

REPÚBLICA DE COLOMBIA

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

INVENTARIO

PATENTE DE INVENCION

EXPEDIENTE No

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-161740-00000-0000

Fecha: 2010-12-23 16:13:55

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 379 FASENACIONALII

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 59

Contiene los documentos relativos a la solicitud de registro de:

10-161740

Título:

**ANTICUERPOS DE INTERLEUCINA-1 ALFA Y
MÉTODOS DE USO.**

Solicitantes : **XBIOTECH, INC.**

De

VANCOUVER, BC, CANADA.

Apoderado: **MAURICIO JARAMILLO**

Bogotá, D.C., Diciembre de 2010

Annexo
30-12-2010

PETI

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-161740- -00000-0000

Fecha: 2010-12-23 16:13:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 59

FORMULARIO UNICO DE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1		SOLICITUD DE :		
☒ Patente de Invención.		☐ Patente de Modelo de Utilidad		
☐ Capitulo I		☒ Capitulo II		
2 SOLICITANTE (71)	Nombre:	XBIOTECH, INC.		
	Dirección:	1055 West Hastings Street, Suite 300 Vancouver, BC V6E 2E9 Canadá		
	Teléfono:		Fax:	
	E-Mail:			
	Domicilio:	Vancouver, BC, Canadá		
	IDENTIFICACION			
C.C.		☐	NIT ☐	
C.E.		☐	Otro ☐	
Número				
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre:	MAURICIO JARAMILLO CAMPUZANO		
	Dirección:	Calle 67 No. 7 – 35 Oficina 1204 Bogotá D.C., Colombia		
	Teléfono:	3192900	Fax: 3210295	
	E-Mail:	mjaramillo@gpzlegal.com		
	IDENTIFICACIÓN			
	C.C.		☒	NIT ☐
C.E.		☐	Otro ☐	
Número		80.421.942	TP 74.555	
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre:	John Simard		
	Dirección:	8201 East Riverside Drive, Bldg. # 4, Suite 100 Austin, TX 78744 Estados Unidos		
	Domicilio:	Austin, Texas, Estados Unidos		
	C.C.		☐	NIT. ☐
5 PCT (86) Solicitud internacional No.: PCT/US2009/003355 Fecha: 01/06/2009 Publicación Internacional No.: WO/2009/148575 Fecha: 10/12/2009				
6 TITULO (54) ANTICUERPOS DE INTERLEUCINA-1 ALFA Y MÉTODOS DE USO				
7 Clasificación Internacional (51) A61K 39/395 (2006.01), C07K 16/00 (2006.01), C12N 5/16 (2006.01)				
8 SI ☒ NO ☐	Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
		Estados Unidos	30/05/2008	61/057,586
		Estados Unidos	14/05/2009	61/178,350
		Estados Unidos	10/12/2008	61/121,391
9 Comprobante de pago No. _____ Fecha: _____				

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional

11 FIGURA CARACTERÍSTICA

12 Solicito la concesión de la patente

Nombre: MAURICIO JARAMILLO CAMPUZANO

Firma:

C.C. 80.421.942 de Usaquén T.P. 74.555 C.S.Jra.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

Xbiotech
2950

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 102,398
FECHA : DICIEMBRE 1 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-161740-00000-0000

Fecha: 2010-12-23 16:13:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 59

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
GOMEZ PINZON ASEMARCAS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	1177068953	01/12/2010	24,729,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
	TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

X biotech
2950

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 102,390
FECHA : DICIEMBRE 1 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-161740-00000-0000

Fecha: 2010-12-23 16:13:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 59

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
GOMEZ PINZON ASEMARCAS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	1177068953	01/12/2010	24,729,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	312,000.00
		TOTAL :	\$ 312,000.00

SON: TRESCIENTOS DOCE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN ☐ Patente de Invención ☐ Patente modelo de utilidad ☒ PCT	
(21) No. de solicitud:	(51) int. Cl: A61K 39/395 (2006.01), C07K 16/00 (2006.01), C12N 5/16 (2006.01)	
(22) Fecha de solicitud: 23/12/2010	(71) Solicitante(s): XBIOTECH, INC.	
(30) Prioridad: (31) No. Prioridad: 61/057,586 61/178,350 61/121,391 (32) Fecha: 30/05/2008 14/05/2009 10/12/2008 (33) Pais: Estados Unidos	(72) Inventor(es): John Simard (74) Apoderado(s): MAURICIO JARAMILLO C.	
(54) Título: ANTICUERPOS DE INTERLEUCINA-1 ALFA Y MÉTODOS DE USO		
Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT		
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional: 01/01/2011 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha: 01/06/2009 No. de solicitud PCT: PCT/US2009/003355	(87) Publicación internacional Fecha: 10/12/2009 No. Publicación: WO/2009/148575	
Resumen reivindicación (es): Los Abs monoclonales completamente humanos incluyen (i) una región variable de enlace a antígeno que exhibe muy alta afinidad de enlace para IL-1α, y (ii) una región constante que es efectiva tanto para activar el sistema del complemento a través del enlace C1q como para enlazarse a varios diferentes receptores Fc.		

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 December 2009 (10.12.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/148575 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2009/003355

(22) International Filing Date:

1 June 2009 (01.06.2009)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/057,586	30 May 2008 (30.05.2008)	US
61/121,391	10 December 2008 (10.12.2008)	US
61/178,350	14 May 2009 (14.05.2009)	US

(71) Applicant (for all designated States except US):
XBIOTECH, INC. [CA/CA]; 1055 West Hastings Street,
Suite 300, Vancouver, BC, V6E 2E9 (CA).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): SIMARD, John [CA/
US]; 8201 East Riverside Drive, Bldg. # 4, Suite 100,
Austin, TX 78744 (US).

(74) Agent: KIM, Stanley, A.; 12230 Forest Hill Blvd., Suite
120, Wellington, FL 33414 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))



WO 2009/148575 A1

(54) Title: INTERLEUKIN-1 ALPHA ABS AND METHODS OF USE

(57) Abstract: Fully human monoclonal Abs includes (i) an antigen-binding variable region that exhibits very high binding affinity for IL-1 α and (ii) a constant region that is effective at both activating the complement system through C1q binding and binding to several different Fc receptors.

ANTICUERPOS DE INTERLEUCINA-1 ALFA Y MÉTODOS DE USO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica la prioridad de
5 las solicitudes de patente provisional de E.U. números de
serie 61/057,586; 61/121,391; y 61/178,350, presentadas el 30
de mayo de 2008; 10 de diciembre de 2008; y 14 de mayo de
2009 respectivamente.

DECLARACIÓN EN CUANTO A LA INVESTIGACIÓN FEDERALMENTE

10

PATROCINADA

No aplicable

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere en general a los campos de
inmunología, inflamación, cáncer, trastornos vasculares y
15 medicina. Más particularmente, la invención se refiere a los
anticuerpos (Abs) que se enlazan específicamente a
interleucina-1 α (IL-1 α) y a métodos para utilizar tales Abs
para tratar, prevenir o detectar una patología asociada con
la expresión de IL-1 α aberrante.

20

ANTECEDENTES

IL-1 α es la citosina pro-inflamatoria que juega un
papel en un número de diferentes actividades incluyendo la
inflamación, las respuestas inmunes, la metástasis de tumor y
la hematopoyesis. Los anticuerpos IgG contra IL-1 α se
25 presentan de manera natural en la población humana general y

se considera que son benéficos para enfermedades tales como la aterosclerosis.

SUMARIO

La invención se basa en el desarrollo de Abs
5 monoclonales completamente humanos (mAbs) que incluyen: (i) una región variable de enlace a antígeno que exhibe muy alta afinidad de enlace para la IL-1 α humana y (ii) una región constante que es efectiva tanto para activar el sistema del complemento aunque se enlaza a C1q y se enlaza a varios
10 diferentes receptores Fc. Los mAbs específicos de IL-1 α descritos en la presente se elaboraron al reemplazar la región constante de un mAb de IgG4 humana que tiene una región variable específica para IL-1 α humana con la región constante de un mAb de IgG1 humana.

15 Por consiguiente, la invención representa un mAb de IgG1 humana purificado que se enlaza específicamente a IL-1 α humana, incluyendo el mAb una cadena pesada unida covalentemente a una cadena ligera. La cadena pesada puede incluir la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y la
20 cadena ligera puede incluir la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

También dentro de la invención se encuentra un conjunto de ácidos nucleicos aislados que incluye un primer ácido nucleico que codifica para la cadena pesada de un mAb
25 de IgG1 humana que se enlaza específicamente a IL-1 α , y un

segundo ácido nucleico que codifica para la cadena ligera del mAb de IgG1 humana que se enlaza específicamente a IL-1 α , humana. El primer ácido nucleico puede codificar la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y el segundo
5 ácido nucleico puede codificar la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11. El primer ácido nucleico puede incluir la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 10 y el segundo ácido nucleico puede incluir la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 12.

10 En otro aspecto, la invención representa un vector de expresión que incluye un ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 11.

Otra característica de la invención es una célula
15 huésped aislada (e.g., una célula de mamífero tal como una célula CHO) que incluye un conjunto de ácidos nucleicos aislados incluyendo un primer ácido nucleico que codifica para la cadena pesada de un mAb de IgG1 humana que se enlaza específicamente a IL-1 α , y un segundo ácido nucleico que
20 codifica para la cadena ligera del mAb de IgG1 humana que se enlaza específicamente a la IL-1 α humana. La cadena pesada puede incluir la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y la cadena ligera puede incluir la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

25 La invención representa además un método para

eliminar una célula que expresa IL-1 α humana. Este método puede incluir la etapa de poner en contacto la célula con un mAb de IgG1 humano purificado que se enlaza específicamente a IL-1 α humana.

5 Un método para inhibir la migración de una célula humana a través de una matriz de membrana basal se encuentra también dentro de la invención. Este método puede incluir la etapa de agregar un mAb purificado que se enlaza específicamente a la IL-1 α humana, a una mezcla que incluye
10 una matriz de membrana basal y la célula humana.

