

15



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No

06-97496

54. TITULO "ANTICUERPOS ANTI-P-SELECTINA"

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL C07K 16/28

71. SOLICITANTE F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

DOMICILIO BASILEA, SUIZA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

72. BOGOTA, D.C. 27 SEP 2006

(FORMA P 10)

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-097496-00000-0000
Fec: 2006-09-27 17:08:45 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTE/MI
Eve: 379 FASENACIONALII
Act 411 PRESENTACION Folios: 256

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

13-11-06

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

Dirección: Grenzacherstrasse 124 CH-4070
Basilea, Suiza.

Nacionalidad o Domicilio: Basilea, Suiza

Lugar de Constitución: Suiza.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALICIA LLORED RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.890.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: GRAUS Yvo; HIMBER Jacques; JANSEN-MOLENAAR Miranda;
KLING Dorothee; KOPETZKY Erhard; PARREN Paul; REBERS Frank; STEINER
Beat; STERN Anne; STREIN Pamela; STUBENRAUCH Kay-Gunnar; VAN DE
WINKEL Jan y VAN VOGT Martine.

Dirección: Plenemanstraat 112, NL-6717 WG Ede; 1, Chemin du Petemil, F-
68500 Guebwiller; Vechtensteinlaan 58, NL-3801 CL Maarssen; Kirchmaettli 22/1,
79400 Kandern-Tannenkirch; Kastnerhofstrasse 21, 82377 Penzberg;
Wardorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk; Adriaan Menninckwartler 34, NL-3554
CT Utrecht; 18 Im Brunnecker, CH-4112 Baettwil; Saalangerstrasse 33, 82377
Penzberg; Oetlingerstrasse 187, CH-4057 Basel; An der Freiheit 105, 82377
Penzberg; Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zelst y Fluweelmos 6, NL-3984 KR
Houten.

Nacionalidad o Domicilio: Holanda, Francia, Suiza y Alemania.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2005/003581

Fecha: 05/04/05

Publicación Internacional No. WO 2005/100402 A1

Fecha: 27/10/05

⑥

Título (54)

"ANTICUERPOS ANTI-P-SELECTINA"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 16/28

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

EP

13/04/04

04008722.3

⑨

Comprobante de Pago No. 06 - 72.306

Fecha: 19/09/06

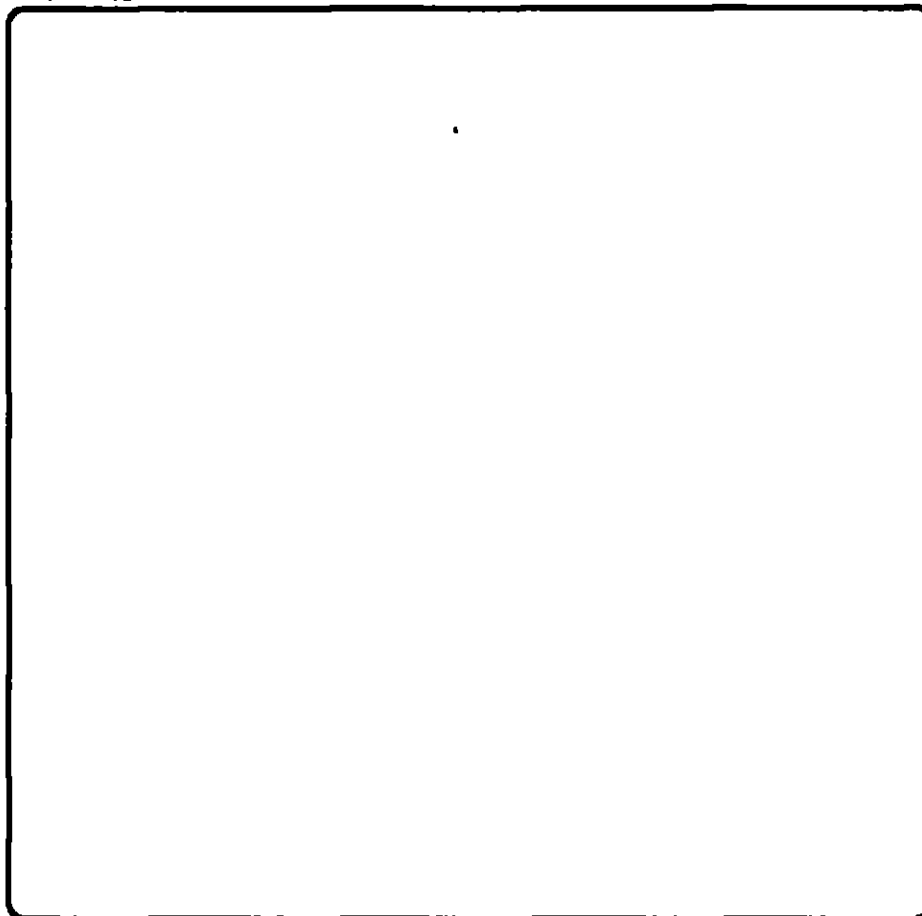
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☒ Documento de cesión de los inventores
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos, listado de secuencias)
- ☒ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☒ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ 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.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de búsqueda internacional con su traducción, publicación con su traducción, 3 declaraciones en el caso de un depósito original de material biológico con su traducción y 1 forma internacional con su traducción

