg	1140
ctcaacttca	acaggcagca	gcccacctgc	gccacacctg	agttcgtcca	gggcaaagag	1200
ttcaaggact	ttccgatgt	actcctacc	aactacttca	cctgccgccg	ggccccatc	1260
cgggaccgca	aggcacagca	ggtgtttgta	gatgagggcc	acacggtgca	gtttgtatgc	1320
cgggcagatg	gcgaccctcc	accagctatc	ctttggctct	caccccgcaa	gcacttggtc	1380
tcggccaaga	gcaatggcg	gctcacagtc	ttcctgatg	gcacgctgga	ggtgcgctac	1440
gcccaggtac	aggacaacgg	cacgtacctg	tgcatcgcag	ccaatgctgg	cggcaacgac	1500
tccatgcccg	cccacttgca	tgtgcgcagc	tactcgctg	actggcccca	tcaaccaac	1560
aagaccttcg	ccttcatctc	caaccagcca	ggcgagggag	aggccaacag	cacccgcgcc	1620
actgtgcctt	tccccttca	catcaagacg	ctcattatcg	ccaccacat	gggcttcatc	1680
tccttcttgg	gcgttgtcct	attctgcctg	gtgctgctgt	ttctatggag	ccggggcaaa	1740
ggcaacacaa	agcacaacat	cgaaattgag	tatgtgcccc	ggaaatcgga	cgcaggcatc	1800
agctcagctg	atgcaccccg	caagttcaac	atgaagatga	tatga		1845



<210> 4  
<211> 614  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<400> 4

Met Leu Ala Gly Gly Met Arg Ser Met Pro Ser Pro Leu Leu Ala Cys  
1 5 10 15  
Trp Gln Pro Ile Leu Leu Leu Val Leu Gly Ser Val Leu Ser Gly Ser  
20 25 30  
Ala Thr Gly Cys Pro Pro Arg Cys Glu Cys Ser Ala Gln Asp Arg Ala  
35 40 45  
Val Leu Cys His Arg Lys Arg Phe Val Ala Val Pro Glu Gly Ile Pro  
50 55 60  
Thr Glu Thr Arg Leu Leu Asp Leu Gly Lys Asn Arg Ile Lys Thr Leu  
65 70 75 80  
Asn Gln Asp Glu Phe Ala Ser Phe Pro His Leu Glu Glu Leu Glu Leu  
85 90 95  
Asn Glu Asn Ile Val Ser Ala Val Glu Pro Gly Ala Phe Asn Asn Leu  
100 105 110  
Phe Asn Leu Arg Thr Leu Gly Leu Arg Ser Asn Arg Leu Lys Leu Ile  
115 120 125  
Pro Leu Gly Val Phe Thr Gly Leu Ser Asn Leu Thr Lys Leu Asp Ile  
130 135 140  
Ser Glu Asn Lys Ile Val Ile Leu Leu Asp Tyr Met Phe Gln Asp Leu  
145 150 155 160  
Tyr Asn Leu Lys Ser Leu Glu Val Gly Asp Asn Asp Leu Val Tyr Ile  
165 170 175  
Ser His Arg Ala Phe Ser Gly Leu Asn Ser Leu Glu Gln Leu Thr Leu  
180 185 190

Glu Lys Cys Asn Leu Thr Ser Ile Pro Thr Glu Ala Leu Ser His Leu  
 195 200 205

His Gly Leu Ile Val Leu Arg Leu Arg His Leu Asn Ile Asn Ala Ile  
 210 215 220

Arg Asp Tyr Ser Phe Lys Arg Leu Tyr Arg Leu Lys Val Leu Glu Ile  
 225 230 235 240

Ser His Trp Pro Tyr Leu Asp Thr Met Thr Pro Asn Cys Leu Tyr Gly  
 245 250 255

Leu Asn Leu Thr Ser Leu Ser Ile Thr His Cys Asn Leu Thr Ala Val  
 260 265 270

Pro Tyr Leu Ala Val Arg His Leu Val Tyr Leu Arg Phe Leu Asn Leu  
 275 280 285

Ser Tyr Asn Pro Ile Gly Thr Ile Glu Gly Ser Met Leu His Glu Leu  
 290 295 300

Leu Arg Leu Gln Glu Ile Gln Leu Val Gly Gly Gln Leu Ala Val Val  
 305 310 315 320

Glu Pro Tyr Ala Phe Arg Gly Leu Asn Tyr Leu Arg Val Leu Asn Val  
 325 330 335

Ser Gly Asn Gln Leu Thr Thr Leu Glu Glu Ser Ala Phe His Ser Val  
 340 345 350

Gly Asn Leu Glu Thr Leu Ile Leu Asp Ser Asn Pro Leu Ala Cys Asp  
 355 360 365

Cys Arg Leu Leu Trp Val Phe Arg Arg Arg Trp Arg Leu Asn Phe Asn  
 370 375 380

Arg Gln Gln Pro Thr Cys Ala Thr Pro Glu Phe Val Gln Gly Lys Glu  
 385 390 395 400

Phe Lys Asp Phe Pro Asp Val Leu Leu Pro Asn Tyr Phe Thr Cys Arg  
 405 410 415

Arg Ala His Ile Arg Asp Arg Lys Ala Gln Gln Val Phe Val Asp Glu  
 420 425 430

Gly His Thr Val Gln Phe Val Cys Arg Ala Asp Gly Asp Pro Pro Pro  
435 440 445

Ala Ile Leu Trp Leu Ser Pro Arg Lys His Leu Val Ser Ala Lys Ser  
450 455 460

Asn Gly Arg Leu Thr Val Phe Pro Asp Gly Thr Leu Glu Val Arg Tyr  
465 470 475 480

Ala Gln Val Gln Asp Asn Gly Thr Tyr Leu Cys Ile Ala Ala Asn Ala  
485 490 495

Gly Gly Asn Asp Ser Met Pro Ala His Leu His Val Arg Ser Tyr Ser  
500 505 510

Pro Asp Trp Pro His Gln Pro Asn Lys Thr Phe Ala Phe Ile Ser Asn  
515 520 525

Gln Pro Gly Glu Gly Glu Ala Asn Ser Thr Arg Ala Thr Val Pro Phe  
530 535 540

Pro Phe Asp Ile Lys Thr Leu Ile Ile Ala Thr Thr Met Gly Phe Ile  
545 550 555 560

Ser Phe Leu Gly Val Val Leu Phe Cys Leu Val Leu Leu Phe Leu Trp  
565 570 575

Ser Arg Gly Lys Gly Asn Thr Lys His Asn Ile Glu Ile Glu Tyr Val  
580 585 590

Pro Arg Lys Ser Asp Ala Gly Ile Ser Ser Ala Asp Ala Pro Arg Lys  
595 600 605

Phe Asn Met Lys Met Ile  
610

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

**Met Gln Val Ser Lys Arg**  
**1 5**

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (3)..(5)

<223> Xaa é qualquer aminoácido básico

<400> 6

**Ile Thr Xaa Xaa Xaa**  
**1 5**

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (3)..(5)

<223> Xaa é qualquer aminoácido básico

<400> 7

**Ala Cys Xaa Xaa Xaa**  
**1 5**

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (3)..(5)

<223> Xaa é qualquer aminoácido básico

<400> 8

**Val Cys Xaa Xaa Xaa**  
**1 5**

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (3)..(5)

<223> Xaa é qualquer aminoácido básico

<400> 9

**Ser Pro Xaa Xaa Xaa**  
**1 5**

<210> 10  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 10

**Ser Pro Arg Lys His**  
**1 5**

<210> 11  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 11

**Ser Pro Arg Lys Lys**  
**1 5**

<210> 12  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 12

**Ser Pro Arg Lys Arg**  
**1 5**

<210> 13  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 13

**Ser Pro Lys Lys His**  
**1 5**

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

**Ser Pro His Lys His**  
**1 5**

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

**Ser Pro Arg Arg His**  
**1 5**

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

**Ser Pro Arg His His**  
**1 5**

<210> 17  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 17

**Ser Pro Arg Arg Arg**  
**1 5**

<210> 18  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 18

**Ser Pro His His His**  
**1 5**

<210> 19  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 19

**Ser Pro Lys Lys Lys**  
**1 5**

<210> 20  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens



<400> 20

Ile Thr Pro Lys Arg Arg  
1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Ala Cys His His Lys  
1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Val Cys His His Lys  
1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica\_misc

<222> (1)..(2)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 23

**Xaa Xaa Arg Lys His**  
**1 5**

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica\_misc

<222> (1)..(2)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 24

**Xaa Xaa Arg Arg Arg**  
**1 5**

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica\_misc

<222> (1)..(2)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 25

**Xaa Xaa Lys Lys Lys**  
**1 5**

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica\_misc

<222> (1)..(2)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 26

**Xaa Xaa His His His**  
**1 5**

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica\_misc

<222> (1)..(2)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 27

**Xaa Xaa Arg Lys Lys**  
**1 5**

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica\_misc

<222> (1)..(2)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 28

**Xaa Xaa Arg Lys Arg**  
**1 5**

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica\_misc

<222> (1)..(2)

<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 29

**Xaa Xaa Lys Lys His**  
**1 5**

<210> 30  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(2)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 30  
**Xaa Xaa His Lys His**  
**1 5**

<210> 31  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(2)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 31  
**Xaa Xaa Arg Arg His**  
**1 5**

<210> 32  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(2)  
<223> Xaa pode ser qualquer aminoácido de ocorrência natural

<400> 32  
**Xaa Xaa Arg His His**  
**1 5**

<210> 33  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 33  
**Arg Arg Ala Arg Ile Arg Asp Arg Lys**  
**1 5**

<210> 34  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 34  
**Lys Lys Val Lys Val Lys Glu Lys Arg**  
**1 5**