Además dentro de la invención se encuentra un método para inhibir un incremento inducido por IL-1 α en la expresión de ICAM-1 y/o E-selectina en la superficie de una célula endotelial humana. Este método puede incluir la etapa
15 de agregar un mAb purificado que se enlaza específicamente a la IL-1 α humana, a una mezcla que incluye la célula endotelial y la IL-1 α .

La invención incluye adicionalmente un método para rastrear la inflamación en un sujeto humano previamente
20 sometido a las etapas de: obtener del sujeto una primera muestra de células mononucleares de sangre periférica en una primera ocasión; poner en contacto la primera muestra con un mAb purificado que se enlaza específicamente a la IL-1 α humana; y determinar el porcentaje de células en la primera
25 muestra que se enlazan al Ab monoclonal. Este método puede

incluir las etapas de: (a) obtener del sujeto una segunda muestra de células mononucleares de sangre periférica en una segunda ocasión; (b) poner en contacto la segunda muestra con el mAb purificado que se enlaza específicamente a la IL-1 α humana; (c) determinar el porcentaje de células en la segunda muestra que se enlaza al Ab monoclonal; y (d) comparar el porcentaje de las células en la primera muestra que se enlazan al mAb con el porcentaje de células en la segunda muestra que se enlazan al Ab monoclonal.

10 En los métodos anteriores, el mAb purificado puede ser un mAb de IgG1 humana que incluye una cadena pesada covalentemente unida a una cadena ligera, e.g., en donde la cadena pesada incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y la cadena ligera incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

20 Otro método dentro de la invención representa las etapas de: (a) enriquecer una muestra biológica obtenida de un sujeto humano utilizando un filtro para separar las moléculas de acuerdo con el peso molecular en una primera fracción que incluye la IgG intacta formada en complejo con IL-1 α y una segunda fracción que incluye moléculas menores a 100 Kda; y (b) cuantificar la cantidad del IL-1 α en la primera fracción.

25 Aún otro método dentro de la invención representa las etapas de: (a) enriquecer una muestra de plasma obtenido

de un sujeto humano utilizando un filtro que separa las moléculas de acuerdo con el peso molecular en una primera fracción que incluye IgG intacta formado en complejo con IL-1 α y una segunda fracción que incluye una molécula menor a 100 Kda; (b) agregar la primera fracción a un sustrato que incluye Abs de IgG anti-humana inmovilizados bajo condiciones que permiten que la IgG en la primera fracción se enlace específicamente a los Abs de IgG anti-humana inmovilizados sobre el sustrato; (c) lavar el sustrato para retirar el material en la primera fracción que no se enlaza específicamente a los Abs de IgG anti-humana inmovilizados; (d) poner en contacto el sustrato lavado en la etapa (c) con un Ab que se enlaza específicamente a IL-1 α humana bajo condiciones que permiten que el Ab se enlace específicamente a la IL-1 α humana para enlazar específicamente cualquier IL-1 α humana enlazada al sustrato; (e) lavar el sustrato para retirar cualquiera de los Ab que se enlazan específicamente a la IL-1 α humana que no se enlaza al sustrato; y (f) cuantificar la cantidad de Ab que se enlaza específicamente a IL-1 α humana que permanece unida al sustrato después de la etapa (e).

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que comúnmente se entiende por alguien de experiencia ordinaria en la materia a la cual pertenece esta

invención. Las definiciones comúnmente entendidas de los términos biológicos pueden encontrarse en Rieger et al., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5ª edición, Springer-Verlag: New York, 1991; y Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994.

El término "se enlaza específicamente" como se utiliza en la presente, cuando se refiere a un polipéptido (incluyendo los Abs) o al receptor, se refiere a una reacción de enlace que es determinante de la presencia de la proteína o polipéptido o receptor en una población heterogénea de proteínas y otros biológicos. Así, bajo las condiciones designadas (e.g., condiciones de inmunotransferencia en el caso de un Ab), el ligando o Ab específico se enlaza a su "objetivo" particular y no se enlaza en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra o a otras proteínas con las cuales el ligando o Ab puede entrar en contacto en un organismo. Generalmente, una primera molécula que "se enlaza específicamente" a una segunda molécula tiene una constante de afinidad de equilibrio mayor que aproximadamente 10^5 (e.g., 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} y 10^{12} o más) litros/moles para esa segunda molécula.

Al referirse a una molécula de proteína tal como un Ab, "purificado" significa separado de los componentes que acompañan naturalmente tales moléculas. Típicamente, un Ab o proteína se purifica cuando es de al menos aproximadamente

10% (e.g., 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.9% y 100%) por peso, libre de las proteínas que no son Ab u otras moléculas orgánicas que se presentan de manera natural con las cuales se encuentra naturalmente asociada. La pureza puede medirse por cualquier método apropiado, e.g., cromatografía de columna, electroforésis por gel de poliacrilamida o análisis HPLC. Se encuentra "purificada" la proteína químicamente sintetizada u otra proteína recombinante producida en un tipo de célula diferente al tipo de célula en el cual se presenta de manera natural.

Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente pueden utilizarse en la práctica o la prueba de la presente invención, se describen abajo métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones mencionadas en la presente se incorporan mediante la referencia en su totalidad. En el caso de conflicto, regirá la presente especificación incluyendo sus definiciones. Además, las modalidades particulares tratadas abajo son solo ilustrativas y no pretende ser limitantes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención abarca las composiciones y métodos relacionados a los mAbs completamente humanos que incluyen (i) una región variable de enlace a antígeno que exhibe muy alta afinidad de enlace para IL-1 α y (ii) una región

constante que es efectiva tanto para activar el sistema del complemento aunque se enlaza a Clq y se enlaza a varios diferentes receptores Fc. Las modalidades preferidas abajo descritas ilustran la adaptación de estas composiciones y métodos. Sin embargo, a partir de la descripción de estas modalidades, pueden hacerse y/o practicarse otros aspectos de la invención en base a la descripción abajo proporcionada.

Se describen en la presente los métodos que involucran las técnicas inmunológicas y de biología molecular convencionales. Los métodos inmunológicos (por ejemplo, ensayos para la detección y localización de complejos de antígeno-Ab, inmunoprecipitación, inmunotransferencia y lo similar) se conocen en general en la materia y se describen en tratados de metodología tales como Current Protocols in Immunology, Coligan et al., ed., John Wiley & Sons, New York. Las técnicas de la biología molecular se describen en detalle en tratados tales como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., vol. 1-3, Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; y Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., ed., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York. Los métodos para Ab se describen en Handbook of Therapeutic Abs, Dubel, S., ed., Wiley-VCH, 2007. Las técnicas de cultivo celular se conocen en general en la materia y se describen en detalle en los tratados de metodología tales como Culture of

Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 4^a edición, por R
Ian Freshney, Wiley-Liss, Hoboken, N.J., 2000; y General
Techniques of Cell Culture, por Maureen A Harrison y Ian F
Rae, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1994. Los
5 métodos para la purificación de la proteína se tratan en
Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology, Vol.
182, Deutscher M P, ed., Academic Press, San Diego Calif.,
1990.

En un aspecto, la invención representa un mAb
10 completamente humano que incluye (i) una región variable de
enlace a antígeno que exhibe muy alta afinidad de enlace para
IL-1 α humana y (ii) una región constante que es efectiva
tanto para activar el sistema del complemento aunque se
enlaza a Clq y se enlaza a varios diferentes receptores Fc.
15 El Ab humano es preferentemente una IgG1. El Ka del Ab es
preferentemente de al menos $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ o mayor (e.g., mayor a
 $9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$,
 $4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, o $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$).

Debido a que los linfocitos B que expresan Ig
20 específica para IL-1 α humana se presentan de manera natural
en seres humanos, un método actualmente preferido para elevar
los mAbs es primero aislar tal linfocito B de un sujeto y
después immortalizarlo de manera que pueda replicarse
continuamente en cultivo. Los sujetos que carecen de grandes
25 números de linfocitos B que se presentan de manera natural

que expresan Ig específica para IL-1 α humana pueden inmunizarse con uno o más antígenos IL-1 α humana para incrementar el número de tales linfocitos B. Los mAbs humanos se preparan al immortalizar una célula humana que
5 secreta Ab (e.g., una célula de plasma humano). Ver e.g., la Patente de E.U. No. 4,634,664.

En un método ejemplar, uno o más (e.g., 5, 10, 25, 50, 100, 1000 o más) sujetos humanos (e.g., sujetos que no se les administró previamente una vacuna de IL-1 α humana) se
10 seleccionaron por la presencia de tal Ab específico de IL-1 α humana en su sangre. Los sujetos que expresan el Ab deseado pueden utilizarse como donadores de linfocitos B. En un método posible, la sangre periférica se obtiene de un donador humano que posee linfocitos B que expresan Ab específico de
15 IL-1 α humana. Tales linfocitos B se aíslan entonces de la muestra sanguínea, e.g., mediante clasificación celular (e.g., clasificación celular activada por fluorescencia, "FACS"; o clasificación celular por microesferas magnéticas) para seleccionar linfocitos B que expresan Ig específico de
20 IL-1 α humana. Estas células pueden entonces immortalizarse mediante transformación viral (e.g., utilizando EBV) o mediante fusión a otra célula immortalizada tal como un mieloma humano de acuerdo con técnicas conocidas. Los linfocitos B dentro de esta población que expresa Ig
25 específico para IL-1 α humana pueden entonces aislarse por

limitados métodos de dilución (e.g., se seleccionan y subcultivan células en pozos de una placa de microtitulación que son positivos para Ig específico para IL-1 α humana, y se repite el proceso hasta que pueda aislarse una línea clonal deseada). Ver e.g., Goding Monoclonal Abs: Principles and Practice, pp. 59-103, Academic Press, 1986. Se prefieren estas líneas celulares clonales que expresan Ig que tiene al menos afinidades de enlace nanomolares o picomolares para IL-1 α humana. Los mAbs secretados por estas líneas celulares clonales pueden purificarse a partir del medio de cultivo o un fluido corporal (e.g., ascites) mediante procedimientos de purificación de Ig convencionales tales como reducciones de sal, exclusión por tamaño, separación de intercambio iónico y cromatografía de afinidad.