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente:

NOMBRE: ALICIA LLÓREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén, T.P. 59.215

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-097496- -00000-0000
Fee: 2006-09-27 17:08:45 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEYII
Eva: 379 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 255

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 72,306
FECHA : SEPTIEMBRE 19 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	45313168	19/09/2006	4,630,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	
	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLORED**A y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



ALICIA LLORED A RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No.

de un documento escrito en Inglés, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presenta.-

Traducción de la apostilla en inglés que se encuentra a continuación de la legalización de las firmas de los señores Klausner y Strebel, representantes legales de F. Hoffmann-La Roche, que aparecen en un documento de Poder, escrito en español e inglés, conferido a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, expedida en idioma inglés por el notario Peter Kuster, bajo el No. 2004/20, el 17-08-2004, en Basilea, Suiza.

AUTENTICACION OFICIAL

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suiza

Este documento público

2. Ha sido firmado por el Lic. iur. Peter Kuster**3. Actuando en calidad de notario público****4. Lleva el sello del mencionado notario**

Certificado

5. en Basel (Basilea)

6. el 18 de agosto 2004

7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basel-Stadt**8. bajo el No 8835/13376****9. Sello**

Cancillería de Estado

de la ciudad de Basel (Basilea)

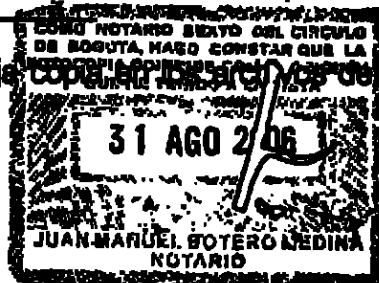
10. Firma

Fdo.: firma ilegible

Ruedi Egge

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en las oficinas de estas oficinas para su confrontación.

Bogotá, 2 de septiembre 2004



Maria Mercedes Uricoechea T.
 Traductora Juramentada
 Resolución 10607/81 Minjusticia

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET - 3 P 12:12

Luc
JEFE DE LEGALIZACIONES
GACETA D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

258651
Pang Uncochea
COTTA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIO DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
31 AGO 2006
JUAN MARCO VILLALBA MEDINA
NO A.O.

5

abajo firmados, F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza.

con domicilio en 4070 Basilea, Suiza

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 8o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; Instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resultan necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, a corporation organized and existing under the laws of Switzerland.

domiciled at 4070 Basel, Switzerland

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required and we hereby declare from now on as valid any and all acts done by our representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

31 APO 2006

JUANINA Y. LLOREDA

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 11th day of August 2006.
F. Hoffmann-La Roche AG

Fridolin Klausner
Holder of procuration

Denise Strebel
Mandatory

5

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Sulza
Basilea

(ss)

Hoy 17 de Agosto de 2004, compareció Fridolin Klausner y Denise Strehle a quien conozco y a quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es el titular del poder/mandatario de F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Sulza, domiciliada en la ciudad de Basilea, Sulza, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de Sulza; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al fin de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento es comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de Incorporación firmados en Sulza, Ciudad de Basilea, con fecha 19 Junio 1997, y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Switzerland
Basel

(ss)

On this 17th day of August, 2004, personally, Fridolin Klausner and Denise Strehle came both, Swiss citizens and Swiss residents, to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the Holder of Procuration/Mandatory of F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Switzerland, domiciled at the City of Basel, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of Switzerland; that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at Sulza, ciudad de Basel, under date of 19th day of June 1997, and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

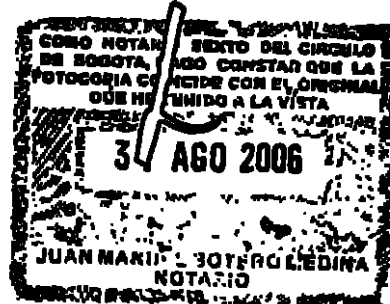
Basel, this 17-08-2004 (seventeenth day of two thousand and four)

D. P. Kuster
Notar



Allg. Prot. No. 20

Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel



OFFICIAL AUTHENTICATION
(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz/Suisse)