<210> 35  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 35

**Arg Arg Leu Arg Leu Arg Asp Arg Lys**  
**1 5**

<210> 36  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 36

**Arg Arg Gly Arg Gly Arg Asp Arg Lys**  
**1 5**

<210> 37  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 37

**Arg Arg Ile Arg Ala Arg Asp Arg Lys**  
**1 5**

<210> 38

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220> ADN

<223> Iniciador para a frente de RT-PCR de rato

<400> 38

**agagacatgc gattggtga**

**19**

<210> 39

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220> ADN

<223> Iniciador inverso de RT-PCR de rato

<400> 39

**agagatgtag acgaggtcat t**

**21**

<210> 40

<211> 55

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220> ADN

<223> LV1-035 (oligo de sentido)



<400> 40  
**tgatcgtcat cctgctagac ttcaagagag tctagcagga tgacgatctt ttttc** 55

<210> 41  
<211> 59  
<212> ADN  
<213> Sequência artificial

<220> ADN  
<223> LV1-036 (oligo anti-sentido)

<400> 41  
**tcgagaaaaa agatcgtcat cctgctagac tctcttgaag tctagcagga tgacgatca** 59

<210> 42  
<211> 59  
<212> ADN  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Controlo de LV1-035

<400> 42  
**tgatcctcat ccttctatac ttcaagagag tgtagcagga tgacgatctt ttttctcga** 59

<210> 43  
<211> 59  
<212> ADN  
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Controlo de LV1-036

<400> 43

**tcgagaaaa agatcgatcat cctgctagac tctcttgaag tatagaagga tgacgatca 59**

<210> 44

<211> 41

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador FL-Sp35

<400> 44

**gaggatctcg acgcggccgc atggagacag acacactcct g 41**

<210> 45

<211> 41

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador FL-Sp35

<400> 45

**ggggcggaat tggatcctca cagatcctct tctgagatga g 41**

<210> 46  
<211> 41  
<212> ADN  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Iniciador DN-Sp35

<400> 46

**gaggatctcg acgcgccgc atggagacag acacactcct g**

**41**

<210> 47  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Iniciador DN-Sp35

<400> 47

**gatacggatc ctcagccttt gccccggctc catagaaaca gc**

**42**

<210> 48  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Iniciador para a frente de Sp35 humano

<400> 48

**cagcaggtcg acgcggccgc atgctggcgg ggggcgt**

37

<210> 49

<211> 59

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador inverso de Sp35 humano

<400> 49

**cagcaggtcg acctcgcccg gctggttggc caaccagccg ggcgaggtcg acctcgagg**

59

<210> 50

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador inverso de Sp35

<400> 50

**ctttcccctt cgacatcaag ac**

22

<210> 51

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador inverso de Sp35

<400> 51

**cagcagcacc aggcagaa**

**18**

<210> 52

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sonda marcada com FAM

<400> 52

**atcgccacca ccatgggctt cat**

**23**

<210> 53

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador para a frente de murganho

<400> 53

**ctatccaagc actgcctgct c**

**21**

<210> 54  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Iniciador inverso de murganho

<400> 54

**gagttctagc tcctccaggt gtg**

**23**

<210> 55  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Iniciador inverso de murganho

<400> 55

**gatgcccttc agctcgatgc g**

**21**

<210> 56  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Iniciador Sp35

<400> 56

**gattactcga gatgctggcg gggggcgtga gg**

**32**

<210> 57

<211> 36

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador Sp35

<400> 57

**cgcggaatt ctcatatcat ctccatgttg aacttg**

**36**

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

**Gly Ser Gly Cys Leu Ser Pro Arg Lys His**  
**1 5 10**

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Gly Ser Gly Cys Leu Ser Pro Arg Ile His  
1 5 10

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Gly Ser Gly Cys Ile Pro Gln Ser  
1 5

<210> 61

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Leu Ser Pro Arg Lys His  
1 5

<210> 62

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Leu Ser Pro Glu Lys Val  
1 5



<210> 63  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
<222> (1)..(1)  
<223> Posição 1 é Gly-Biotinilada

<400> 63  
**Gly Ser Gly Cys Leu Ser Pro Arg Lys His Cys**  
**1 5 10**

<210> 64  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
<222> (1)..(1)  
<223> Posição 1 é Gly-Biotinilada

<400> 64  
**Gly Ser Gly Cys Lys His Ser Pro Leu Arg Cys**  
**1 5 10**

<210> 65  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
<222> (1)..(1)  
<223> Posição 1 é Gly-Biotinilada

<400> 65  
**Gly Ser Gly Cys Leu Ser Pro Glu Lys Val Cys**  
**1 5 10**

<210> 66  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
<222> (1)..(1)  
<223> Posição 1 é Cys-Acetilada

<400> 66  
**Cys Leu Ser Pro Arg Lys His Cys**  
**1 5**

<210> 67  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
<222> (1)..(1)

<223> Posição 1 é Cys-Acetilada

<400> 67

**Cys Leu Ser Pro Glu Lys Val Cys**  
**1 5**

<210> 68

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (3)..(3)

<223> Xaa é qualquer aminoácido básico

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (4)..(4)

<223> Xaa é qualquer aminoácido

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (5)..(5)

<223> Xaa é qualquer aminoácido básico

<400> 68

**Ile Thr Xaa Xaa Xaa**  
**1 5**

<210> 69  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa é qualquer aminoácido básico

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa é qualquer aminoácido

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa é qualquer aminoácido básico

<400> 69

**Ala Cys Xaa Xaa Xaa**  
**1 5**

<210> 70  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
<222> (3)..(3)

<223> Xaa é qualquer aminoácido básico

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (4)..(4)

<223> Xaa é qualquer aminoácido

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (5)..(5)

<223> Xaa é qualquer aminoácido básico

<400> 70

**Val Cys Xaa Xaa Xaa**  
**1 5**

<210> 71

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (3)..(3)

<223> Xaa é qualquer aminoácido básico

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (4)..(4)

<223> Xaa é qualquer aminoácido

<220>  
<221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa é qualquer aminoácido básico

<400> 71

**Ser Pro Xaa Xaa Xaa**  
**1 5**

<210> 72  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 72

**Ser Pro Arg Leu His**  
**1 5**

<210> 73  
<211> 200  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> Estrutura geral para um oligonucleótido utilizado na  
preparação de uma molécula de siARN

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(200)  
<223> n é a, c, g, t ou u

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (2)..(200)  
<223> Poderá faltar nucleótido

<400> 73  
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 60  
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 120  
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 180  
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 200

<210> 74  
<211> 200  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> Estrutura geral para um oligonucleótido utilizado na  
preparação de uma molécula de siARN

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(200)  
<223> n é a, c, g, t ou u

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (2)..(200)  
<223> Poderá faltar nucleótido

<400> 74  
 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 60  
 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 120  
 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 180  
 0000000000 0000000000 200

<210> 75  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 75  
 Gly Ser Gly Cys Leu Ser Pro Arg Lys His Cys  
 1 5 10

<210> 76  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 76  
 Gly Ser Gly Cys Lys His Ser Pro Leu Arg Cys  
 1 5 10

<210> 77  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens



<400> 77

Gly Ser Gly Cys Leu Ser Pro Glu Lys Val Cys  
1 5 10

<210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Cys Leu Ser Pro Arg Lys His Cys  
1 5

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Cys Leu Ser Pro Glu Lys Val Cys  
1 5

Lisboa, 19 de Novembro de 2012

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Método *in vitro* para promover a diferenciação ou a sobrevivência de oligodendrócitos, cujo método compreende colocar em contacto oligodendrócitos que expressam Sp35 com uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo um antagonista de Sp35 (LINGO-1) seleccionado do grupo consistindo de:
  - (i) um polipéptido Sp35 solúvel que carece de um domínio transmembranar de Sp35 e de um domínio citoplasmático de Sp35;
  - (ii) um anticorpo de Sp35 ou um seu fragmento de ligação a antigénio;
  - (iii) um polipéptido antagonista de Sp35 seleccionado do grupo consistindo de: (a) um polipéptido anti-sentido; (b) uma ribozima; (c) um pequeno ARN de interferência (siARN); e (d) um ARN de gancho-de-cabelo pequeno (shARN); e
  - (iv) uma combinação de dois ou mais dos referidos antagonistas de Sp35.
2. Antagonista de Sp35 (LINGO-1) seleccionado do grupo consistindo de:
  - (i) um polipéptido Sp35 solúvel que carece de um domínio transmembranar de Sp35 e de um domínio citoplasmático de Sp35;

- (ii) um anticorpo de Sp35 ou um seu fragmento de ligação a antigénio;
- (iii) um polipéptido antagonista de Sp35 seleccionado do grupo consistindo de: (a) um polipéptido anti-sentido; (b) uma ribozima; (c) um pequeno ARN de interferência (siARN); e (d) um ARN de gancho-de-cabelo pequeno (shARN); e
- (iv) uma combinação de dois ou mais dos referidos antagonistas de Sp35;

para utilização num método de tratamento de esclerose múltipla num mamífero, através da promoção da diferenciação ou sobrevivência de oligodendrócitos que expressam Sp35.

3. Método da reivindicação 1, ou o antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o referido antagonista de Sp35 compreende um polipéptido Sp35 solúvel.
4. Método da reivindicação 3 ou o antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 3, em que o referido polipéptido Sp35 solúvel compreende:
  - (i) um domínio Ig de Sp35;
  - (ii) um domínio LRR de Sp35;
  - (iii) uma região básica de Sp35 C-terminal ao domínio LRR.