Aunque pueden utilizarse linfocitos B inmortalizados en cultivos *in vitro* para producir directamente mAbs, en ciertos casos sería deseable utilizar sistemas de expresión heterólogos para producir mAbs. Ver, e.g., los métodos descritos en la solicitud de patente de E.U. número 11/754,899. Por ejemplo, los genes que codifican para un mAb específico para IL-1 α humana pueden clonarse e introducirse en un vector de expresión (e.g., un vector de expresión en base a plásmido) para la expresión en una célula huésped heteróloga (e.g., células CHO, células COS, células de mieloma y células de E. coli). Debido a que los Igs

incluyen cadenas pesada (H) y ligera (L) en una configuración H_2L_2 , los genes que codifican para cada una pueden aislarse por separado y expresarse en diferentes vectores.

Aunque generalmente son menos preferidos, los mAbs
5 quiméricos (e.g., mAbs "humanizados"), que son moléculas de enlace a antígeno que tienen diferentes porciones derivadas de diferentes especies animales (e.g., región variable de un Ig de ratón fusionada a la región constante de una Ig humana), pueden utilizarse en la invención. Tales Abs
10 quiméricos pueden prepararse por métodos conocidos en la materia E.G., Morrison et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 81:6851, 1984; Neuberger et al., Nature, 312:604, 1984; Takeda et al., Nature, 314:452, 1984. De manera similar, los Abs pueden humanizarse por métodos conocidos en la materia.
15 Por ejemplo, los Abs monoclonales con la especificidad de enlace deseada pueden humanizarse comercialmente o como se describe en las Pat. de E.U. Nos. 5,693,762; 5,530,101; o 5,585.089.

Los mAbs descritos en la presente pueden madurarse
20 por afinidad para mejorar o de otro modo modificar su especificidad de enlace por métodos conocidos tales como redistribución de dominio de VH y VL (Marks et al. Bio/Technology 10:779-783, 1992), mutagénesis aleatoria de las regiones hipervariables (HVRs) y/o residuos de estructura
25 (Barbas et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813, 1994;

Schier et al. Gene 169:147-155, 1995; Yelton et al., J. Immunol. 155:1994-2004, 1995; Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9, 1995; y Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896, 1992. Las variantes de las secuencias de aminoácidos de un Ab pueden prepararse al introducir cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica para el Ab. Además, las modificaciones de las secuencias de ácido nucleico que codifican mAbs pueden modificarse (e.g., sin cambiar la secuencia de aminoácidos del mAb) para mejorar la producción del mAb en ciertos sistemas de expresión (e.g., eliminación del intron y/u optimización de codón para un sistema de expresión dado). Los mAbs descritos en la presente también pueden modificarse mediante la conjugación con otra proteína (e.g., otro mAb) o molécula que no sea proteína. Por ejemplo, un mAb puede conjugarse a un polímero soluble en agua tal como polietilenglicol o un nanotubo de carbono (Ver, e.g., Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605, 2005). Ver la solicitud de patente de E.U. número 11/754,899.

Preferentemente, para asegurar que pueden administrarse a un sujeto altos títulos de mAb específico de IL-1 α humana con mínimos efectos adversos, las composiciones de mAb de la invención son de al menos 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.9 o más por ciento por

peso puro (excluyendo cualquiera de los excipientes). Las composiciones de mAb de la invención pueden incluir únicamente un solo tipo de mAb (i.e., uno producido a partir de una sola línea de linfocito B clonal) o puede incluir una
5 mezcla de dos o más (e.g., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) diferentes tipos de mAbs. Además de los mAbs de IL-1 α humana, las composiciones Ab de la invención pueden también incluir otros mAbs que se enlazan específicamente a antígenos diferentes a IL-1 α humana.

10 Para modificar o mejorar su función, los mAbs de IL-1 α humana pueden conjugarse con otra molécula tal como una citotoxina o etiqueta detectable. Un mAb específico de IL-1 α humana puede conjugarse con una o más citotoxinas para eliminar más efectivamente las células que expresan IL-1 α .
15 Las citotoxinas para utilizarse en la invención pueden ser cualquier agente citotóxico (e.g., molécula que puede eliminar una célula después de ponerse en contacto con la célula) que puede conjugarse a un mAb específico de IL-1 α humana. Ejemplos de citotoxinas incluyen, sin limitación, radionúclidos (e.g., ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ¹²⁵I, ¹³¹I, ⁹⁰Y, ⁸⁹Zr, ²⁰¹Tl, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ⁵⁷Cu, ²¹³Bi y ²¹¹At), radionúclidos conjugados y
20 agentes quimioterapéuticos. Ejemplos adicionales de citotoxinas incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (e.g., 5-fluorouracilo (5-FU), metotrexato (MTX),
25 fludarabina, etc.), agentes anti-microtúbulos (e.g.,

vincristina, vinblastina, colchicina, taxanos (tales como paclitaxel y docetaxel), etc.), agentes alquilizantes (e.g., ciclofasfamida, melfalán, biscloroetilnitrosurea (BCNU), etc.), agentes de platino (e.g., cisplatino (también llamado cDDP), carboplatino, oxaliplatino, JM-216, CI-973, etc.), antraciclinas (e.g., doxorubicina, daunorubicina, etc.), agentes antibióticos (e.g., mitomicina-C), inhibidores de topoisomerasa (e.g., etoposida, tenoposida y camptotecinas) u otros agentes citotóxicos tales como ricina, toxina de difteria (DT), exotoxina de Pseudomonas (PE) A, PE40, abrina, saporina, proteína viral de fitolaca, bromuro de etidio, glucocorticoide, toxina de ántrax y otros. Ver e.g., Pat. de E.U. No. 5,932,188.

Los mAbs específicos de IL-1 α humano también pueden conjugarse a una etiqueta detectable. Las etiquetas detectables útiles en la presente invención incluyen biotina o estreptavidina, microesferas magnéticas, tintes fluorescentes (e.g., isotiocianato de fluoresceína, rojo texas, rodamina, proteína verde fluorescente y lo similar), radioetiquetas (e.g., ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , ^{111}In , ^{97}Ru , ^{67}Ga , ^{68}Ga o ^{72}As), sustancias radioopacas tales como metales para radioimagenología, agentes paramagnéticos para formación de imágenes con resonancia magnética, enzimas (e.g., peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otros comúnmente utilizados en un ELISA) y etiquetas colorimétricas tales como

microesferas de oro coloidal o vidrio o plástico coloreado (e.g., poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Los medios para detectar tales etiquetas son muy conocidos por el experto en la materia. Así, por ejemplo, las radioetiquetas
5 pueden detectarse utilizando película fotográfica o contadores de centelleo. También pueden utilizarse marcadores fluorescentes y pueden detectarse utilizando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Las etiquetas enzimáticas se detectan típicamente al proporcionar
10 la enzima con un sustrato y detectar el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y las etiquetas colorimétricas se detectan al simplemente visualizar la etiqueta coloreada.

La presente invención abarca también moléculas de
15 ácido nucleico que codifican para los mAbs completamente humanos específicos para IL-1 α humana. Aunque puede codificarse la misma molécula de ácido nucleico tanto en la cadena pesada como la ligera de un mAb específico de IL-1 α humana, pueden también utilizarse dos diferentes moléculas de
20 ácido nucleico, una que codifica para la cadena pesada y la otra que codifica para la cadena ligera. Las secuencias de aminoácidos de tres mAbs de IgG1 específicos para IL-1 α humana se presentan en la presente. Ver SEQ ID Nos: 1, 3, 5, 7, 9 y 11. Las moléculas de ácido nucleico ejemplares que
25 codifican para estas secuencias de aminoácido también se

describen en la presente. Ver SEQ ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, y 12. Puede también utilizarse cualquier otro ácido nucleico adecuado que codifica para las secuencias de aminoácidos de los dos mAbs de IgG1 descritos u otros mAbs dentro de la
5 invención.

Para la producción de mAbs, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden incorporarse en un vector de expresión en una orientación en donde tales moléculas de ácido nucleico se enlazan operativamente a las secuencias de
10 control de expresión tales como las secuencias de control transcripcionales y de traducción. Ejemplos de vectores de expresión incluyen los vectores derivados de plásmidos y vectores derivados de virus tales como adenovirus, virus adeno-asociados y retrovirus. Las moléculas de ácido
15 nucleico que codifican una cadena ligera y una cadena pesada pueden incorporarse en un solo vector o vectores diferentes. Los vectores de la invención pueden incluir también secuencias reguladoras tales como promotores y/o mejoradores (ver la Pat. de E.U. No. 5,168,062, la Pat. de E.U. No.
20 4,510,245 y la Pat. de E.U. No. 4,968,615), marcadores seleccionables o secuencias que codifican marcadores de afinidad (para facilitar la purificación) o una etiqueta detectable.

Para la producción de mAbs, los vectores de la
25 invención pueden introducirse en una célula huésped adecuada,

e.g., una célula procariótica tal como una bacteria o preferentemente, una célula eucariótica tal como una célula huésped de mamífero, planta o levadura. Ejemplos de los métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en las
5 células huésped incluyen el uso de vectores virales, electroporación, encapsulación de el(los) polinucleótido(s) en liposomas, transfección mediada por dextrano, precipitación de fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplasto, transformación mediada por
10 Agrobacteria, transformación biolística, y microinyección directa de ADN en los núcleos. Las líneas celulares de mamífero se prefieren actualmente para la expresión de mAbs de vectores. Ejemplos de células huésped de mamífero incluyen células de ovario (CHO) de hámster Chino (e.g., la
15 línea celular CHO DG44), células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono verde Africano (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (e.g., Hep G2), células NS0, células SP2, células HEK-293T, células Freestyle 293 y células NIH-3T3. Los mAbs de la invención
20 pueden también expresarse en animales o plantas transgénicos. Ver, e.g., Pat. de E.U. Nos. 5,827,690; 5,756,687; 5,750,172; 5,741,957; 6,046,037; y 5,959,177.