This official document

2. is signed by *P. Vukobratovic*

3. in his/her function as *att. notary*

4. and certified by the seal of the *Canton*

Certified. **18. Aug. 2004**

5. in Basel (Bâle)

6. on

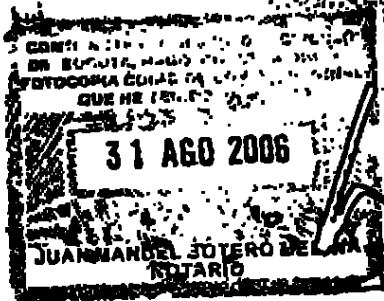
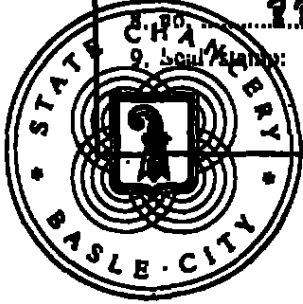
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

2235/10 276

9. Seal/Stamp:

10. Signature: *P. Vukobratovic*

Handwritten: 18.08.04



Folio 7 Extracto Publicación

Folios 8 y 9 Tapetas Américas

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2005/003581

A. CLASIFICACION DE MATERIA

IPC 7 C07K16/28 C07K16/46 A61K39/395 C12N5/12 C12N15/63

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

IPC 7 C07K A61K

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Interno, Dato WPI, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 94 25067 A (CYTEL CORPORATION; CHESNUT, ROBERT, W; POLLEY, MARGARET, J; PAULSON, J) 10 de Noviembre de 1994 (1994-11-10)	17-22
A	página 67 - página 72; ejemplos 12, 13 reivindicaciones 35, 39, 49-53 página 34, línea 11 - página 35, línea 3	1-16
A	BREKKE O H ET AL "RESIDUOS DE AMINO ACIDO ISOTIPO ESPECIFICO DE IGG HUMANA QUE AFECTA LA LISIS CELULAR Y LA FAGOCITOSIS MEDIADA POR COMPLEMENTO" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, DE, vol. 24, No. 10, 1 de Octubre de 1994 (1994-10-01) páginas 2542-2547, XP000567079 ISSN: 0014-2980 18 página 2542	1-22

- / -

☒ en el recuadro c se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'Z' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

4 de Agosto de 2005

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

19/08/2005

Nombre y dirección del correo de ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. No. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax No. (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Perez, C

8

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2005/003581

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	IDUSOGIE ESOHE B ET AL: "Mapeo del sitio de unión Clq en rituxon, un anticuerpo quimérico con una IgGL Fc humana" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINGS CO. BALTIMORE, US, vol. 164, 2000, páginas 4178-4184, XP002965858 ISSN: 0022-1767 citado en la solicitud página 4182, último paragrafo - página 4183, columna derecha, paragrafo 1	1-22
A	HEZAREH MARJAN ET AL; "Actividades de la función efectora de un panel de mutantes de un anticuerpo neutralizante contra el virus de inmunodeficiencia humana tipo I" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 75, No. 24, Diciembre 2001 (2001-12), páginas 12161-12168, XP002339184 ISSN: 0022-538X todo el documento	1-22

11

INFORMACION ADICIONAL CONTINUACION DE PCT/ISA/210

Continuación de la Casilla II.1

Aunque las reivindicaciones 12-13 y 19-20 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, se ha llevado a cabo la búsqueda y con base en los supuestos efectos del compuesto/composición-

Continuación de la Casilla II.2

Reivindicaciones Nos.: 23 totalmente y 4 parcialmente

No se llevó a cabo ninguna búsqueda con respecto a la materia objeto de la reivindicación 23, porque la materia objeto reivindicada es tan poco clara, que no es posible hacer una interpretación significativa con respecto a la novedad y el nivel inventivo (Artículo 34(4)(a)(ii) del PCT). Para cumplir con los requisitos del Artículo 6 del PCT, la reivindicación debe definir claramente por sí misma la invención para la cual se busca protección. Además, con respecto a las características técnicas de la invención, una reivindicación no debe hacer referencia a la descripción (Regla 6.2 (a) del PCT).