5. Método da reivindicação 3 ou o antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 3, em que o referido polipéptido Sp35 solúvel compreende um domínio LRR de Sp35 e carece de:
- (i) um domínio Ig de Sp35; e
  - (ii) uma região básica de Sp35 C-terminal ao domínio LRR.
6. Método da reivindicação 3 ou o antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 3, em que o referido polipéptido Sp35 solúvel carece de um domínio Ig de Sp35 e de um domínio LRR de Sp35.
7. Método de qualquer uma das reivindicações 1 ou 3 a 6, ou o antagonista para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 6, em que o referido polipéptido Sp35 solúvel compreende um fragmento de polipéptido seleccionado do grupo consistindo de:
- (i) aminoácidos 1 a 33 da SEQ ID N°: 2;
  - (ii) aminoácidos 1 a 35 da SEQ ID N°: 2;
  - (iii) aminoácidos 34 a 64 da SEQ ID N°: 2;
  - (iv) aminoácidos 36 a 64 da SEQ ID N°: 2;
  - (v) aminoácidos 66 a 89 da SEQ ID N°: 2;
  - (vi) aminoácidos 90 a 113 da SEQ ID N°: 2;

- (vii) aminoácidos 114 a 137 da SEQ ID N°: 2;
- (viii) aminoácidos 138 a 161 da SEQ ID N°: 2;
- (ix) aminoácidos 162 a 185 da SEQ ID N°: 2;
- (x) aminoácidos 186 a 209 da SEQ ID N°: 2;
- (xi) aminoácidos 210 a 233 da SEQ ID N°: 2;
- (xii) aminoácidos 234 a 257 da SEQ ID N°: 2;
- (xiii) aminoácidos 258 a 281 da SEQ ID N°: 2;
- (xiv) aminoácidos 282 a 305 da SEQ ID N°: 2;
- (xv) aminoácidos 306 a 329 da SEQ ID N°: 2;
- (xvi) aminoácidos 330 a 353 da SEQ ID N°: 2;
- (xvii) aminoácidos 363 a 416 da SEQ ID N°: 2;
- (xviii) aminoácidos 417 a 424 da SEQ ID N°: 2;
- (xix) aminoácidos 419 a 493 da SEQ ID N°: 2;
- (xx) aminoácidos 494 a 551 da SEQ ID N°:2.

8. Método de qualquer uma das reivindicações 1 ou 3 a 6, ou o antagonista para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 6, em que o referido polipéptido Sp35 solúvel compreende um fragmento de polipéptido seleccionado do grupo consistindo de:

- (i) aminoácidos 1 a 64 da SEQ ID N°: 2;
- (ii) aminoácidos 1 a 89 da SEQ ID N°: 2;
- (iii) aminoácidos 1 a 113 da SEQ ID N°: 2;
- (iv) aminoácidos 1 a 137 da SEQ ID N°: 2;
- (v) aminoácidos 1 a 161 da SEQ ID N°: 2;
- (vi) aminoácidos 1 a 185 da SEQ ID N°: 2;
- (vii) aminoácidos 1 a 209 da SEQ ID N°: 2;
- (viii) aminoácidos 1 a 233 da SEQ ID N°: 2;
- (ix) aminoácidos 1 a 257 da SEQ ID N°: 2;
- (x) aminoácidos 1 a 281 da SEQ ID N°: 2;
- (xi) aminoácidos 1 a 305 da SEQ ID N°: 2;
- (xii) aminoácidos 1 a 329 da SEQ ID N°: 2;
- (xiii) aminoácidos 1 a 353 da SEQ ID N°: 2;
- (xiv) aminoácidos 1 a 416 da SEQ ID N°: 2;
- (xv) aminoácidos 1 a 424 da SEQ ID N°: 2;
- (xvi) aminoácidos 1 a 493 da SEQ ID N°: 2;

(xvii) aminoácidos 1 a 551 da SEQ ID N°: 2;

(xviii) aminoácidos 1 a 531 da SEQ ID N°: 2;

(ixx) aminoácidos 1 a 532 da SEQ ID N°: 2.

9. Método de qualquer uma das reivindicações 1 ou 3 a 6, ou o antagonista para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 6, em que o referido polipéptido Sp35 solúvel compreende um fragmento de polipéptido seleccionado do grupo consistindo de:

(i) aminoácidos 34 a 89 da SEQ ID N°: 2;

(ii) aminoácidos 34 a 113 da SEQ ID N°: 2;

(iii) aminoácidos 34 a 137 da SEQ ID N°: 2;

(iv) aminoácidos 34 a 161 da SEQ ID N°: 2;

(v) aminoácidos 34 a 185 da SEQ ID N°: 2;

(vi) aminoácidos 34 a 209 da SEQ ID N°: 2;

(vii) aminoácidos 34 a 233 da SEQ ID N°: 2;

(viii) aminoácidos 34 a 257 da SEQ ID N°: 2;

(ix) aminoácidos 34 a 281 da SEQ ID N°: 2;

(x) aminoácidos 34 a 305 da SEQ ID N°: 2;

(xi) aminoácidos 34 a 329 da SEQ ID N°: 2;

- (xii) aminoácidos 34 a 353 da SEQ ID N°: 2;
- (xiii) aminoácidos 34 a 416 da SEQ ID N°: 2;
- (xiv) aminoácidos 34 a 424 da SEQ ID N°: 2;
- (xv) aminoácidos 34 a 493 da SEQ ID N°: 2; e
- (xvi) aminoácidos 34 a 551 da SEQ ID N°: 2.

10. Método de qualquer uma das reivindicações 1 ou 3 a 6, ou o antagonista para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 6, em que o referido polipéptido Sp35 solúvel compreende um fragmento de polipéptido seleccionado do grupo consistindo de:

- (i) aminoácidos 34 a 530 da SEQ ID N°: 2;
- (ii) aminoácidos 34 a 531 da SEQ ID N°: 2;
- (iii) aminoácidos 34 a 532 da SEQ ID N°: 2;
- (iv) aminoácidos 34 a 533 da SEQ ID N°: 2;
- (v) aminoácidos 34 a 534 da SEQ ID N°: 2;
- (vi) aminoácidos 34 a 535 da SEQ ID N°: 2;
- (vii) aminoácidos 34 a 536 da SEQ ID N°: 2;
- (viii) aminoácidos 34 a 537 da SEQ ID N°: 2;



- (ix) aminoácidos 34 a 538 da SEQ ID N°: 2;
- (x) aminoácidos 34 a 539 da SEQ ID N°: 2;
- (xi) aminoácidos 30 a 532 da SEQ ID N°: 2;
- (xii) aminoácidos 31 a 532 da SEQ ID N°: 2;
- (xiii) aminoácidos 32 a 532 da SEQ ID N°: 2;
- (xiv) aminoácidos 33 a 532 da SEQ ID N°: 2;
- (xv) aminoácidos 34 a 532 da SEQ ID N°: 2;
- (xvi) aminoácidos 35 a 532 da SEQ ID N°: 2;
- (xvii) aminoácidos 36 a 532 da SEQ ID N°: 2;
- (xviii) aminoácidos 30 a 531 da SEQ ID N°: 2;
- (xix) aminoácidos 31 a 531 da SEQ ID N°: 2;
- (xx) aminoácidos 32 a 531 da SEQ ID N°: 2;
- (xxi) aminoácidos 33 a 531 da SEQ ID N°: 2;
- (xxii) aminoácidos 34 a 531 da SEQ ID N°: 2;
- (xxiii) aminoácidos 35 a 531 da SEQ ID N°: 2; e
- (xxiv) aminoácidos 36 a 531 da SEQ ID N°: 2.

11. Método da reivindicação 10 ou o antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 10, em que o referido polipéptido Sp35 solúvel compreende resíduos de aminoácidos 34-532 da SEQ ID N°: 2.
12. Método de qualquer uma das reivindicações 3 a 11 ou o antagonista para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 11, em que o referido polipéptido Sp35 solúvel compreende ainda um polipéptido heterólogo.
13. Método da reivindicação 12 ou o antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 12, em que o referido polipéptido heterólogo é fundido ao referido polipéptido Sp35 solúvel.
14. Método da reivindicação 13 ou o antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 13, em que o referido polipéptido heterólogo é seleccionado do grupo consistindo de um polipéptido Ig de anticorpo, um polipéptido de albumina sérica, um polipéptido de direccionamento, um polipéptido repórter e um polipéptido que facilita a purificação.
15. Método da reivindicação 14 ou o antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 14, em que o referido polipéptido heterólogo é seleccionado do grupo consistindo de uma charneira e Fc de imunoglobulina, albumina sérica humana e um marcador de histidina.
16. Método de qualquer uma das reivindicações 3 a 15 ou o antagonista para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 15, em que o referido polipéptido Sp35 solúvel é conjugado a um polímero.

17. Método da reivindicação 16 ou o antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 16, em que o polímero é seleccionado do grupo consistindo de um polialquilenoglicol, um polímero de açúcar e um polipéptido.
18. Método da reivindicação 17 ou o antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 17, em que o polímero é um polialquilenoglicol.
19. Método da reivindicação 18 ou o antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 18, em que o polialquilenoglicol é polietilenoglicol (PEG).
20. Método de qualquer uma das reivindicações 16 a 19 ou o antagonista para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 19, em que o referido polipéptido Sp35 solúvel é conjugado a 1, 2, 3 ou 4 polímeros.
21. Método da reivindicação 20 ou o antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 20, em que o peso molecular total dos polímeros é desde 5000 Da a 100000 Da.
22. Método da reivindicação 1, ou o antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o referido antagonista de Sp35 compreende um anticorpo de Sp35 ou um seu fragmento de ligação a antigénio.
23. Método da reivindicação 1, ou o antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o referido antagonista de Sp35 compreende um polinucleótido antagonista de Sp35 seleccionado do grupo consistindo de: (a) um polinucleótido anti-sentido; (b) uma ribozima; (c) um ARN de

interferência pequeno (siARN); e (d) um ARN gancho-de-cabelo pequeno (shARN).

24. Método da reivindicação 23 ou o antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 23, em que o referido polinucleótido antagonista de Sp35 é um shARN.
25. Método da reivindicação 24 ou o antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 24, em que o referido shARN compreende a sequência de nucleótidos: TGATCGTCAT  
CCTGCTAGAC TTCAAGAGAG TCTAGCAGGA TGACGATCTT TTTTC  
(SEQ ID N°: 40).
26. Antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que a referida esclerose múltipla é esclerose múltipla (EM) recorrente-remitente.
27. Antagonista para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 26, em que o referido antagonista de Sp35 é para ser administrado por injeção de bólus ou infusão crónica.
28. Antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 27, em que o referido antagonista de Sp35 é para ser administrado directamente no sistema nervoso central.
29. Antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 28, em que o referido antagonista de Sp35 é para ser administrado directamente numa lesão crónica de EM.
30. Método da reivindicação 1, em que o método compreende: (a) transfectar os referidos oligodendrócitos com um polinucleótido que codifica o referido antagonista de Sp35 através de ligação operável a uma sequência de controlo de

expressão; e (b) permitir a expressão do referido antagonista de Sp35.

31. Antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o antagonista é codificado por um polinucleótido ligado operativamente a uma sequência de controlo de expressão.
32. Antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 31, em que o referido polinucleótido é um vector de expressão.
33. Antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 32, em que o referido vector de expressão é um vector viral.
34. Antagonista para utilização de acordo com as reivindicações 32 ou 33, em que o referido vector de expressão está numa célula hospedeira.
35. Antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 34, em que a referida célula hospedeira é para ser introduzida no local da esclerose múltipla ou perto do mesmo.
36. Antagonista para utilização de acordo com as reivindicações 34 ou 35, em que a referida célula hospedeira é produzida por um método compreendendo: (a) transformar ou transfectar uma célula hospedeira recipiente com o polinucleótido referido na reivindicação 30 ou com o vector da reivindicação 32 ou 33, e (b) cultivar a referida célula hospedeira transformada ou transfectada.

37. Antagonista para utilização de acordo com as reivindicações 34 a 36, em que a referida célula hospedeira é derivada de um mamífero a ser tratado.
38. Antagonista para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 37, em que o referido antagonista de Sp35 está numa quantidade suficiente para reduzir a inibição da diferenciação ou sobrevivência de oligodendrócitos no local da esclerose múltipla ou perto do mesmo.
39. Antagonista para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 38, em que o referido antagonista de Sp35 está numa quantidade suficiente para reduzir a inibição da mielinização mediada por oligodendrócitos no local da esclerose múltipla ou perto do mesmo.
40. Antagonista para utilização de acordo com a reivindicação 33, em que o vector viral é seleccionado do grupo consistindo de um vector adenoviral, um vector de lentivírus, um vector de baculovírus, um vector de papovavírus, um vector do vírus herpes simplex e um vector do vírus de Epstein Barr.
41. Antagonista para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 32, 33 ou 40, em que o referido vector é para ser administrado por uma via seleccionada do grupo consistindo de administração tópica, administração parentérica, administração intratecal e administração subcutânea.

Lisboa, 19 de Novembro de 2012

FIG. 1a

GGAGAGACATGCGATTGGTGACCGAGCCGAGCGGACCGAAGGCGCGCCCGA  
GATGCAGGTGAGCAAGAGGATGCTGGCGGGGGGCGTGAGGAGCATGCCAG  
CCCCCTCCTGGCCTGCTGGCAGCCCATCCTCCTGCTGGTGCTGGGCTCAGTGC  
TGTCAGGCTCGGCCACGGGCTGCCCCCGCTGCGAGTGCTCCGCCAGGA  
CCGCGCTGTGCTGTGCCACCGCAAGCGCTTTGTGGCAGTCCCCGAGGGC  
CCCACCGAGACGCGCCTGCTGGACCTAGGCAAGAACCGCATCAAAACGCTCA  
ACCAGGACGAGTTCGCCAGCTTCCCGCACCTGGAGGAGCTGGAGCTCAACGA  
GAACATCGTGAGCGCCGTGGAGCCCCGGCGCCTTCAACAACCTCTTCAACCTC  
CGGACGCTGGGTCTCCGCAGCAACCGCCTGAAGCTCATCCCGCTAGGCGTCT  
TCACTGGCCTCAGCAACCTGACCAAGCTGGACATCAGCGAGAACAAGATTGT  
TATCTACTGGACTACATGTTTCAGGACCTGTACAACCTCAAGTCACTGGAGG  
TTGGCGACAATGACCTCGTCTACATCTCTCACCGCGCCTTCAGCGGCCTCAAC  
AGCCTGGAGCAGCTGACGCTGGAGAAATGCAACCTGACCTCCATCCCCACCG  
AGGCGCTGTCCACCTGCACGGCCTCATCGTCCTGAGGCTCCGGCACCTCAA  
CATCAATGCCATCCGGGACTACTCCTTCAAGAGGCTCTACCGACTCAAGGTCT  
TGGAGATCTCCCACTGGCCCTACTTGGACACCATGACACCCA  
ACTGCCTCTACGGCCTCAACCTGACGTCCCTGTCCATCACACACTGCAATCTGACCGCTGTGCC  
CTACCTGGCGCTCCGCCACCTAGTCTATCTCCGCTTCTCAACCTCTCTACA  
ACCCCATCAGCACCATGAGGGCTCCATGTTGCATGAGCTGCTCCGGCTGCA  
GGAGATCCAGCTGGTGGGCGGGCAGCTGGCCGTGGTGGAGCCCTATGCCTTC  
CGCGGCCTCAACTACCTGCGCGTGTCAATGTCTCTGGCAACCAGCTGACCA  
CACTGGAGGAATCAGTCTTCCACTCGGTGGCAACCTGGAGACACTCATCT  
GGACTCCAACCCGCTGGCCTGCGACTGTGCGGCTCCTGTGGGTGTTCCGGCGCC  
GCTGGCGGCTCAACTCAACCGGCAGCAGCCACGTGCGCCACGCCCCGAGTT  
TGTCCAGGGCAAGGAGTTCAAGGACTTCCCTGATGTGCTACTGCCCAACTACT  
TCACCTGCCGCCGCGCCCGCATCCGGGACCGCAAGGCCAGCAGGTGTTTGT  
GGACGAGGGCCACACGGTGCAGTTTGTGTGCGGGCCGATGGCGACCCCGCCG  
CCCCCATCCTCTGGCTCTCACCCCGAAAGCACCTGGTCTCAGCCAAGAGCA  
ATGGGCGGCTCACAGTCTTCCCTGATGGCACGCTGGAGGTGCGCTACGCCCA  
GGTACAGGACAACGGCACGTACCTGTGCATCGCGGCCAACGCGGGCGGCAA  
CGACTCCATGCCCGCCACCTGCATGTGCGCAGTACTCGCCGACTGGCCCC  
ATCAGCCCAACAAGACCTTCGCTTTCATCTCCAACCAGCCGGGCGAGGGAGA  
GGCCAACAGCACCCGCGCCACTGTGCCTTTCCTTCGACATCAAGACCCTCA  
TCATCGCCACCACCATGGGCTTCATCTCTTCCCTGGGCGTCGTCTTCTGCC  
TGGTGCTGCTGTTTCTCTGGAGCCGGGGCAAGGGCAACACAAAGCACAAAT  
CGAGATCGAGTATGTGCCCCGAAAGTCGGACGCAGGCATCAGCTCCGCCGAC  
GCGCCCCGCAAGTCAACATGAAGATGATATGAGGCCGGGGCGGGGGGCGAG  
GGACCCCCGGGCGGCGGGCAGGGGAAGGGGCCTGGCCGCCACCTGCTCACT  
CTCCAGTCTTCCACCTCCTCCCTACCTTCTACACAGTCTCTTCTCCTCCT  
CCCCCTCCGTCCCTGCTGCCCCCGCCAGCCCTACCAACCTGCCCTCCTTC  
TACCAGGACCTCAGAAGCCCAGACCTGGGGACCCACCTACACAGGGGCATT  
GACAGACTGGAGTTGAAAGCCGACGAACCGACACGCGGCAGAGTCAATAAT  
TCAATAAAAAAGTTACGAACCTTCTCTGTAACCTGGGTTTCAATAATTATGGA  
TTTTTATGAAAACCTTGAATAATAAAAAAGAGAAAAAACTATTTCCPATAGC  
TAGTCGGAATGCAAACCTTTGACGTCCTGATTGCTCCAGGGCCCTCTTCCAAC  
TCAGTTTCTTGTTTTCTCTTCNTCCTNCTCCTCTTCTTCTCCTTCTCTCT  
TCCCCAGTGGGGAGGGATCACTCAGGAAAACAGGAAAGGAGGTTCCAGCC  
CCACCCACCTGCCACCCCGCCCCAGGCACCATCAGGAGCAGGCTAGGGGGC  
AGGCCTGGGCCAGCTCCGGGCTGGCTTTTTGCAGGGCGCAGGTGGAGGGGAC

AGGTCTGCCGATGGGGGTGGGAGCCTGTCTGCTGGGCTGCCAGGCGGCACC  
ACTGCAAGGGGTGGGAGCCTGGCTCGGGTGTGGCTGAGACTCTGGACAGAGG  
CTGGGGTCCCTCCTGGGGGACAGCACAGTCAGTGGAGAGAGCCAGGGGCTGG  
AGGTGGGGCCCACCCAGCCTCTGGTCCCAGCTCTGCTGCTCACTTGCTGTGT  
GGCCCTCAAGCAGGTCCACTGGCCTCTCTGGGCCTCAGTCTCCACATCTGTAC  
AAATGGGAACATTACCCCTGCCCTGCCTACCTNANAGGGCTGTTNTGAGGN  
ATNGATGAGATGATGTATGT