La invención proporciona un método para detectar una célula que expresa IL-1 α humana en una muestra al poner
25 en contacto la célula con un mAb específico de IL-1 α humana y

detectar el mAb enlazado a la célula. La invención proporciona también un método para eliminar una célula que expresa IL-1 α humana al poner en contacto la célula con un mAb específico de IL-1 α humana. Tal eliminación puede
5 llevarse a cabo mediante la eliminación mediada por el complemento, citotoxicidad mediada por la célula dependiente de Ab o suministro mediado por Ab de una citotoxina. Los Abs descritos en la presente también han demostrado ser útiles para otros métodos. Por ejemplo, MABp1 se ha utilizado para
10 reducir ICAM1 inducido por IL-1 α y la expresión de E-selectina en las células endoteliales. MABp1 también ha mostrado ser útil en inmunotransferencias para detectar y cuantificar IL-1 α en una muestra biológica.

EJEMPLOS

15 Ejemplo 1 - Clonación de cadenas anti-hIL-1 α IgG1 y Kappa

Las secuencias de cadena pesada de región variable (V-HC) y de cadena ligera de región variable (V-LC) se sintetizaron genéticamente utilizando la información de la secuencia de aminoácidos proporcionada en la patente de EU
20 número 5,959,085. La V-HC se amplificó mediante PCR introduciendo los sitios HindIII/Clal corriente arriba del codón de inicio ATG y un sitio NheI en el extremo 3'. La región constante de IgG1 de línea germinal humana (incluyendo exones e intrones) se amplificó por PCR modificando los dos
25 tripletes 5' que codifican para los primeros dos aminoácidos

Ala-Ser en un sitio NheI, e introduciendo un sitio BamHI en el extremo 3'. La secuencia de aminoácido de la región constante de IgG1 de línea germinal humana corresponde a la entrada Swiss-Prot P01857, excepto por un intercambio de
5 K171Q y un V261L. La V-HC y la secuencia de IgG1-HC constante se enlazaron utilizando el sitio NheI y se clonaron en pcADN3 utilizando los sitios HindIII y BamHI.

>hIL-1a-IgG1-HC

10 MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSMFG
VHWVRQAPGKGLEWVAASVDGSNKYYAESVKGRFTISRDNKNILFLQMD
SLRLEDTAVYYCARGRPKVVIPAPLAHWGQGTILVTFSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
15 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAQTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIALEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:1)

20

>hIL-1a-IgG1-HC

atggagttcgggctgagttgggtgttcctgggtggctctgctgcggggcggtgcagtgccagg
tgcagctggtggagagtggggggtggcggtggtgcagcctggccggtctctgcgcctgtcttg
cactgcctccggttttaccttttctatgtttgggtgtgcactgggtgcgccaggctcccggc
25 aagggaactggaatgggtggccgctgagttacgacgggtccaacaaatattacgctgaga

gcgtgaaaggcagattcaccatcagcagagataattccaagaatattctgttcctgcagat
 ggacagtctgagactggaggacactgctgtgtactactgcgctcgtggacgccctaagggtg
 gtcatccccgccccctggcacattggggccagggaaactctggtgaccttttctagcgcta
 gcaccaagggcccatcggtcttccccctggcacccctcctccaagagcacctctgggggcac
 5 agcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaac
 tcaggcgccctgaccagcggcgtccacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactct
 actccctcagcagcgtagtgaaccgtgccctccagcagcttggggcaccacagacctacatctg
 caacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaattcttgt
 gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtct
 10 tcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatg
 cgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggc
 gtggaggtgcataatgcccagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtg
 tggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaa
 ggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcag
 15 ccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccagg
 tcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccctggagtgggagag
 caatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacgggtcc
 ttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttct
 catgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccttaag
 20 tccgggaaaataa (SEQ ID NO:2)

El V-LC se amplificó por PCR introduciendo los
 sitios HindIII/Clal corriente arriba del codón de inicio ATG
 y un sitio BsiWI en el extremo 3'. La secuencia Kappa-LC
 constante humana se amplificó mediante PCR introduciendo un
 25 sitio 5' BsiWI que codifica para una Arg adicional y los

primeros aminoácidos Thr, y un sitio BamHI en el extremo 3'. La secuencia de aminoácidos Kappa-LC constante humana corresponde a la entrada Swiss-Prot P01834. V-HC y las secuencias Kappa-LC constantes se enlazaron utilizando el
5 sitio BsiWI y se clonaron en pcADN3 utilizando los sitios HindIII y BamHI.

>hIL-1a-K-LC

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISS
10 WLAWYQQKPGKAPKLLIYEASNLETGVPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDFA
TYYCQQTSSFLLSFGGGTKVEHRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:3]

15 >hIL-1a-K-LC

atggacatgcgcggtgccccgcccagctgctggggctgctgctgctgtggttccttgatcta
ggtgcgacattcagatgaccagctccccagctcagtgctcagcctccgtgggcgacagagt
gacaatcacctgccgcgcctctcagggaatctctagttggctggcctggtaccagcagaag
cctggaaaggcccccaagctgctgatctatgaagcctccaacctggagaccggcgctgc
20 cctctcgcttcagcggctcaggctcaggcagtgatcttactctgaccatcagctccctgca
gccagaggatttcgctacttactactgccagcagacctcttccttcctgctgtccttcggg
ggaggcacaaaggtggagcaccgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcct
ctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgcctgctgaataacttctatcc
cagagaggccaaagtaagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggag
25 agtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctga

gcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgag
ttcaccggtgacaaagagcttcaacaggggagagtggttag[SEQ ID NO:4]

Ejemplo 2 - Generación de NATHMAB-hIL-1a IgG1 y la cadena

5 Kappa

La secuencia completa que codifica para la cadena pesada NATHMAB-hIL-1a/IgG1 se sintetizó genéticamente. La secuencia V-HC correspondió a la secuencia de aminoácidos descrita en la Patente de EU 5,959,085. La secuencia de
10 IgG1.HC constante humana correspondió a la entrada Swiss-Prot P01857. La secuencia de nucleótidos se optimizó por codón para la expresión en células CHO. Se agregó una secuencia Kozac (gccacc) corriente arriba del ATG de inicio.

15 >NATHMAB-hIL-1A-IGG1-HC

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSMFG
VHWVRQAPGKGLEWVA AVSYDGSNKYYAESVKGRFTISRDN SKNILFLQMD
SLRLEDTAVYYCARGRPKVVIPAPLAHWGQGTLVTFSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
20 VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25 [SEQ ID NO:5]

>NATHMAB-hIL-1A-IGG1 HC

gccacccatggagtttgggtctgtcctgggtgttcttgggtggctctgctgaggggggtgcagt
gccaggtccagctggtggagtctggtgggggagtggtgcagcctgggagatctctgcggct
gtcttgcaactgcctctggtttcactttctctatgtttgggtgtgcattgggtcaggcaagca
5 ccaggcaaaggactcgagtggtgcagctgtgagctatgacgggtctaacaaatattacg
ctgagctctgtcaagggtaggtttaccatcagccgggataattccaaaaatatacctgttcct
gcaaatggactctctgaggctggaagatactgcagtctactattgtgcaagggggaggcca
aaggtggtgatccccgctcccctcgctcactggggacagggaaccctggtgactttcagct
ctgctagcaccaaggggccctagcgtgttcccattgggtccttcctccaaatctacttctgg
10 aggcaccgcccgcctgggatgtctcgtgaaagattattttcctgagcccgctaccgtgagc
tggaacagcggcgccctgactagcggcgtgcacacctttcccgagtgctgcaatctagcg
ggctgtactccctgagctctgtcgtgaccgtgccctccagcagcctcggaactcagaccta
catctgcaatgtcaatcataaacctctaataccaaagtcgataagaaggctgaacctaaa
tcttgcgataaaaccatacctgcccccttgcccagcaccggaactgctgggcggtccct
15 ctgtgtttctgttccccccaaacccaaagataccctgatgatctctaggacccccgaggt
cacttgtgtcgtggtggatgtgtcccacgaagatccagaagtcaaattcaactggtatgtg
gacgggggtcgaagtgcacaacgcaaagaccaagcctagggagggaacagtataatagcacat
ataggggtggtcagcgtcctgaccgtcctgcatcaggactggctgaatggcaaagaatataa
gtgtaaagtgtccaacaaggccctgccagccccaatcgaaaagacaatctctaaagccaag
20 gggcaacccccgggaacctcaggtctatacactgccaccctctcgggatgaactgaccaaga
atcaggtgagcctgacatgtcttgtgaagggtttttatccctccgacattgccgtggagtg
ggagagcaatggacaaccagaaaataactacaaaaccacacccccctgtgctggactccgat
ggttccttcttcctctactctaagctgacagtgataagtctaggtggcagcaggggaatg
tgttctcctgctctgtgatgcacgaggcactgcacaatcattatacacaaaagtctctgtc
25 tctgtctccaggaaagtaa [SEQ ID NO:6]

La secuencia completa que codifica para la cadena ligera NATHMAB-hIL-1a/Kappa se sintetizó genéticamente. La secuencia V-LC correspondió a la secuencia de aminoácidos descrita en la Patente de EU 5,959,085. La secuencia Kappa-
5 LC constante humana correspondió a la entrada Swiss-Prot P01834. La secuencia de nucleótidos se optimizó por codón para la expresión en células CHO. Se agregó una secuencia Kozac (gccacc) corriente arriba del ATG.