La presente reivindicación 4 se refiere a un anticuerpo anti P-selectina caracterizado con base en los siguientes parámetros: (1) estructuralmente, es un anticuerpo humano o humanizado, y (2) funcionalmente, debe unirse al menos 1000 veces más específicamente a P-selectina que a E- o L-selectina bajo las condiciones experimentales establecidas en la reivindicación 4. En primer lugar, esta propiedad no está claramente identificada, puesto que es imposible comparar el parámetro que el Solicitante ha decidido emplear (unirse a la P-selectina en dichas condiciones experimentales específicas) con lo que está establecido en el arte previo. Además, la reivindicación cubre todos los productos que tengan esta propiedad, mientras que la solicitud provee el soporte para y / o revela, a la luz de los Artículos 6 y 5 del PCT respectivamente, solo un número muy limitado de tales productos: el Solicitante proporciona solo unos pocos anticuerpos que, con suerte, caen dentro del alcance de dicha reivindicación (los mutantes fueron producidos para suprimir la capacidad del enlace de Clq). En este caso, es tal la magnitud en la que las reivindicaciones carecen de sustento y la solicitud de revelación, que no es posible realizar una búsqueda significativa sobre todo el alcance reivindicado. Independientemente del razonamiento anterior, las reivindicaciones también carecen de claridad (Artículo 6 del PCT).

Se hace un intento para definir el producto en referencia al resultado a ser alcanzado. Nuevamente, esta falta de claridad es tal que no es posible entregar una búsqueda significativa sobre todo el alcance reivindicado.

Por consiguiente, la búsqueda ha sido llevada a cabo para aquellas partes de las reivindicaciones que aparentaban ser claras, tener sustento y estar reveladas, a saber, los anticuerpos específicos revelados en la Tabla 1 en la página 49 que han exhibido selectividad a P-selectina versus E- y L-selectina, i.e. HuMab 002 y sus mutantes IgG1v1, IgG1v2 e IgG4v1 (datos en p. 54-56 del ejemplo).

Se dirige la atención del solicitante al hecho de que las reivindicaciones relacionadas con invenciones respecto a las cuales no se ha establecido un reporte internacional de búsqueda, no necesitan ser el tema de un examen internacional preliminar (Regla 66.1(e) del PCT). Se advierte al solicitante que la política de la EPO

INFORMACION ADICIONAL CONTINUACION DE PCT/ISA/210

cuando actúa como una Autoridad Internacional de Examen Preliminar, es normalmente no realizar un examen preliminar sobre materia para la cual no se ha realizado ninguna búsqueda. Este es el caso, independientemente de si las reivindicaciones son o no modificadas tras la recepción del reporte de búsqueda o durante cualquier procedimiento del Capítulo II. Si la solicitud entra en la fase regional ante la EPO, se le recuerda al solicitante que debe llevarse a cabo una búsqueda durante el examen ante la EPO (ver norma C-VI, 8.5 de la EPO), para superar los problemas que llevaron a la declaración del Artículo 17(2).

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONALSolicitud Internacional No.
PCT/EP2005/003581**Castilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueran inescrutables (Continuación del ítem 1 de la primera hoja)**

Este reporte de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ **Reivindicaciones Nos.:**
porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:
Aunque las reivindicaciones 12-13 y 19-20 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/ la composición.
2. ☒ **Reivindicaciones Nos.: 23 totalmente y 4 parcialmente**

porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:
ver **INFORMACION ADICIONAL** hoja PCT/ISA/210
3. ☐ **Reivindicaciones Nos.:**
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Castilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del ítem 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

ver hoja adicional

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.
3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.
☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2005/003581

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación		Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
WO 9425067	A	10-11-1994	US	5800815 A	01-09-1998
			AU	684084 B2	04-12-1997
			AU	6906394 A	21-11-1994
			CA	2162149 A1	10-11-1994
			CZ	9502872 A3	15-05-1996
			EP	0804235 A1	05-11-1997
			FI	955261 A	03-01-1996
			HU	75894 A2	28-05-1997
			JP	9500012 T	07-01-1997
			NO	954403 A	03-01-1996
			NZ	266934 A	27-07-1997
			PL	311666 A1	04-03-1996
			SK	137795 A3	06-11-1996
			WO	9425067 A1	10-11-1994
			US	6033667 A	07-03-2000
			AT	237353 T	15-05-2003
			AU	681850 B2	11-09-1997
			AU	4236093 A	29-11-1993
			CA	2135083 A1	11-11-1993
			CH	1124928 A	19-06-1996
			DE	69332881 D1	22-05-2003
			DE	69332881 T2	29-01-2004
			DK	642356 T3	04-08-2003
			EP	0642356 A1	15-03-1995
			JP	8503360 T	16-04-1996

Forma PCT/ISA/210 (anexo de familia de patentes) (Enero 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/003581

5/ 13

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K16/28 C07K16/46 A61K39/395 C12N5/12 C12N15/63