**FIG. 1b**



**FIG. 2**

MLAGGVRSMPSPLLACWQPILLVLGSLV  
SGSATGCPPRCECSAQDRAVLCHRKRFA  
VPEGIPTETRLLDLGKNRIKTLNQDEFASF  
PHLEELNENIVSAVEPGAFFNNLNLRTL  
GLRSNRLKLIPLGVFTGLSNLTKLDISENKI  
VILLDYMFQDLYNLKSLEVGDNDLVYISHR  
AFSGLNSLEQLTLEKCNLTSIPTEALSHLH  
GLIVLRLRHLNINAIRDYSFKRLYRLKVLEI  
SHWPYLDTMTPNCLYGLNLTSLSITHCNLT  
AVPYLAVRHLVYLRFLNLSYNPISTIEGSM  
LHELLRLQEIQLVGGQLAVVEPYAFRGLNY  
LRVLNVSGNQLTTLEESVFHSGNLETLIL  
DSNPLACDCRLLWVFRRRWRLNFRNRQQPT  
CATPEFVQGKEFKDFPDVLLPNYFTCRRA  
RIRDRKAQQVFVDÉGHTVQFVCRADGDPP  
PAILWLSPRKHLVSAKSNGRLTVFPDGTLE  
VRYAQVQDNGTYLCIAANAGGND SMPAHL  
HVRSYSPDWPHQPNTFAFISNQPGEGEA  
NSTRATVPFPFDIKTLIIATTMGFISFLGVV  
LFCLVLLFLWSRGKGNTKHNIEIEYVPRKS  
DAGISSADAPRKFNMKMI

FIG. 3

ATGCTGGCAGGGGGTATGAGAAGCATGCCAGCCCCCTCCTGGCCTGCTGGCA  
GCCCATCCTCCTGCTGGTACTGGGCTCAGTGCTGTCAGGCTCTGCTACAGGCTG  
CCCGCCCCGCTGCGAGTGCTCAGCGCAGGACCGAGCCGTGCTCTGCCACCGCA  
AACGCTTTGTGGCGGTGCCCGAGGGCATCCCCACCGAGACTCGCCTGCTGGAC  
CTGGGCAAAAACCGCATCAAGACACTCAACCAGGACGAGTTTGCCAGCTTCCC  
ACACCTGGAGGAGCTAGAACTCAATGAAAACATCGTGAGCGCCGTGGAGCCA  
GGCGCCTTCAACAACCTCTTCAACCTGAGGACTCTGGGGCTGCGCAGCAACCG  
CCTGAAGCTTATCCCGCTGGGCGTCTTACCGGCCTCAGCAACTTGACCAAGCT  
GGACATCAGTGAGAACAAGATCGTCATCCTGCTAGACTACATGTTCCAAGACC  
TATAAACCTCAAGTCGCTGGAGGTCGGCGACAACGACCTCGTCTACATCTCC  
CATCGAGCCTTCAGCGGCCTCAACAGCCTGGAACAGCTGACGCTGGAGAAATG  
CAATCTGACCTCCATCCCCACGGAGGCGCTCTCCCACCTGCACGGCCTCATCGT  
CCTGCGGCTACGACATCTCAACATCAATGCCATCAGGGACTACTCCTTCAAGA  
GGCTGTACCGACTTAAGGTCTTAGAGATCTCCCCTGACCCTACCTGGACACCA  
TGACCCCCAACTGCCTCTACGGCCTCAACCTGACATCCCTATCCATCACGCACT  
GCAACCTGACAGCCGTGCCCTATCTGGCAGTGCGTCACCTGGTCTATCTCCGTT  
TCCTAACCTTTCCTACAACCCAATCGGTACAATCGAGGGCTCCATGCTGCATG  
AGCTGCTGCGGTTGCAGGAGATCCAGCTGGTGGGCGGGCAGCTGGCCGTGGTG  
GAGCCCTATGCCTTTCGTGGGCTCAACTACCTGCGTGTGCTCAATGTCTCTGGC  
AACAGCTGACCACCCTGGAGGAGTCAGCCTTCCATTCGGTGGGCAACCTGGA  
GACGCTCATCCTGGACTCCAACCCACTGGCCTGTGACTGCCGGCTGCTGTGGGT  
GTTCCGGCGCCGCTGGCGGCTCAACTTCAACAGGCAGCAGCCCACCTGCGCCA  
CACCTGAGTTCGTCCAGGGCAAAGAGTTCAAGGACTTTCCGGATGTACTCCTA  
CCCAACTACTTCACCTGCCGCCGGGCCACATCCGGGACCGCAAGGCACAGCA  
GGTGTGTTGTAGATGAGGGCCACACGGTGCAGTTTGTATGCCGGGCAGATGGCG  
ACCCTCCACCAGCTATCCTTTGGCTCTCACCCCGCAAGCACTTGGTCTCGGCCA  
AGAGCAATGGGCGGCTCACAGTCTTCCCTGATGGCACGCTGGAGGTGCGCTAC  
GCCAGGTACAGGACAACGGCACGTACCTGTGCATCGCAGCCAATGCTGGCGG  
CAACGACTCCATGCCCGCCACTTGCATGTGCGCAGCTACTCGCCTGACTGGCC  
CCATCAACCCAACAAGACCTTCGCCTTCATCTCCAACCAGCCAGGCGAGGGAG  
AGGCCAACAGCACCCGCGCCACTGTGCCCTTCCCCTTCGACATCAAGACGCTC  
ATTATCGCCACCACCATGGGCTTCATCTCCTTCCCTGGGCGTTGTCTATTCTGCC  
TGGTGCTGCTGTTTCTATGGAGCCGGGGCAAAGGCAACACAAAGCACAAACATC  
GAAATTGAGTATGTGCCCCGGAAATCGGACGCAGGCATCAGCTCAGCTGATGC  
ACCCCGCAAGTTCAACATGAAGATGATATGA

FIG. 4

MLAGGMRSMPSPLLACWQPILLVL  
GSVLSGSATGCPPRCECSAQDRAVL  
CHRKRFAVPEGIPTETRLLDLGKN  
RIKTLNQDEFASFPHLEELLENENI  
VSAVEPGAFFNNLFLNLRTLGLRSNRL  
KLIPLGVFTGLSNLTKLDISENKIV  
ILLDYMFQDLYNLKSLEVGDNLDLVY  
ISHRAFSGLNSLEQLTLEKCNLTSI  
PTEALSHLHGLIVLRLRHLNINAIR  
DYSFKRLYRLKVLEISHWPYLDTMT  
PNCLYGLNLTSLSITHCNLTAVPYL  
AVRHLVYLRFLNLSYNPIGTIEGSM  
LHELLRLQEIQLVGGQLAVVEPYAF  
RGLNYLRVLNVSGNQLTTLLESAFH  
SVGNLETLILDSNPLACDCRLLWVF  
RRRWRLNFNRQQPTCATPEFVQGKE  
FKDFPDVLLPNYFTCRAHIRDRKA  
QQVFVDEGHTVQFVCRADGDPPPAI  
LWLSPRKHLVSAKSNGRLTVFPDGT  
LEVRYAQVQDNGTYLCIAANAGGND  
SMPAHLHVRSYSPDWP HQPNKTFAF  
ISNQPGEGEANSTRATVPFPFDIKT  
LIIATTMGFISFLGVVLFCLVLLFL  
WSRGKGNTKHNIEIEYVPRKSDAGI  
SSADAPRKFNMKMI