10 >NATHMAB-hIL-1A-K-LC
MDMRVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISS
WLAWYQQKPGKAPKLLIYEASNLETGVPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDFA
TYYCQQTSSFLLSFGGGTKVEHTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHK
15 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO: 7]

NATHMAB-hIL-1A-K-LC
gccaccatggacatgcgcggttcctgcccagctcctcggactgctgctgctttggttcccag
gctcccggtgtgatattcagatgacacagtctccctcctccgtatctgcatccgtgggcga
20 cagggtcacaatcacttgtagggccagccaggggatctctagttggctcgcatggtaccaa
caaaagccaggtaaggctccgaaactgctcatttacgaagctagtaacctcgaaacaggcg
tgccaagccgggttttagcggctccgggttcgggttctgacttcaccctcactatttcctcct
gcaacctgaggattttgccacatattactgtcagcaaacttcttcttttctgctctccttt
gggtgggggaactaagggtggagcacacagtgggcgccccagcgtctttatcttcccccaa
25 gcgatgaacagctgaagtcagggaccgccagcgtgggtctgcctgctcaataatttttacc

tcgcgaggctaaggtccaatggaaagtggataacgccctccagagcggtaactctcaggag
tctgtcacagagcaagacagcaaggatagcacctattccctctccagcaccctgacactgt
ctaaggccgactacgagaaacacaaagtgtacgcttgtgaggtgactcaccagggactgag
tagccctgtgacaaaatctttcaatagggggagaatgctga [SEQ ID NO:8]

5

Ejemplo 3 - Expresión de NATHMAB-IL1-a (subtipo IgG1/k)

NATHMAB-IL-1 α se expresó y purificó utilizando un método de transfección transitoria. El sobrenadante del cultivo celular o Ab purificado por afinidad con la proteína G se sometió a un análisis adicional como se describe abajo. Las células 293T de riñón embriónico humano (HEK) se cultivaron en DMEM conteniendo 10% de FCS, y se transfectaron de manera transitoria utilizando el reactivo jetPEI (Polyplus) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células se sembraron en recipientes de 10 cm (células de 3x10⁶ por recipiente de 10 cm) 24 h antes de la transfección para alcanzar aproximadamente 50% de densidad en el punto de tiempo de la transfección. Se utilizaron para la transfección 5 μ g por recipiente de pcADN3-anti-hIL-1 α -IgG1-HC y un exceso molar de 2 veces de pcADN3-anti-hIL-1 α -Kappa. Después de la recuperación, el medio se cambió a DMEM conteniendo 2% de FCS (10 ml por recipiente) y se recolectó Ab durante 5 hasta 6 días. El sobrenadante se recolectó, se filtro, se ajustó el pH a 7.5-8 y se almacenó a 4°C hasta su uso posterior.

Parte del sobrenadante (250 ml) se incubó con sefarosa de proteína G (GE Healthcare) durante 3 horas a 4°C sobre una rueda giratoria. Entonces, la sefarosa de proteína G se cargo en una columna de flujo gravitacional y se lavó con PBS. Ab se eluyó en fracciones de 1 ml utilizando 100 mM de glicina/150 mM de NaCl en 100 µl de Tris (pH 8), seguido por la diálisis con PBS conteniendo 10% de glicerol. La concentración total de proteína de cada fracción se midió utilizando el Equipo de Detección de Proteína BCA (Pierce). El tamaño correcto de las cadenas pesada y ligera y del Ab nativo ensamblado se confirmó mediante SDS-PAGE.

El sobrenadante que contiene los lisados celulares de Ab purificado de NATHMAB-hIL-1α y Triton X-100 de las células productoras HEK 293T se probaron para su enlace al antígeno en una radioinmunotransferencia (RIA) utilizando ¹²⁵I-hIL-1α. El enlace se ensayó mediante absorción en la proteína G. Todas las muestras se unieron a ¹²⁵I-hIL-1α con la más alta actividad en el eluato. El enlace del NATHMAB-hIL-1α purificado a una concentración de 0.012% (actividad máxima media en RIA) a ¹²⁵I-hIL-1α se utilizó para medir el coeficiente de afinidad. El Ka de NATHMAB-hIL-1α bajo estas condiciones fue $3.03 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. El nuevo cálculo reveló una concentración estimada de aproximadamente 30 µg/ml de anti-hIL-1α-IgG activo en el eluato purificado.

La actividad neutralizante de NATHMAB-hIL-1α se

probó en un bioensayo utilizando la sublínea EL4-6.1 murino que produce altos niveles de IL-2 cuando se trató con IL-1 α murino o humano (Zubler et al., J. Immunol. 134:3662-3668, 1985). Las concentraciones indicadas de NATHMAB-hIL-1 α (eluato) se incubaron durante 30 min a 37°C con diversas concentraciones de hIL-1 α recombinante (eBioscience) en un volumen final de 100 μ l/pozo en una placa de cultivo de 96 pozos (de fondo plano). Cada punto se llevó a cabo por triplicado y en un medio de cultivo (DMEM, 5% de FCS). A cada pozo se agregaron 100 μ l de una suspensión de EL4-6.1 células (5×10^5 células/ml) en el medio de cultivo conteniendo 0.2 μ g/ml de ionomicina. Después de la incubación durante 24 horas a 37°C en un incubador de CO₂ al 5%, los sobrenadantes libres de células se recolectaron y ensayaron para las concentraciones de IL-2 utilizando un ELISA comercialmente disponible (R&D Systems). Los resultados mostraron que NATHMAB-hIL-1 α neutralizó de manera efectiva la secreción de IL-2 inducido por hIL-1 α mediante células EL-4.

Para probar la neutralización de hIL-1 α enlazado a la membrana, se utilizó el mismo ensayo en base a la célula EL-4 como se describió arriba con las siguientes modificaciones. Se incubaron diferentes concentraciones de NATHMAB-hIL-1 α (eluato) con diversos números de monocitos humanos activados. Para la preparación de monocitos, se aislaron PBMC de la capa leucocítica utilizando

centrifugación Ficoll-Paque. Los monocitos se dejaron adherir durante 1.5 horas a 37°C en RPMI en recipientes de plástico. Los linfocitos no adherentes se lavaron para producir un cultivo de monocitos casi puro. Los monocitos se
5 cultivaron en RPMI conteniendo Gln, Pyr, y 10% de FCS durante 24 horas con LPS (1 µg/ml) a 37°C en un incubador de CO₂ al 5%. Las células se desprendieron con PBS/EDTA 2mM, se desmontaron cuidadosamente de las placas, y se transfirieron a tubos Falcon. Las células se lavaron dos veces con PBS, se
10 resuspendieron en PBS/PFA 1% y se fijaron durante 10 min a 20°C. Las células se lavaron con amortiguador de glicina (150 mM de glicina, 75 mM de NaCl, pH 7.4), después con el medio de cultivo y se contaron. Los resultados mostraron que NATHMAB-hIL-1α neutralizó de manera efectiva la secreción IL-
15 2 mediante células EL-4 inducidas por hIL-1α enlazada a la membrana. En un experimento similar al antes descrito, NATHMAB-hIL-1α se probó para la neutralización de IL-1α murino. Las cantidades indicadas del sobrenadante de NATHMAB-hIL-1α se incubaron con IL-1α humano (h) o murino (m)
20 recombinante (eBioscience). Conteniendo el sobrenadante la IL-1α del Ab humano neutralizado pero no el murino.

Ejemplo 4 - Eliminación de Células Cancerígenas mediada por Ab

Las células mononucleares sanguíneas periféricas
25 humanas (PBMC) aisladas de la capa leucocítica mediante la

preparación Ficoll Paque estándar se incubaron en ya sea RPMI-1640 CM o RPMI-1640-CM conteniendo rhIL-2 (30 ng/ml, eBioscience) a 37°C y CO₂ al 5% durante la noche y se utilizaron como células efectoras (E). Las células THP1 se
5 utilizaron como los objetivos (T). Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pozos con cada punto en triplicado. Después de que los objetivos 1×10^4 se incubaron con diferente concentración de MABp1 durante 15 minutos, se agregaron las células efectoras en una proporción ET de 25:1 y 50:1 a los
10 objetivos 1×10^4 y se incubaron durante otras 4 horas. Se transfirieron 75 µl del volumen del ensayo a una nueva placa de 96 pozos y se ensayó la toxicidad utilizando el equipo de detección de citotoxicidad LDH (Roche) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El % de lisis específica =
15 (liberación experimental media - liberación espontánea media sin anticuerpo) x 100/ (liberación máxima media de los objetivos - liberación espontánea media de los objetivos). A. Se utilizaron PBMC no tratados como células efectoras. B. se utilizaron PBMC tratados con rhIL-2 como células efectoras.
20 En ambos casos, el incremento de las concentraciones (1.25 a 20 µg/ml) de MABp1 dio como resultado el incremento de la eliminación de las células objetivo (hasta aproximadamente 90%) en ambas proporciones ET.

Ejemplo 5 - Secuencias mAb específicas de anti-IL1 α humana

25 Se sintetizó la secuencia completa que codifica

para otra cadena ligera anti-hIL-1 α IgG₁/Kappa humana
específica para IL1 α humana (MABp1) y se expresó como se
describe arriba. En los ácidos nucleicos que codifican para
las cadenas pesada y ligera, se agregó una secuencia Kozac
5 (gccacc) corriente arriba del ATG de inicio.