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94/25067 A (CYTEL CORPORATION; CHESNUT, ROBERT, W; POLLEY, MARGARET, J; PAULSON, J) 10 November 1994 (1994-11-10)	17-22
A	page 67 - page 72; examples 12,13 claims 35,39,49-53 page 34, line 11 - page 35, line 3	1-16
A	BREKKE O H ET AL: "HUMAN IGG ISOTYPE-SPECIFIC AMINO ACID RESIDUES AFFECTING COMPLEMENT-MEDIATED CELL LYSIS AND PHAGOCYTOSIS" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, DE, vol. 24, no. 10, 1 October 1994 (1994-10-01), pages 2542-2547, XP000567079 ISSN: 0014-2980 page 2542	1-22
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the International filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

4 August 2005

Date of mailing of the International search report

19/08/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Perez, C

16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/003581

14

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	IDUSOGIE ESOHE E ET AL: "Mapping of the Clq binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 164, 2000, pages 4178-4184, XP002965858 ISSN: 0022-1767 cited in the application page 4182, last paragraph - page 4183, right-hand column, paragraph 1 -----	1-22
A	HEZAREH MARJAN ET AL: "Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 75, no. 24, December 2001 (2001-12), pages 12161-12168, XP002339184 ISSN: 0022-538X the whole document -----	1-22

F

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 12-13 and 19-20 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 23 completely and 4 partially

No search is performed on the subject-matter of claim 23, because the claimed subject-matter is so unclear that no meaningful interpretation with respect to novelty and inventive step can be made (Article 34(4)(a)(ii) PCT). To meet the requirements of Article 6 PCT, the claim itself should clearly define the invention for which protection is sought. Moreover, a claim must not, in respect of the technical features of the invention, rely on references to the description (Rule 6.2 (a) PCT).

Present claim 4 relates to an anti P-selectin antibody characterized by reference to the following parameter: (1) structurally, it is a human or humanized antibody, and (2) functionally, it should bind at least 1000 fold more specifically to P-selectin than to E- or L-selectin in the experimental conditions outlined in claim 4. First of all, this property is not clearly identified, because it is impossible to compare the parameter the Applicant has chosen to employ (binding to P-selectin in said specific experimental conditions) with what is set out in the prior art. Moreover the claim covers all products having this property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products: the Applicant has provided only a few antibodies falling, by chance, under the scope of said claim (the mutants were produced to suppress C1q binding capacity). In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely the specific antibodies disclosed in Table 1 on page 49 which are shown to have selectivity for the P-selectin versus E- and L-selectin, i.e. HuMab 002 and its mutants IgG1v1, IgG1v2 and IgG4v1 (data on p.54-56 of the example).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/003581

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 12-13 and 19-20 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 23 completely and 4 partially
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/003581

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9425067	A	10-11-1994	US 5800815 A	01-09-1998
			AU 684084 B2	04-12-1997
			AU 6906394 A	21-11-1994
			CA 2162149 A1	10-11-1994
			CZ 9502872 A3	15-05-1996
			EP 0804235 A1	05-11-1997
			FI 955261 A	03-01-1996
			HU 75894 A2	28-05-1997
			JP 9500012 T	07-01-1997
			NO 954403 A	03-01-1996
			NZ 266934 A	27-07-1997
			PL 311666 A1	04-03-1996
			SK 137795 A3	06-11-1996
			WO 9425067 A1	10-11-1994
			US 6033667 A	07-03-2000
			AT 237353 T	15-05-2003
			AU 681850 B2	11-09-1997
			AU 4236093 A	29-11-1993
			CA 2135083 A1	11-11-1993
			CN 1124928 A	19-06-1996
			DE 69332881 D1	22-05-2003
			DE 69332881 T2	29-01-2004
			DK 642356 T3	04-08-2003
			EP 0642356 A1	15-03-1995
			JP 8503360 T	16-04-1996

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación

27 de Octubre de 2005 (27.10.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 2005/100402 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C07K 16/28,
16/46, A61K 39/395, C12N 5/12, 15/63

(74) Agente: HEIROTH, Ulrike; Grenzacherstrasse 124,
CH-4070 Basel (CH).

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP2005/003581

(22) Fecha de Registro Internacional: 5 de Abril de 2005
(05.04.2005)

(25) Idioma de registro: INGLES

(26) Idioma de Publicación: INGLES

(30) Información de Prioridad:
04008722.3 13 de Abril de 2004 (13.04.2004) BP

(71) Solicitante: (para todos los estados designados excepto
Estado Unidos): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
[CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Inventores: e