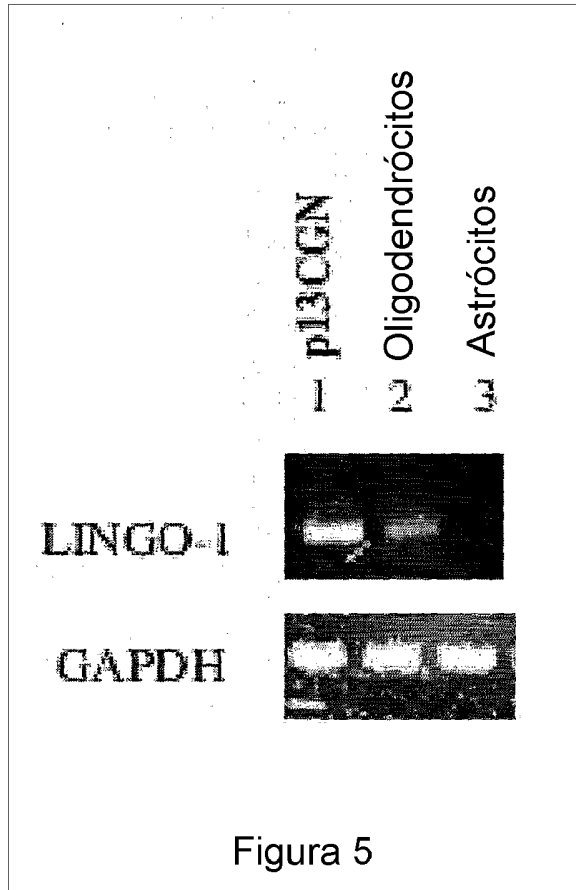


Figura 5

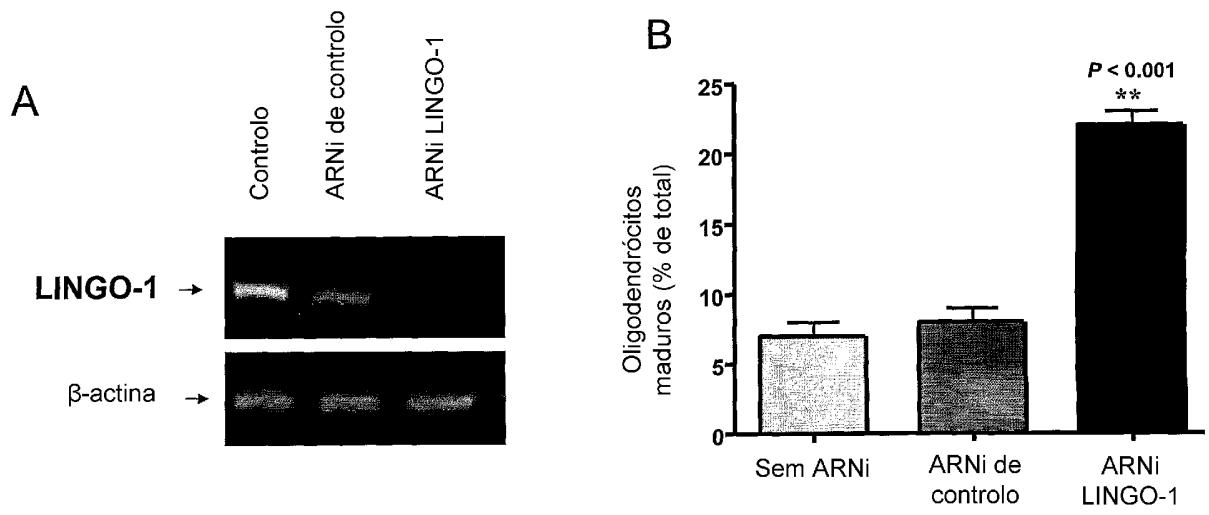


Figura 6

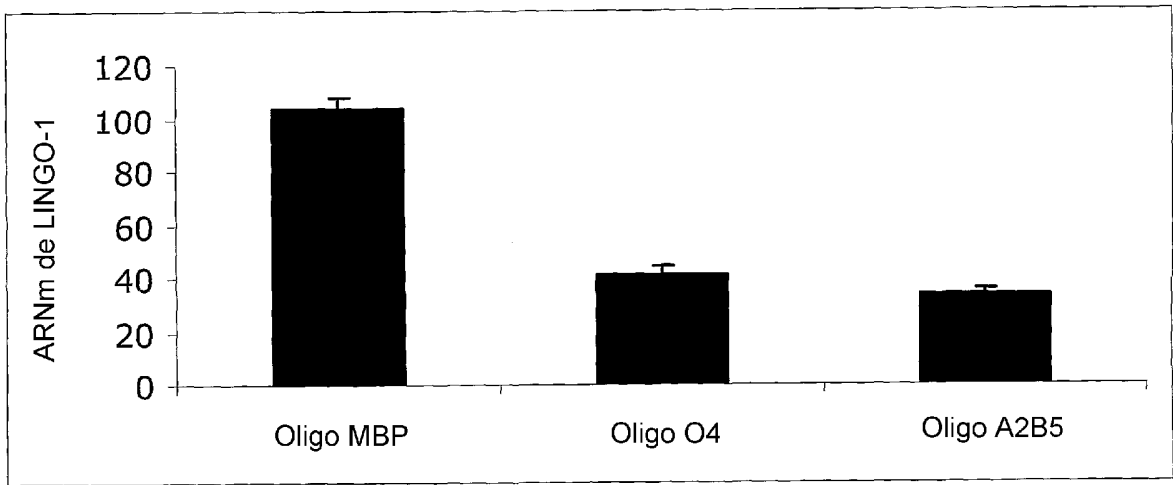


Figura 7

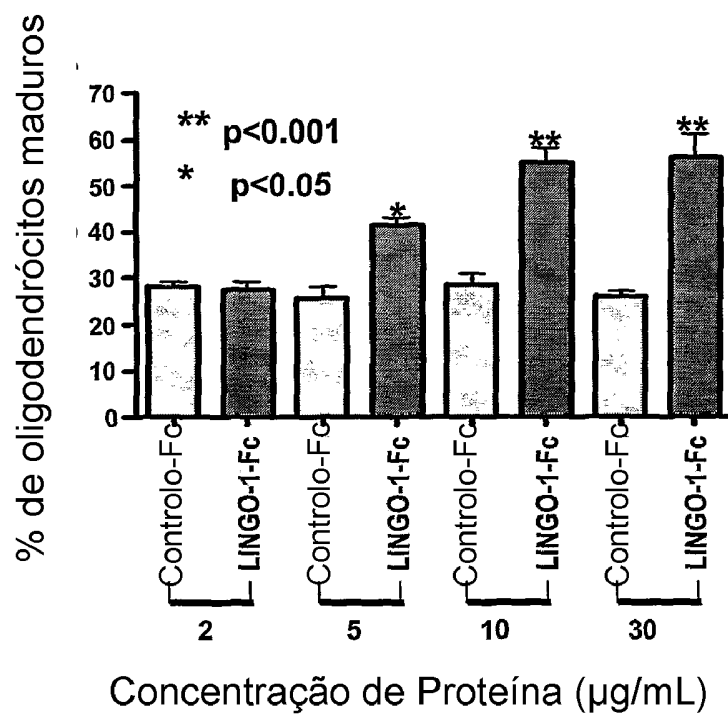


Figura 8

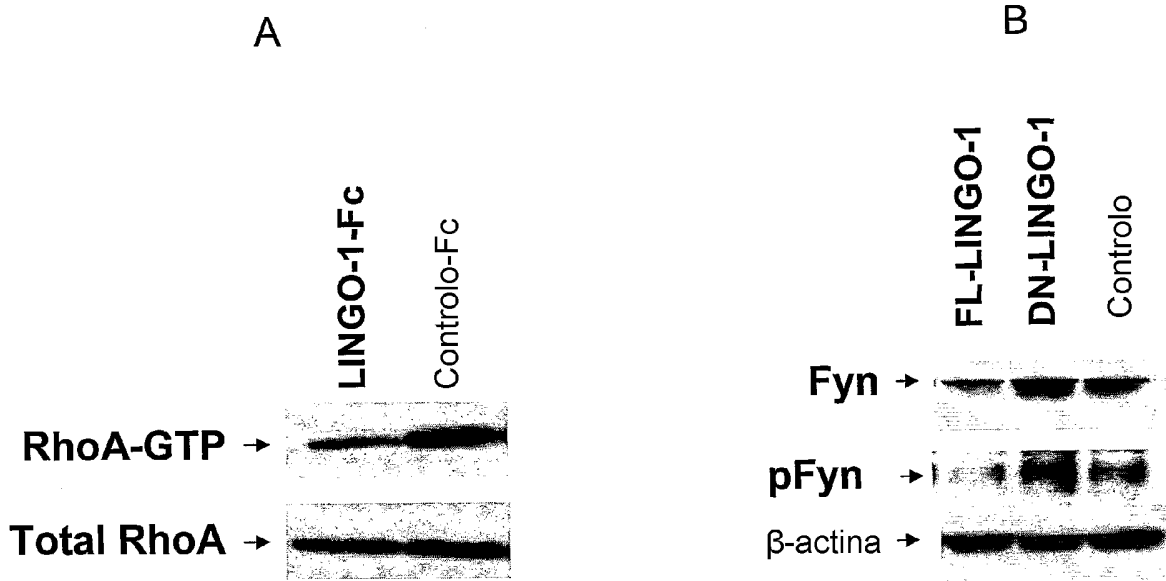


Figura 9



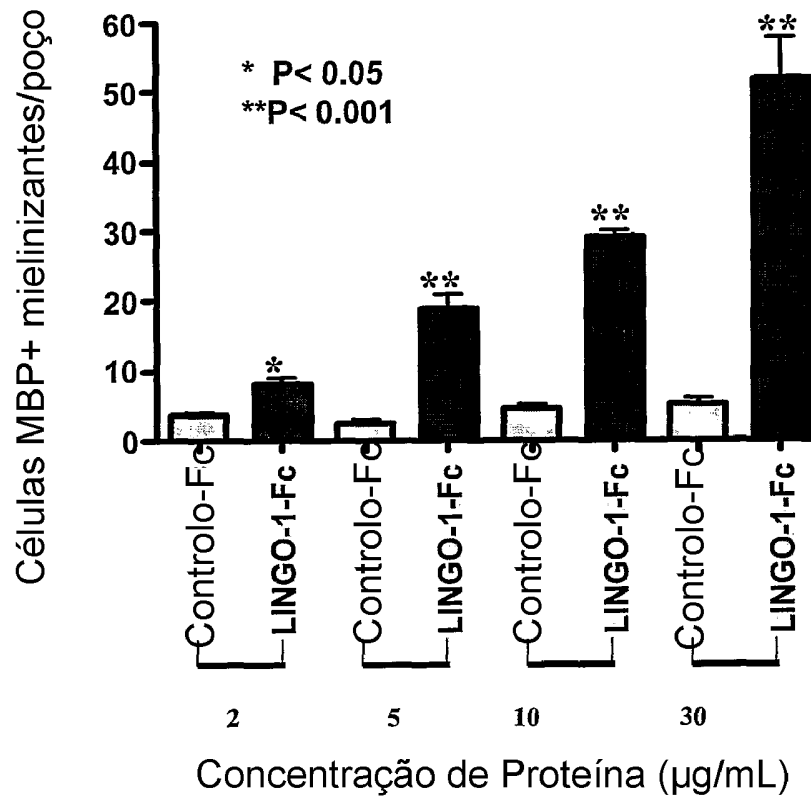


Figura 10A

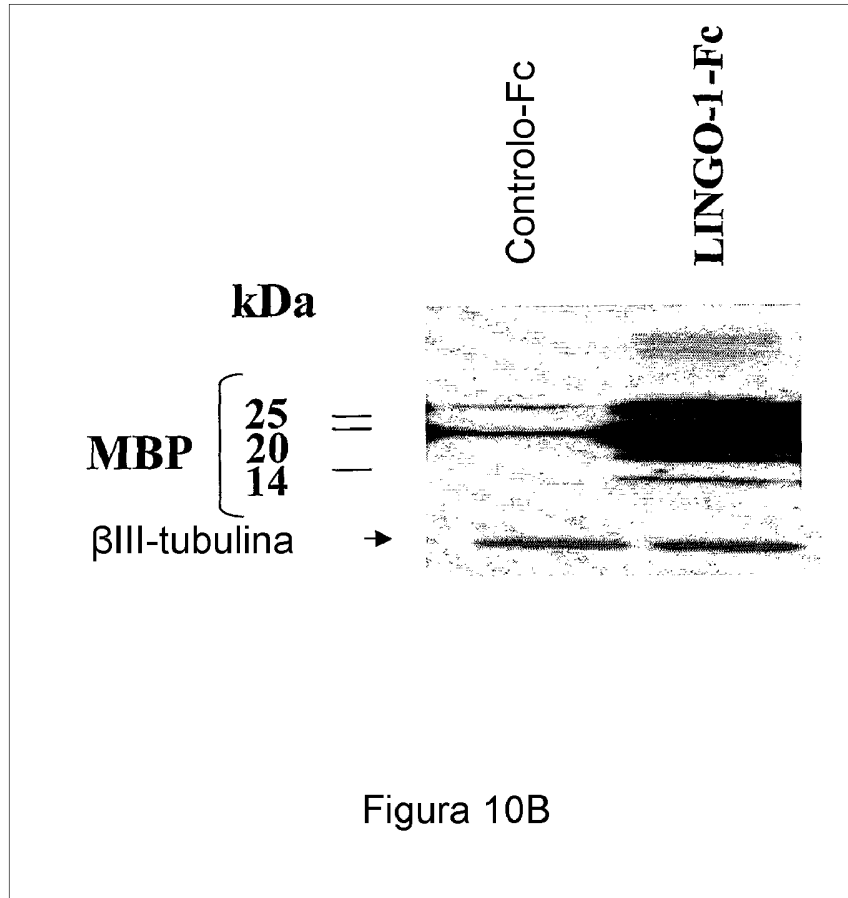