Cadena Pesada

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSMFG
VHWVRQAPGKGLEWVA AVSYDGSNKYYAESVKGRFTISRDN SKNIFLQMD
10 SLRLEDTAVYYCARGRPKVVIPAPLAHWGQGTLVTFSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
15 PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTP
PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
[SEQ ID NO:9]

gccaccatggagtttggtctgtcctgggtgttcttggtggctctgctgaggggggtgcagt
20 gccaggtccagctggtggagtctggtgggggagtggtgcagcctgggagatctctgcggct
gtcttgcactgcctctggtttcactttctctatgtttggtgtgcattgggtcaggcaagca
ccaggcaaaggactcgagtggtcgagctgtgagctatgacgggtctaacaatattacg
ctgagctctgtcaagggtaggtttaccatcagccgggataattccaaaaatattcctgttcct
gcaaatggactctctgaggctggaagatactgcagtctactattgtgcaagggggaggcca
25 aagggtggtgatccccgctcccctcgctcactggggacaggaaccctggtgactttcagct

ctgctagcaccaagggccctagcgtgttccattggctccttcctccaaatctacttctgg
aggcaccgccgccctgggatgtctcgtgaaagattattttctgagcccgtcaccgtgagc
tggaacagcggcgccctgactagcggcgtgcacacctttcccgagtgctgcaatctagcg
ggctgtactccctgagctctgtcgtgaccgtgccctccagcagcctcggaactcagaccta
5 catctgcaatgtcaatcataaaccctctaataccaaagtcgataagaggggtcgaacctaaa
tcttgcgataaaaccatacctgcccccttgcccagcaccogaactgctgggcggtccct
ctgtgtttctgttcccccccaaacccaaagataccctgatgatctctaggacccccgaggt
cacttgtgtcgtgggtggatgtgtcccacgaagatccagaagtcaaattcaactggatgtg
gacgggggtcgaagtgcacaacgcaaagaccaagcctagggagggaacagtataatagcacat
10 ataggggtggtcagcgtcctgaccgtcctgcatcaggactggctgaatggcaaagaatataa
gtgtaaagtgtccaacaaggccctgccagccccaatcgaaaagacaatctctaaagccaag
gggcaacccccgggaacctcaggtctatacactgccaccctctcgggagggaatgaccaaga
atcaggtgagcctgacatgtcttgtgaagggtttttatccctccgacattgccgtggagtg
ggagagcaatggacaaccagaaaataactacaaaaccacacccccctgtgctggactccgat
15 ggttccttcttctctactctaagctgacagtgataagtctaggtggcagcaggggaatg
tgttctcctgctctgtgatgcacgaggcactgcacaatcattatacacaaaagtctctgtc
tctgtctccaggaaagtaa [SEQ ID NO:10]

Cadena Ligera

20 MDMRVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISS
WLAWYQQKPGKAPKLLIYEASNLETGVPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDFA
TYYCQQTSSFLLSFGGGTKVEHKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:11]

25

gccaccatggacatgcgcggttcctgcccagctcctcggactgctgctgctttggttcccag
 gctcccgggtgtgatattcagatgacacagctctccctcctccgtatctgcatccgtgggcga
 cagggtcacaatcacttgtagggccagccaggggatctctagttggctcgcattggtaccaa
 caaaagccaggttaaggctccgaaactgctcatttacgaagctagtaacctcgaaacaggcg
 5 tgccaagccgggttttagcggctccggttccggttctgacttcaccctcactatttcctcct
 gcaacctgaggattttgccacatattactgtcagcaaacttcttcttttctgctctccttt
 ggtggaggaactaagggtggagcacaagcggacagttgctgctcctagcgtctttatcttcc
 ctccaagcgatgaacagctgaagtcagggaccgccagcgtgggtctgcctgctcaataattt
 ttaccctcgcgaggctaagggtccaatggaaagtggataacgccctccagagcggtaactct
 10 caggagtctgtcacagagcaagacagcaaggatagcacctattccctctccagcaccctga
 cactgtctaaggccgactacgagaaacacaaaagtgtacgcttgtgaggtgactcaccaggg
 actgagtagccctgtgacaaaatctttcaatagggggagaatgctga [SEQ ID NO:
 12]

15 **Ejemplo 6 - Afinidad de Enlace de MABp1**

La afinidad de enlace del MABp1 purificado se
 determinó utilizando la resonancia de plasmon superficial
 (SPR) sobre un instrumento BIAcore 2000 (GE Health Sciences).
 Un Ab de IgG (Fc) anti-humano monoclonal de ratón se
 20 inmovilizó covalentemente sobre las células de flujo de un
 chip detector CM5 utilizando un equipo de captura de Ab
 humano y un equipo de acoplamiento de amina (GE Health
 Sciences). Los niveles de inmovilización de 8000 - 14000 RU
 pudieron lograrse típicamente. Después de la inmovilización
 25 del Ab de captura de IgG (FC) anti-humano de ratón, tres

ciclos de inicio con HBS-EP circularon amortiguador (GE Health Sciences) y dos ciclos de inicio con MABp1 se corrieron para estabilizar la superficie CM5 y para retirar cualquier Ab no covalentemente enlazado. Para el análisis, 5 Ab de MABp1 se diluyó en HBS-EP circulando el amortiguador a una concentración final de 1 µg/ml y se inmovilizó a 700 RU sobre una célula de flujo del chip detector CM5. La citosina IL-1A sin portador (eBioscience, #34-8019) se diluyó de manera serial en HBS-EP circulando el amortiguador a través 10 de un rango de prueba desde 100 nM hasta 0.05 nM. La tasa de flujo fue de 30 µl/min. Los datos de disociación para cada dilución de citosina se registraron durante 15 minutos. La superficie CM5 se regeneró después de cada ciclo utilizando una sola inyección de 3M MgCl₂ durante 25 segundos a una tasa 15 de flujo de 30 µl/min. Se utilizó el software BiaEvaluation y un modelo de enlace Langmuir para ajustar los datos. Se determinó el K_D para MABp1 para ser menor a 2.0×10^{-10} M.

Ejemplo 7 - MABp1 Inhibe la Invasión Celular Tumoral de una Matriz de Membrana Basal

20 Matrigel (BD), una matriz de membrana basal, se descongeló a 4°C durante la noche, y el diluido (5 mg/ml a 1 mg/ml) en medio de cultivo celular frío libre de suero. Se colocaron 100 µl del matrigel diluido en las cámaras superiores de un transwell (pozo de traspaso) de 24 pozos 25 (Costar) y el transwell se incubó a 37°C durante al menos 4 a

5 horas para gelificación. Las células tumorales (MDA-MB-231 y THP-1) se recolectaron de los frascos de cultivo de tejido mediante Tripsina/EDTA, se lavaron con medios de cultivo y se resuspendieron en un medio conteniendo 1% de FBS a una densidad de 1×10^6 células/ml. El matrigel gelificado se lavó suavemente con un medio de cultivo templado libre de suero, y se agregaron 100 μ l de la suspensión celular en cada pozo. La cámara inferior del transwell se llenó con 600 μ l del medio de cultivo, y las placas se incubaron a 37°C durante 12 a 24 horas. Las células que no invadieron el matrigel se desmontaron suavemente de la parte superior de cada transwell con una torunda de algodón. Los transwell se retiraron entonces de las placas de 24 pozos y se tiñeron con violeta cristal después de fijar las células invadidas con 70% de etanol o metanol. Las células invadidas se contaron bajo un microscopio luminoso. El porcentaje de células que invadieron el matrigel se inhibieron significativamente en la presencia de MABp1.

Ejemplo 8 - Los Bloques MABp1 se Incrementan en la Expresión de ICAM1 en Células Endoteliales

Las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) (BD Biosciences) se sembraron en placas de 24 pozos a 5×10^5 por pozo en 1 ml del medio M-200 complementado con complemento de crecimiento bajo en suero (Invitrogen). Las células se dejaron reposar durante 3-4 horas. El medio se

aspiró y se agregó un 1 ml fresco de M-200 por pozo. Se agregó directamente MABp1 a las células @ 4.26 µg/ml, se co-incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, y después se agregó IL-1α humano recombinante (rhIL1A, eBioscience) a una concentración final de 40 pg/ml. Los pozos de control positivo recibieron solo la adición de IL-1α. Las células HUVEC en la ausencia de IL-1α o la ausencia de MABp1 sirvieron como controles negativos. Después de 17-20 horas de incubación a 37°C, CO₂ al 5%, se levantaron las células de las placas mediante un tratamiento no enzimático durante 20 minutos utilizando el reactivo CellStripper (Cellgro Mediatech) y después se ensayaron inmediatamente para la expresión de CD54 (ICAM-1) utilizando protocolos de citometría de flujo estándar. El amortiguador de tinción comprendió PBS de Dulbecco complementado con 2% de suero bovino fetal inactivado por calor. El mAb de CD54 (ICAM-1) anti-humano de ratón conjugado con PE (eBioscience, clon HA58) o un control de isotipo IgG1k de ratón conjugado con PE (eBioscience, #12-4714) se utilizaron por instrucciones del fabricante para teñir las células HUVEC en un volumen de tinción de 100 microlitros durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo de manera subsecuente dos lavados en amortiguador de tinción y después las muestras se obtuvieron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Entre los diversos

experimentos independientes (n=5) la sobrerregulación de las moléculas de adhesión ICAM-1 inducidas por rhIL1A en la superficie de las células HUVEC se neutralizó mediante MABp1 a niveles de línea basal exhibidos por las células HUVEC no
5 estimuladas.

Ejemplo 9 - Los Bloques MABp1 se Incrementan en la Expresión de E-selectina en Células Endoteliales

Similar a sus efectos sobre la inducción de ICAM-1, también se observó la neutralización de la inducción de CD62E
10 (E-selectina) mediada por MABp1 sobre las células HUVEC. Este efecto fue el más pronunciado cuando las células HUVEC se estimularon no mediante rhIL-1a soluble sino por IL-1a membranoso anclado por glicosil-fosfatidilinositol a la superficie de las células CHO DG44 (células GPI-IL1A). En
15 este experimento, los cultivos confluentes de células HUVEC en placas de 6 pozos se co-cultivaron durante la noche con células GPI-IL1A DG44 de 5×10^6 en el medio M-200, ya sea solas, en la presencia de 10 µg/ml de MABp1, o en la presencia de 10 µg/ml de Ab de control de isotipo D5.
20 Después de 17-20 horas, las monocapas HUVEC se lavaron extensamente con PBS de Dulbecco y después se levantaron mediante tratamiento no enzimático durante 20 minutos con reactivo CellStripper (Cellgro Mediatech) y después se ensayaron inmediatamente para la expresión de CD62E (E-
25 selectina) utilizando protocolos de citometría de flujo

estándar. El amortiguador de tinción comprendió PBS de Dulbecco complementado con 2% de suero bovino fetal inactivado con calor. El mAb CD62E anti-humano de ratón conjugado con PE (eBioscience, clon P2H3) o un control de isotipo de IgG1k de ratón conjugado con PE (eBioscience, clon P3) se utilizaron por instrucciones del fabricante para teñir las células HUVEC en un volumen de tinción de 100 microlitros durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo de manera subsecuente dos lavados en amortiguador de tinción y después las muestras se obtuvieron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). La expresión de E-selectina sobrerregulada sobre la superficie de las células HUVEC inducida por GPI-IL-1a membranoso se neutralizó mediante MABp1 a niveles de línea basal exhibidos por células HUVEC no estimuladas.