(75) Inventores/solicitantes (para los EU únicamente): GRAUS,
Yvo [NL/NL]; Werdorperwaard, 3, NL-3984 PR Odijk (NL).
HIMBER, Jacques [FR/FR]; 1, Chemin du Pernit, F-68500
Quebwiller (FR). JANSEN-MOLENAAR, Miranda
[NL/NL]; Vechtensteinaan 56, NL-3601 CL Maarssen (NL).
KLING, Dorothee [DE/DE]; Kirchmaettle 22/1, 79400
Kandern-Tannenkirch (DE). KOPETZKY, Erhard [DE/DE];
Kastnerhofstrasse 21, 82377 Penzberg (DE). PARREN, Paul
[NL/NL]; Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk (NL).
REBERS, Frank [NL/NL]; Adriaan Menninckwartier 34,
NL-3554 CT Utrecht (NL). STEINER, Beat [CH/CH]; 18 Im
Brunnacker, CH-4112 Bachtwil (CH). STERN, Anne [DE/DE];
Saalangerstrasse 33, 82377 Penzberg (DE). STREIN, Pamela
[DE/DE]; Balthasar-Graf-Strasse 5, 82061 Neuried (DE).
STUBENRAUCH, Kay-Gunnar [DE/DE]; An der Freiheit
105, 82377 Penzberg (DE). VAN DE WINKEL, Jan
[NL/NL]; Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist (NL).
VAN VUGT, Martine [NL/NL]; Fluweelmos 6, NL-3994 KR
Houten (NL).

(81) Estados Designados (salvo que de otro modo indicado
para cada clase de la protección nacional disponible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (salvo que de otro modo indicado
para cada clase de la protección regional disponible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM) europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR) OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Publicado:

- con reporte de búsqueda internacional
- antes de la expiración del límite de tiempo para
modificar las reivindicaciones y ser publicada de nuevo
en el caso de recibo de modificaciones
- con una(s) indicación(es) relacionadas con material
biológico suministrado bajo la Regla 13bis separado de la
descripción

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas,
refiérase a "Las Notas Gulas sobre Códigos y Abreviaturas"
que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la
Gaceta PCT.

(54) Título: "ANTICUERPOS ANTI-P-SELECTINA"

(57) Resumen: Esta invención se refiere a anticuerpos anti-P-selectina y, en particular, a anticuerpos anti-P-selectina y
variantes de los mismos que contienen una parte Fc derivada de un origen humano y no se fijan sobre el factor de
complemento C1q. Estos anticuerpos tienen propiedades nuevas y susceptibles de invención, que producen un beneficio a
un paciente que sufra isquemia crítica de extremidades o enfermedad oclusiva de arterias periféricas (CLI/PAOD).

9,20

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



THE INTERNATIONAL PATENT COOPERATION TREATY (PCT) IS A TREATY WHICH PROVIDES FOR THE FILING OF AN INTERNATIONAL APPLICATION FOR A PATENT WHICH WILL BE TREATED AS A NATIONAL APPLICATION IN EACH OF THE STATES DESIGNATED BY THE APPLICANT.

(43) International Publication Date
27 October 2005 (27.10.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/100402 A1

(51) International Patent Classification⁷: C07K 16/28,
16/46, A61K 39/395, C12N 5/12, 15/63

VUGT, Martine [NL/NL]; Fluwelinos 6, NL-3994 KR
Houten (NL).

(21) International Application Number:
PCT/EP2005/003581

(74) Agent: HEIROTH, Ulrike; Granzacherstrasse 124,
CH-4070 Basel (CH).

(22) International Filing Date: 5 April 2005 (05.04.2005)

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM,
PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
040087223 13 April 2004 (13.04.2004) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): FHOFF-
MANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Granzacherstrasse
124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Inventors and

(75) Inventor/Applicants (for US only): GRAUS, Yvo
[NL/NL]; Werdorperwaard, 3, NL-3984 PR Odijk (NL).
HIMBER, Jacques [FR/FR]; 1, Chemin du Petenit,
F-68500 Guebwiller (FR). JANSEN-MOLENAAR,
Miranda [NL/NL]; Vechtensteinlaan 56, NL-3601 CL
Maarsse (NL). KLING, Dorothea [DE/DE]; Kirchmatt-
le 23/1, 79400 Kandern-Tannenkirch (DE). KOPETZKY,
Erlard [DE/DE]; Kasnerhofstrasse 21, 82377 Penzberg
(DE). PARREN, Paul [NL/NL]; Werdorperwaard 17,
NL-3984 PR Odijk (NL). REBERS, Frank [NL/NL];
Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT Utrecht (NL).
STEINER, Beat [CH/CH]; 18 Im Brunacker, CH-4112
Baerwil (CH). STERN, Anne [DE/DE]; Seelangerstrasse
33, 82377 Penzberg (DE). STREIN, Pamela [DE/DE];
Balthasar-Graf-Strasse 5, 82061 Neuried (DE). STUBEN-
RAUCH, Kay-Gunnar [DE/DE]; An der Freiheit 105,
82377 Penzberg (DE). VAN DE WINKEL, Jan [NL/NL];
Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist (NL). VAN

(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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, 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
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments
- with (an) indication(s) in relation to deposited biological
material furnished under Rule 13bis separately from the
description

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ANTI-P-SELECTIN ANTIBODIES

(57) Abstract: This invention relates to anti-P-selectin antibodies and, in particular, to anti-P-selectin antibodies and variants thereof
that contain an Fc part derived from human origin and do not bind complement factor C1q. These antibodies have new and inventive
properties causing a benefit for a patient suffering from critical limb ischemia or peripheral arterial occlusive disease (CLI/PAOD).