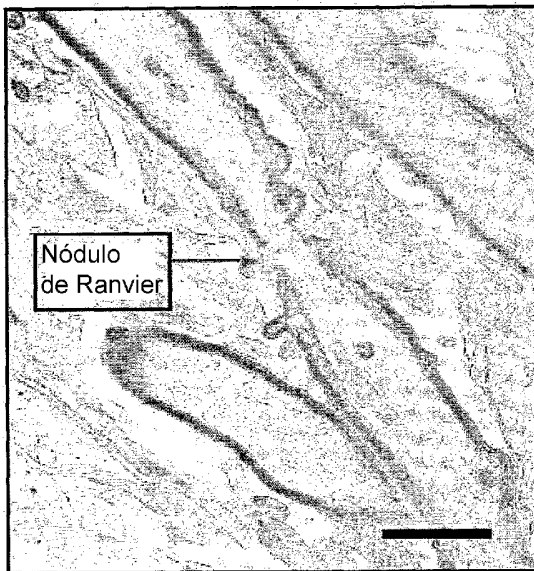


Figura 10B

LINGO-1 solúvel promove axónios mielinizantes oligodendrocíticos

**C: LINGO-1-Fc**



**D: Controlo-Fc**

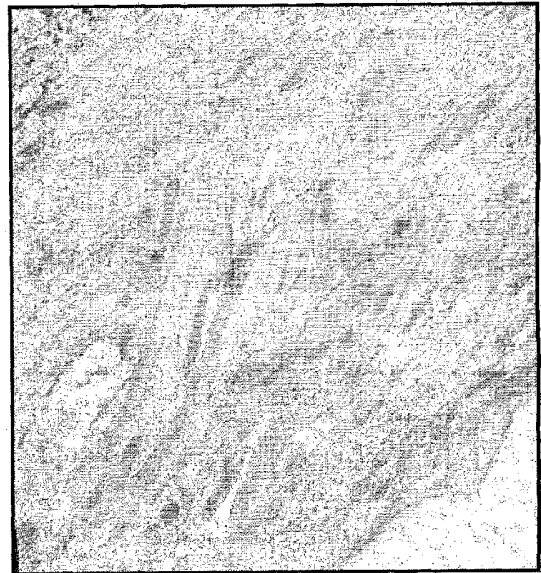


Figura 10C e 10D

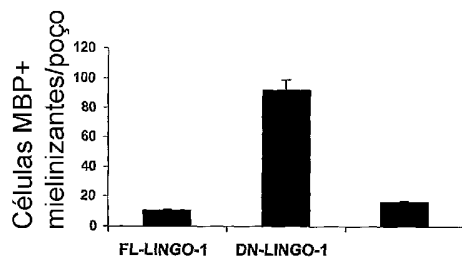


Figura 10E

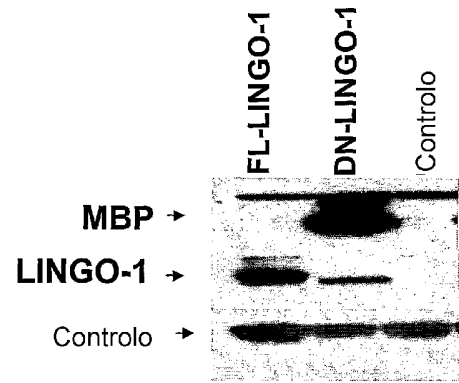
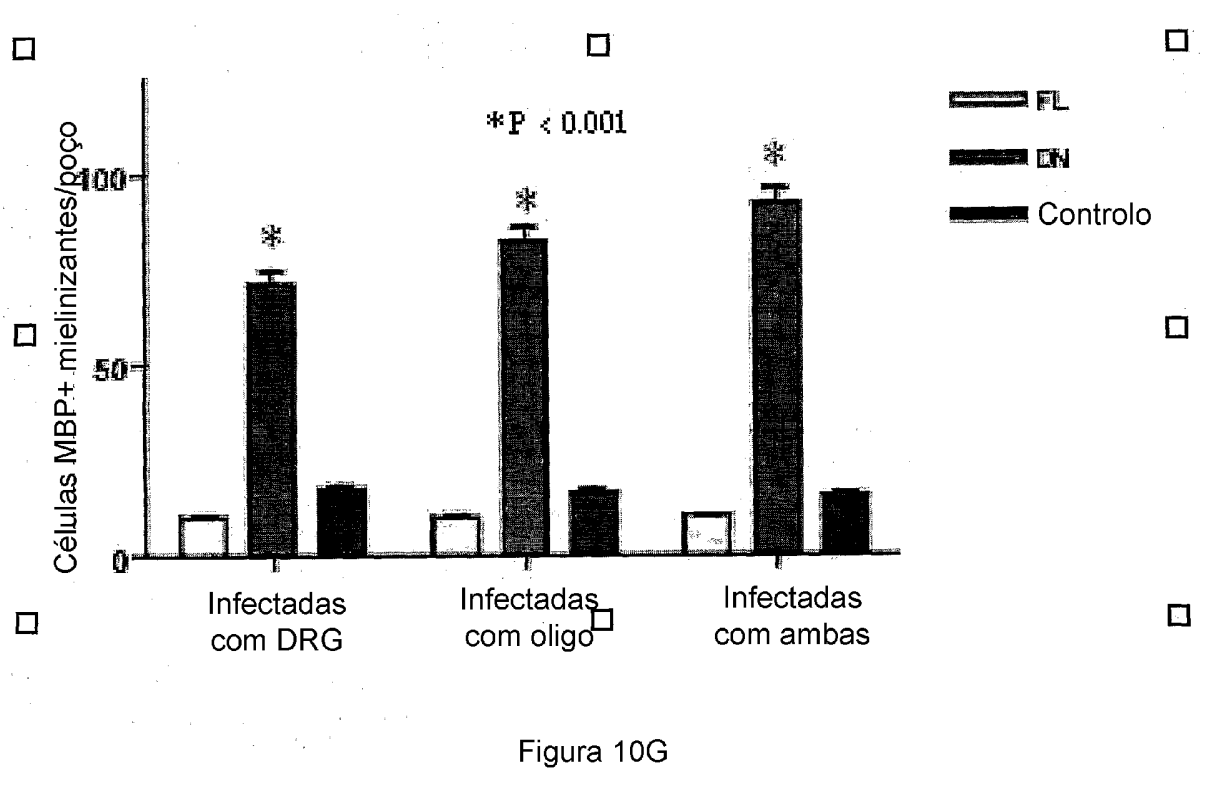