Ejemplo 10 - Bioensayo de MRC-5 para la potencia de MABp1 (neutralización de rhIL1A)

La línea celular MRC-5 derivada de fibroblastos de pulmón humano fetal, se obtuvo de la colección ATCC (CCL-171). La potencia neutralizante para IL-1 de MABp1 se ensayó al medir la liberación inducida por IL-1A de IL-6 de células MRC-5. Las células MRC-5 se sembraron a 5×10^3 por pozo en una placa de 96 pozos en 100 microlitros del medio completo DMEM. Las células se cultivaron durante la noche a 37°C en un incubador con CO₂ al 5% humidificado. Las células MRC-5

confluentes se cultivaron de manera subsecuente otras 24 horas con 20 pg/ml de IL-1A humano recombinante (rhIL1A, eBioscience) ya sea solas o en la presencia de concentraciones incrementadas de MABp1. Las células de control negativo no se estimularon con rhIL1A. Después de 24 horas, se recolectaron los sobrenadantes y se ensayaron para liberar IL-6 utilizando el equipo ELISA IL-6 de eBioscience. El IC₅₀ o la concentración de MABp1 requerida para inhibir 50% de la liberación máxima de IL-6, estuvo en el rango de 0.001-0.01 µg/ml.

Ejemplo 11 - MABp1 Identifica Células IL-1a+

Se hicieron alícuotas de cien microlitros de sangre completa anti-coagulada con heparina de sodio en tubos FACS de poliestireno. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos con 1 mg de IgG humana (proteína A purificada) más 2 ml de suero bovino fetal inactivado por calor para bloquear los receptores Fc. Los Abs primarios se agregaron entonces a la muestra: Ya sea 1 mg de MABp1 etiquetado con Alexa-488, 1 mg de Ab de IL1A humana de anti-membrana monoclonal etiquetado FITC (FAB200F, R&D Systems) o 1 mg de un control de isotipo murino (IC002F, R&D Systems). Los Abs primarios se incubaron con la muestra durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Los eritrocitos de muestra se lisaron entonces (solución BD Biosciences PharmLyse) a temperatura ambiente durante 15

minutos, se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos, y se aspiraron. Los pellets de muestra se lavaron tres veces con 1 ml de solución salina balanceada de Hank (HBSS) conteniendo 2% de suero bovino fetal inactivado por calor. La muestra se
5 resuspendió en 0.3 ml de HBSS + 2% de FBS y se obtuvieron datos en un citómetro de flujo FACSCalibur y se analizaron utilizando software CellQuest. El análisis citométrico de flujo de PBMC humano utilizando MABp1 mostró que solo el 2% de PBMC fue positivo para IL-1 α .

10 **Ejemplo 12 - MABp1 para Detectar y Rastrear Infecciones e Inflamación**

El análisis citométrico de flujo (como en el Ejemplo 11) de PBMC humano utilizando MABp1 mostró un incremento de 3.6 veces en el porcentaje de PBMC positivo
15 para IL-1 α ⁺ en un sujeto con una infección sub-clínica comparada con un control normal. De manera similar, se presentó un incremento en el porcentaje de PBMC positivo para IL-1 α ⁺ en un sujeto con una muela del juicio inflamada. Se observó una disminución sustancial en el número de IL-1 α ⁺
20 PBMC desde 14 a 45 días después del retiro de la muela del juicio.

Ejemplo 13 -Inmunotransferencia para Detectar y/o Cuantificar IL-1 α

En general, se encuentran presentes muy bajos
25 niveles de IL-1 α en el plasma de sujetos humanos. Debido a

que estos niveles con frecuencia se encuentran más allá del umbral de detección de las inmunotransferencias convencionales, se desarrolló un ELISA con sensibilidad mejorada. En este ELISA, pueden agregarse AB anti-IL-1 α exógeno (e.g., MABp1) a una muestra biológica a probarse (e.g., plasma humano) bajo condiciones que permiten que el Ab se una a IL-1 α en la muestra. Debido, a que se observó que casi todas las IL-1 α en muestras de plasma humano existen ya enlazadas a Ab de anti-IL-1 α endógeno, con frecuencia puede omitirse la última etapa. La muestra con complejos IL-1 α -Ab se aplica entonces a un filtro (dispositivo centrífugo Amicon) con un límite de peso molecular de aproximadamente 100 kDa para separar los complejos IL-1 α -Ab de moléculas en la muestra menores al límite de peso molecular. En un experimento, esto dio como resultado una concentración de 50 veces. La muestra procesada (y diluciones de la misma) se agregaron entonces a los pozos en una placa de microtitulación cubierta con un Ab de captura de IgG anti-humana (2 μ g/ml de IgG anti-humano de ratón, específico de Fc código del producto Southern Biotech #9042-01). Después de permitir que el tiempo enlace los complejos IL-1 α -Ab en la muestra, los pozos se lavaron para retirar material no enlazado. Se agregó entonces un Ab secundario de IL-1 α anti-humano etiquetado a los pozos (0.2 μ g/ml de Ab de IL-1A anti-humano de ratón monoclonal conjugado con biotina, clon CRM6,

catálogo de eBioscience #13-7017). Después de dejar que el tiempo enlace la IL-1 α en los pozos, la placa se lavó y la cantidad de IL-1 α anti-humano etiquetado en cada pozo se cuantificó como una indicación de la concentración de IL-1 α en la muestra a probarse.

Debe entenderse que aunque la invención se ha descrito en conjunto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior se propone para ilustrar y no para limitar el alcance de la invención, el cual se define por el alcance de las reivindicaciones anexas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones se encuentran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un mAb de IgG1 humano purificado que se enlaza específicamente a IL-1 α humana, comprendiendo el mAb una cadena pesada unida covalentemente a una cadena ligera, en
5 donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11.

2. Un conjunto de ácidos nucleicos aislados que comprende un primer ácido nucleico que codifica para la
10 cadena pesada de un mAb de IgG1 humano que se enlaza específicamente a IL-1 α , y un segundo ácido nucleico que codifica para la cadena ligera del mAb de IgG1 humano que se enlaza específicamente a IL-1 α humana, en donde el primer ácido nucleico codifica para la secuencia de aminoácido de la
15 SEQ ID NO: 9 y el segundo ácido nucleico codifica para la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 11.

3. El conjunto de ácidos nucleicos aislados de la reivindicación 2, en donde el primer ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 10 y el segundo
20 ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 12.

4. El conjunto de ácidos nucleicos aislados de la reivindicación 2, en donde el conjunto de ácidos nucleicos aislados está comprendido dentro de al menos un vector de
25 expresión.

5. El conjunto de ácidos nucleicos aislados de la reivindicación 3, en donde el conjunto de ácidos nucleicos aislados está comprendido dentro de al menos un vector de expresión.

5 6. El conjunto de ácidos nucleicos aislados de la reivindicación 4, en donde el conjunto de ácidos nucleicos aislados está comprendido dentro de una célula huésped aislada.

7. El conjunto de ácidos nucleicos aislados de la
10 reivindicación 5, en donde la célula huésped es una célula de mamífero.

8. Un método para eliminar una célula que expresa IL-1 α humana, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto la célula con un mAb de IgG1 humano purificado que
15 se enlaza específicamente a IL-1 α humana, en donde la célula se elimina.

9. El método de la reivindicación 8, en donde el mAb de IgG1 humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y una cadena
20 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

10. Un método para inhibir la migración de una célula a través de una matriz de membrana basal, comprendiendo el método la etapa de agregar un mAb purificado

que se enlaza específicamente a IL-1 α humana en una mezcla que comprende la matriz de membrana basal y la célula.

11. El método de la reivindicación 10, en donde el mAb purificado es un mAb de IgG1 humano que comprende una
5 cadena pesada unida covalentemente a una cadena ligera.

12. El método de la reivindicación 11, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

10 13. Un método para inhibir un incremento inducido por IL-1 α en la expresión de E-selectina sobre la superficie de una célula endotelial humana, comprendiendo el método la etapa de agregar un mAb purificado que se enlaza específicamente a IL-1 α humana en una mezcla que comprende la
15 célula endotelial e IL-1 α , en donde se disminuye la cantidad de E-selectina en la superficie de la célula.

14. El método de la reivindicación 13, en donde el mAb purificado es un mAb de IgG1 humano que comprende una cadena pesada unida covalentemente a una cadena ligera.

20 15. El método de la reivindicación 14, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

16. Un método para rastrear la inflamación en un
25 sujeto humano previamente sometido a las etapas de: obtener

del sujeto una primera muestra de células mononucleares de sangre periférica en una primera ocasión; poner en contacto la primera muestra con un mAb purificado que se enlaza específicamente a IL-1 α humana; y determinar el porcentaje de
5 células en la primera muestra que se enlaza al Ab monoclonal, comprendiendo el método las etapas de:

(a) obtener del sujeto una segunda muestra de células mononucleares de sangre periférica en una segunda ocasión;

10 (b) poner en contacto la segunda muestra con el mAb purificado que se enlaza específicamente a IL-1 α humana;

(c) determinar el porcentaje de células en la segunda muestra que se enlaza al Ab monoclonal; y

(d) comparar el porcentaje de células en la
15 primera muestra que se enlaza al mAb en el porcentaje de células en la segunda muestra que se enlazan al Ab monoclonal.