WO 2005/100402 A1

22

21

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS
PROPÓSITOS DEL PROCESO DE PATENTE**

DECLARACIÓN EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
De acuerdo con la Regla 6.1

Para
DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON
MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH
Mascheroder Weg 1b
D-38124 Braunschweig
ALEMANIA

Para ser llenado por la Autoridad Depositaria
Número de accesión DSMZ:
Fecha de recepción del cultivo:

CULTIVOS DE CÉLULAS ANIMALES Y HUMANAS

POR MEDIO DE LA PRESENTE, EL ABAJO FIRMANTE DEPOSITA BAJO EL TRATADO DE BUDAPEST EL CULTIVO CELULAR IDENTIFICADO A CONTINUACIÓN Y ACEPTA NO RETIRAR EL DEPÓSITO POR EL PERIODO ESPECIFICADO EN LA REGLA 9.1¹. EL DSMZ NO PROPAGA CULTIVOS CELULARES.

I. IDENTIFICACIÓN DEL CULTIVO CELULAR	
Referencia de identificación ² , nombre de la línea celular: hu-Mab<P-Selektin>LC1004-001	
Especies de origen ³ :	Ratón transgénico KM (Medarex, CA, USA)
Híbrido:	SP2/0-Ag14 (ATCC: CRL-1581)
II. CONDICIONES PARA EL CULTIVO	
Por favor indique todas las condiciones necesarias incluyendo tipo y % de suero, temperatura, fase gaseosa, cociente de división óptimo, etc.:	
500 mL (Medio Dubelco Modificado por Iscove) + 15 mL de FCS + 5 mL de Piruvato de Sodio (MEM 100mM) + 5 mL de 2-mercaptoetanol (50 mM) o 1000 mL de HyQ ADCF-Mab + 50 mL de FCS; Inicie el cultivo con 1 x 10 ⁶ células y haga pases cada 3 ó 4 días. Tiempo de duplicación de la población aproximadamente 30 horas; densidad máxima: 2 x 10 ⁶ células / mL; 5% CO ₂ , 37°C, células en suspensión (u ocasionalmente en grupos) algunas veces de poca adherencia.	
¿Ha sido usado hasta ahora cualquier suplemento adicional (Incluyendo antibióticos)?	
En caso afirmativo, dé las concentraciones	
1% Factor de clonación del Híbrido	
5 mL de Penicilina-Streptomicina (5000U/mL Strep, 5000 IU / mL Pen)	

¹ Esta forma puede también ser usada si el abajo firmante convierte en un depósito bajo el Tratado de Budapest, un depósito de un organismo que éste o su predecesor en título haya depositado, fuera del Tratado de Budapest, con la misma institución depositaria anterior (Regla 6.4 (d)) o tras la adquisición del estatus de autoridad depositaria Internacional de esa institución.

² Número, símbolos, etc. Dados al organismo por el depositante.

³ Se recomienda que se indique la designación taxonómica y/o la descripción científica del organismo (ver VII).

⁴ Marque con una X si se da información adicional en una hoja anexa.

24

III. CONDICIONES PARA EL ALMACENAMIENTO A LARGO PLAZO					() ⁴
Composición del medio:		90% FCS y 10% DMSO			
Concentración de las células:		aproximadamente 5x10 ⁶ células / ampolla			
Otras recomendaciones:					
IV. CONTAMINACIÓN CONOCIDA Y PATOGENICIDAD					() ⁴
Mycoplasma		SI ()	No (X)	Desconocido ()	
Virus:	Herpes	SI ()	No ()	Desconocido (X)	
	Hepatitis B	SI ()	No ()	Desconocido (X)	
	Hepatitis C	SI ()	No ()	Desconocido (X)	
	VIH	SI ()	No ()	Desconocido (X)	
Otros contaminantes:		SI ()	No ()	Desconocido (X)	
En caso afirmativo, por favor especifique:					
¿El material es patógeno al hombre o a animales?					
		SI ()	No (X)	Desconocido ()	
En caso afirmativo, por favor especifique:					
		Patogénico ()		Alergénico ()	
		Toxigénico ()		Tumorigénico ()	
LA LÍNEA CELULAR DEBE SER MANEJADA BAJO EL SIGUIENTE NIVEL DE CONTENCIÓN DEL LABORATORIO⁵					
		L1 (X)		L2 ()	