Figura 10F



Murganhos silenciados por LINGO-1 apresentam hipermielinização da espinha dorsal

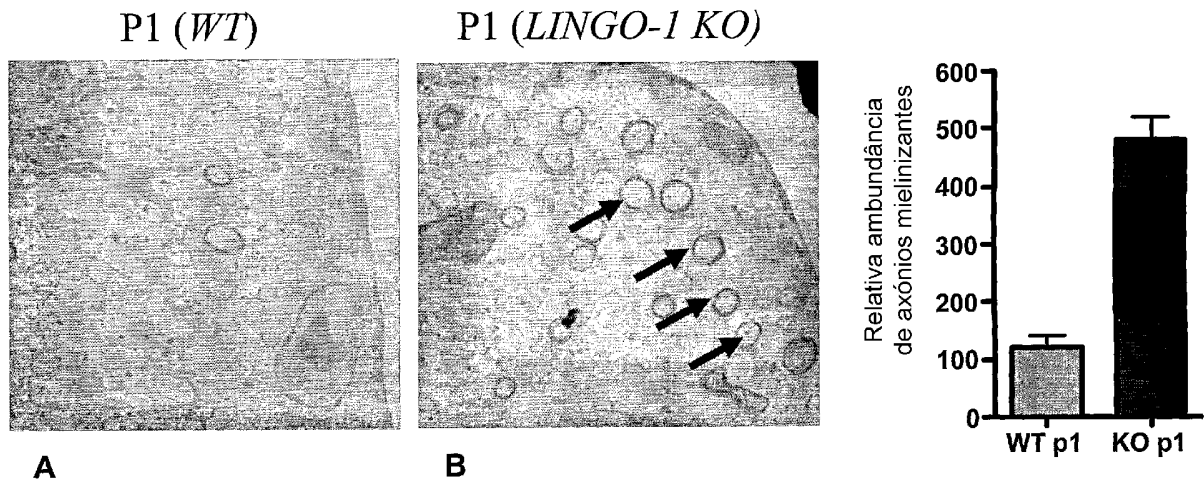


Figura 11

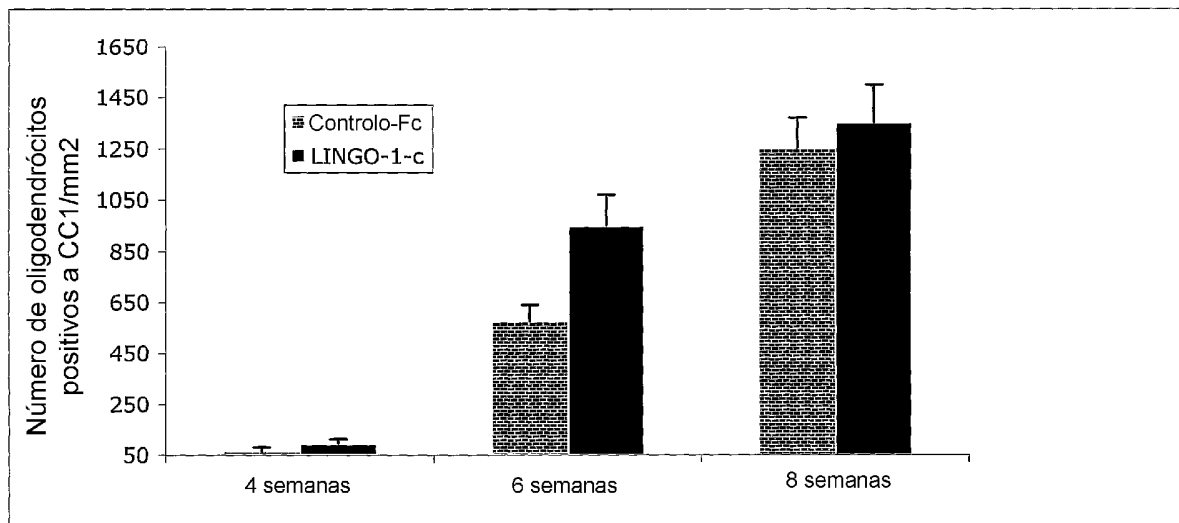


Figura 12

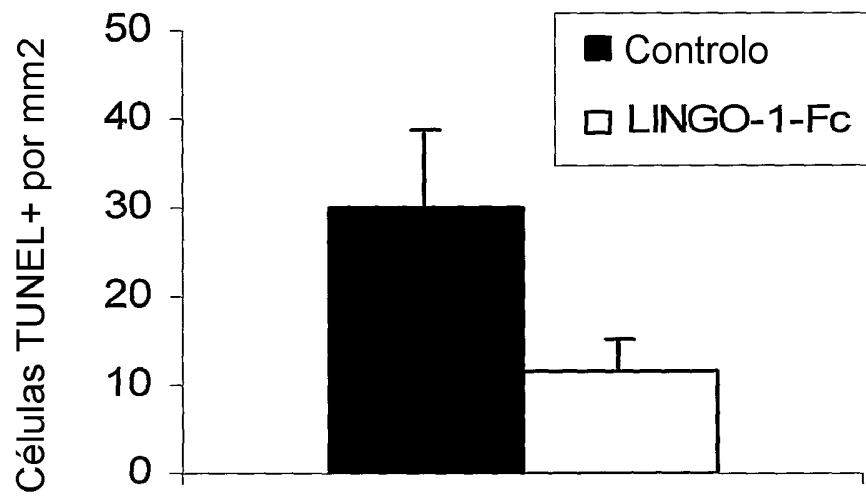
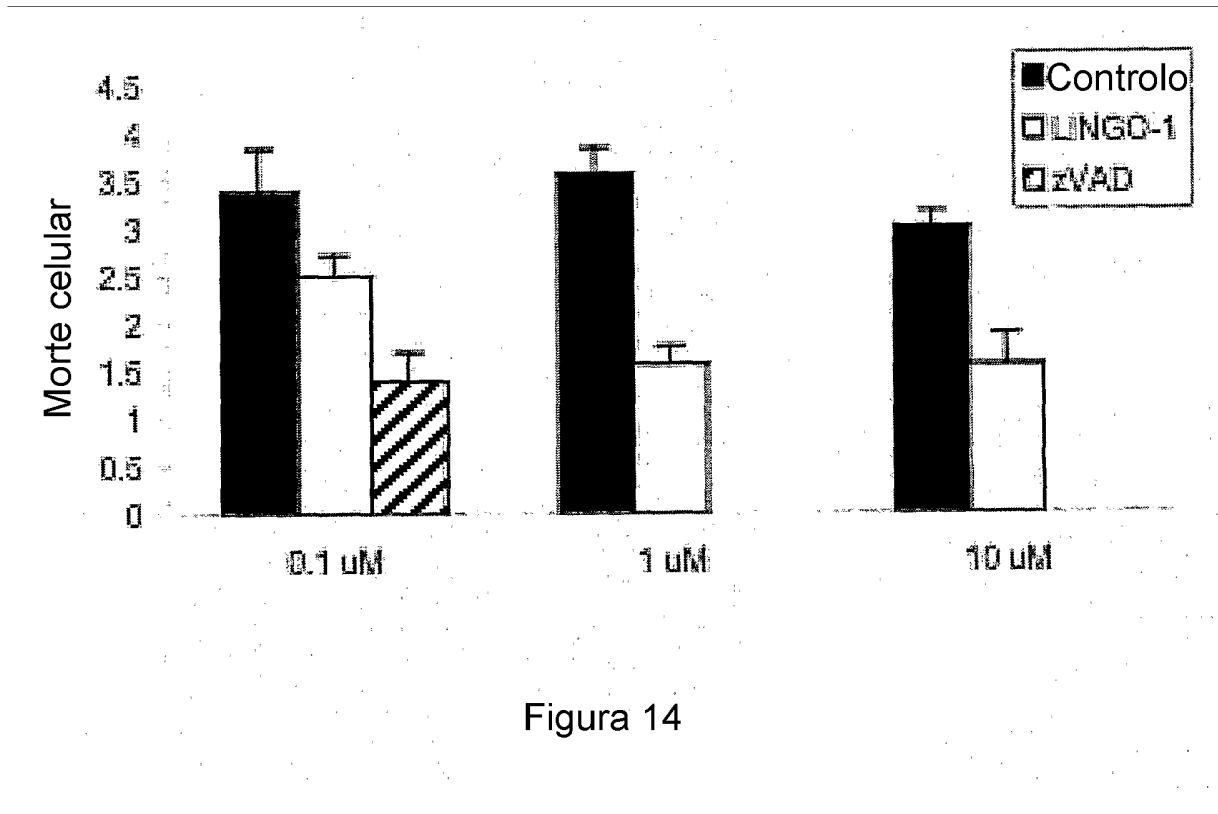


Figura 13





Domínio Ig de LINGO-1 promove mielinização em co-cultura

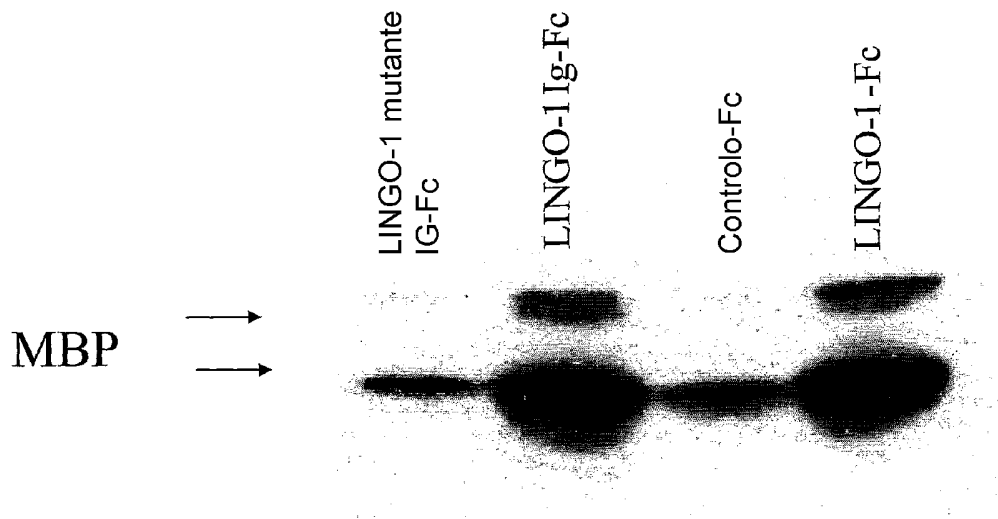


Figura 15

Péptido RKH de LINGO-1 promove mielinização em co-cultura

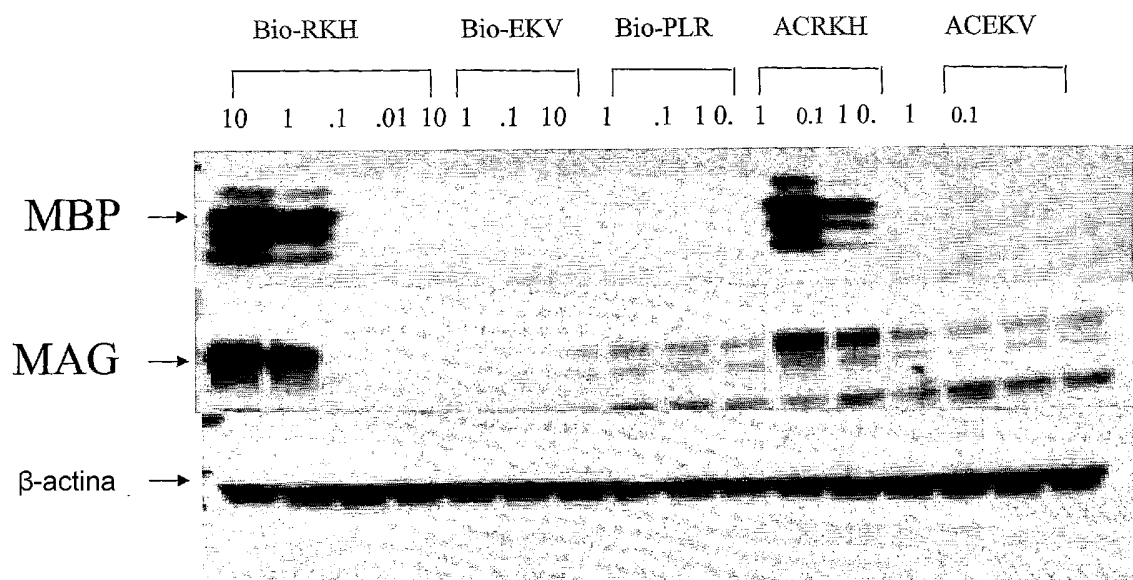


Figura 16