17. El método de la reivindicación 16, en donde el mAb purificado es un mAb de IgG1 humano que comprende una
20 cadena pesada unida covalentemente a una cadena ligera.

18. El método de la reivindicación 17, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

25 19. Un método que comprende las etapas de:

(a) enriquecer una muestra biológica obtenida de un sujeto humano utilizando un filtro que separa las moléculas de acuerdo con el peso molecular en una primera fracción que comprende el IgG intacta en complejo con IL-1 α y una segunda
5 fracción que comprende moléculas menores a 100 Kda; y

(b) cuantificar la cantidad de IL-1 α en la primera fracción.

20. El método de la reivindicación 19, que comprende las etapas de:

10 (a) enriquecer una muestra de plasma obtenida de un sujeto humano utilizando un filtro que separa las moléculas de acuerdo al peso molecular en una primera fracción que comprende IgG intacta en complejo con IL-1 α y una segunda fracción que comprende moléculas menores a 100
15 Kda;

(b) agregar la primera fracción a un sustrato que comprende Abs de IgG anti-humano inmovilizado bajo condiciones que permiten que la IgG en la primera fracción se enlace específicamente a los Abs de IgG anti-humanos
20 inmovilizados sobre el sustrato;

(c) lavar el sustrato para retirar el material en la primera fracción que no se enlaza específicamente a los Abs de IgG anti-humanos inmovilizados;

(d) poner en contacto el sustrato lavado en la
25 etapa (c) con un Ab que se enlaza específicamente a IL-1 α

humana bajo condiciones que permiten que el Ab que se enlaza específicamente a IL-1 α humana se enlace específicamente a cualquier IL-1 α humana enlazada al sustrato;

(e) lavar el sustrato para retirar cualquier Ab
5 que se enlaza específicamente a IL-1 α humana que no se enlaza al sustrato; y

(f) cuantificar la cantidad de Ab que se enlaza específicamente a IL-1 α humana restante unida al sustrato después de la etapa (e).

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo(nosotros), abajo firmado (s)/ I (we), the undersigned:

XBIOTECH, INC.

Domiciliado (s) en / Domiciled at:

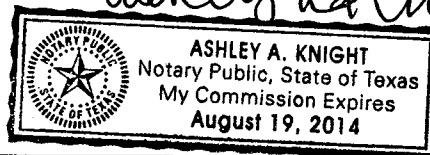
1055 West Hastings Street, Suite 300, Vancouver, BC V6E 2E9, Canada

Por el presente nombro a: Mauricio Jaramillo Campuzano T.P. 74.555 and/or Paula Samper Salazar T.P. 56.190 and / or Patricia Arrazola Bustillo and/or José Luis Suarez Parra domiciliados en Bogotá, Colombia para que en obediencia a lo dispuesto por el parágrafo 1° del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, actúen en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo(amos) a los dichos apoderados para que me (os) representen ante cualesquiera entidades o personas ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, denominaciones de origen, nombres de dominio, registros sanitarios, variedades vegetales y registros de todo tipo ante el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario); su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria, y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, acciones de infracciones, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, acciones administrativas o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos.

In due compliance with the terms of paragraph 1st of article 543 of the Comercial Code, do hereby appoint Mauricio Jaramillo Campuzano T.P. 74.555 and/or Paula Samper Salazar T.P. 56.190 and / or Patricia Arrazola Bustillo and/or José Luis Suarez Parra domiciled at Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of the court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or temporal or definitive impediment.

In addition, we grant a Power of Attorney to obtain protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, especially those administrative, administrative contentious and judicial, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, denominations of origin, domain names, public health registrations, vegetal varieties and all kind of registrations before the ICA (Instituto Colombiano Agropecuario); its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition protection, to the consumer, oppositions, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, custom procedures, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, ratify acts done by representatives without a power of attorney.



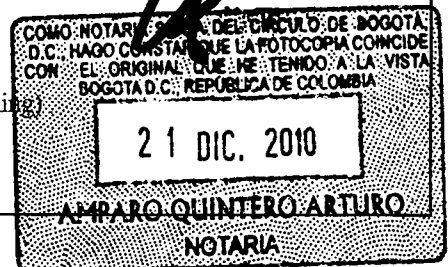
State of Texas
County of Travis
12/10/10

Dado y firmado hoy / Given and signed this Dec. 10, 2010 (Date)

En/in Austin, Tx. USA (Location signed)

Por/by John Simard (Print name of person signing)

Firma /Signature [Signature] (Signature)





The State of Texas

Secretary of State

Not for use within the United States of America.

This Apostille only certifies the signature, the capacity of the signer and the seal or stamp it bears. It does not certify the content of the document for which it was issued.

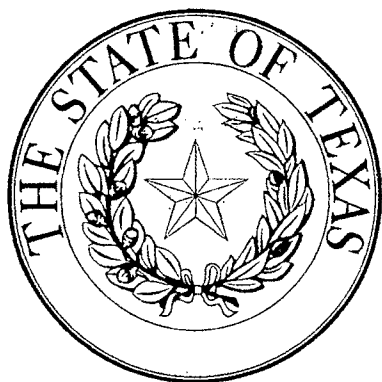
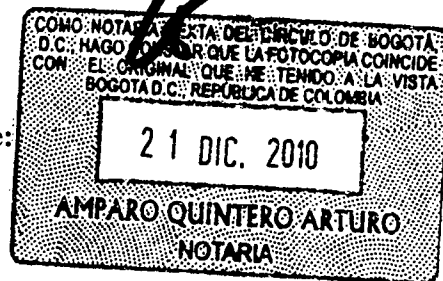
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
- This public document
2. has been signed by ASHLEY A KNIGHT
3. acting in the capacity of Notary Public, State of Texas
4. and bears the seal/stamp of ASHLEY A KNIGHT, Notary Public, State of Texas, Commission Expires: 08-19-14

CERTIFIED

5. at Austin, Texas
6. on December 13, 2010
7. by the Secretary of State of Texas
8. Certificate No. N-777712
9. Seal
10. Signature:



Hope Andrade

Hope Andrade
Secretary of State
ST/EG

57



The State of Texas

Secretary of State

Not for use within the United States of America.

This Apostille only certifies the signature, the capacity of the signer and the seal or stamp it bears. It does not certify the content of the document for which it was issued.

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
- This public document
2. has been signed by ASHLEY A KNIGHT
3. acting in the capacity of Notary Public, State of Texas
4. and bears the seal/stamp of ASHLEY A KNIGHT, Notary Public, State of Texas, Commission Expires: 08-19-14

CERTIFIED

5. at Austin, Texas
6. on December 13, 2010
7. by the Secretary of State of Texas
8. Certificate No. N-777711
9. Seal
10. Signature:



A handwritten signature in cursive script, reading "Hope Andrade".

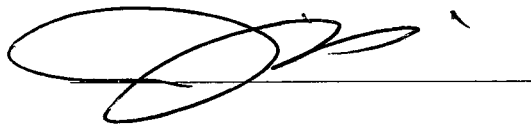
Hope Andrade
Secretary of State
ST/EG

GÓMEZ-PINZÓN ZUETA

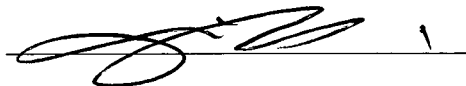
ASEMARCAS

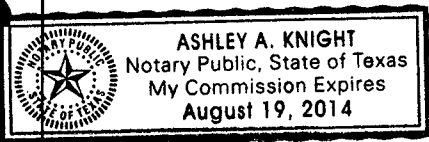
DOCUMENTO DE TRASPASO	ASSIGNMENT DOCUMENT
Yo, (nosotros), abajo firmado (s) Domiciliado (s) en Aquí llamado(s) CEDENTE, propietario (s) de los siguientes derechos de propiedad intelectual:	I (we), the undersigned: John SIMARD Domiciled at: 8201 East Riverside Drive, Bldg. # 4, Suite 100, Austin, TX 78744, USA Hereinafter the ASSIGNOR owner of the following intellectual property rights:
IL-1α ABS AND METHODS OF USE / ANTICUERPOS DE INTERLEUCINA-1 ALFA Y MÉTODOS DE USO	
declara(n) por el presente instrumento que cede(n) dicha invención a: XBIOTECH, INC. sociedad organizada y existente bajo las leyes de: CA domiciliada en 1055 West Hastings Street, Suite 300, Vancouver, BC V6E 2E9, Canada (aquí llamada la CESIONARIA). Por el presente acto, la CESIONARIA acepta dicho traspaso. Dado y firmado hoy 12/10/10 en Austin, TX USA	Declares by this document that assigns the mentioned invention to: XBIOTECH, INC. A corporation organized and existent under the laws of CA and domiciled in 1055 West Hastings Street, Suite 300, Vancouver, BC V6E 2E9, Canada Which in this document will be called the ASSIGNEE. The ASSIGNEE accepts the said assignment. Given and signed this (date) 12 / 10 / 10 In (location) Austin, TX USA

Cedente / Assignor



Cesionario / Assignee





Ashley A. Knight
State of Texas
County of Travis
12/10/10



No. 10-161740-00000-0000

Fecha: 2010-12-23 16:13:55 Dep. 2020 QIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 59

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTI.

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
 - ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
 - ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

SQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020



Doctor(a)
JARAMILLO CAMPUZANO MAURICIO
Apoderado(a) y/o Representante de
XBIOTECH, INC.

REFERENCIA	Radicación No.	10 161740
	Solicitud internacional	PCT/US2009/003355
	Fecha inicio fase nacional	30/12/2011
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	0 2245

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (E)

11 FEB. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11