⁴ Marque con una X en caso de que se dé información adicional en una hoja anexa

⁵ El DSMZ solo acepta organismos para depósito que pertenezcan al grupo de riesgo 1 ó 2, de acuerdo con "Sichere Biotechnologie: Einstufung von biologischen Agenzien: Viren" (B 004) de "Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie" y puedan ser manejados bajo el nivel de contención L1 o L2 del laboratorio, de acuerdo con "Gesetz zur Regelung der Gentechnik" (BGBl. I, pp. 2087-2083 de 21.12.1993), último cambio en 18.08.2002 (BGBl. I, pp. 3220-3244) y de acuerdo con la Directiva EEC 2000/54/EC de la Protección de los Trabajadores contra los Riesgos Relacionados con la Exposición a Agentes Biológicos en el Trabajo (OJ No. L262, pp. 21-45 de 18.09.2000)

B

V. SI EL CULTIVO CELULAR ES MANIPULADO GENÉTICAMENTE			()^a
Dar respuestas completas			
1. DATOS RESPECTO AL ORGANISMO HOSPEDERO			
Designación:	Ratón		
Grupo de Riesgo	(X) gr. De riesgo 1	() gr. De riesgo 2	
Sensibilidades:			
Resistencias:			
Propiedades especiales:			
2. DATOS RESPECTO AL ORGANISMO DONOR			
Designación:			
Grupo de peligro	(X) gr. de pel. 1	() gr. de pel. 2	() gr. de pel 3
Descripción del fragmento de ADN clonado:	2 fragmentos cromosomales humanos (FChs) codificantes de <i>loci</i> de IgG humano		
Información clonada:			
Tamaño del ADN clonado (en pb):	15Mb de Chr. 14 con <i>loci</i> de IgH, 5-20 Mb de Chr. 2 con <i>loci</i> de Igk.		
	() genoma completo	() ADNc	
	(X) subgenómico	() sintético	
	() subgénico		
Riesgo potencial del ADN:	() patogénico	() tumorigénico	
	() toxigénico	() alérgico	
	(X) no riesgo potencial		
3. DATOS RESPECTO AL VECTOR			
Designación:	Fragmento de cromosoma humano (FChs) marcado con pSTneoB		
Derivado de:	Cromosoma humano		
Especificidad hospedero:	Ratón		
Resistencias:	G418		
Tamaño del plásmido/virus en pb:	sin inserto: no aplica	con inserto: 5-20 Mb	
Promotores:	Promotores de IgG humana		
Marcos de lectura adicionales:	17 segmentos de gen humano V κ , 5 J κ y C κ ; <i>locus</i> de cadena pesada totalmente humano		
Posibilidad de infección:	() si	(X) no	
Plásmido movilizable	() si	(X) no	
Sistema de transferencia propio	() si	(X) no	
Transferencia por virus endógenos colaboradores	() si	(X) no	
4. DATOS RESPECTO AL ORGANISMO GENÉTICAMENTE MANIPULADO^b			
Propiedades especiales:	Expresión de la IgG humana funcional <P-Selektin> (e.g. producción de....; uso como....-vector, etc.)		
DNA foráneo	(X) episomal	() cromosómicamente integrado	

Riesgo potencial:	() patogénico () tumorigénico () toxigénico () alergénico
(X) no riesgo potencial	
Clasificación de acuerdo con	por favor indique el motivo: _____
Legislación alemana () S1 () S2 o legislación UE () clase 1 () clase 2	
De acuerdo con las regulaciones del GentG6, el DSMZ solo puede aceptar para el depósito, organismos genéticamente manipulados, potencialmente patogénicos, cuando una copia del permiso expedido por la autoridad competente (o por una comisión nacional de seguridad biológica equivalente) para trabajar en los microorganismos, acompaña la forma de depósito.	

⁴ Marque con una X si se da información adicional en una hoja anexa

⁵ el DSMZ solo acepta para el depósito organismos que pertenezcan al grupo de riesgo 1 ó 2 de acuerdo con "Sichere Biotechnologie: Einstufung von biologischen Agenzien: Viren" (B 004) de "Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie" y puedan ser manejados bajo el nivel de contención S1 o S2 del laboratorio, de acuerdo con "Gesetz zur Regelung der Gentechnik" (BGBI. I, pp. 2067-2083 de 21.12.1993), o clase 1 ó 2*.

⁶ GenTG= Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Ley alemana para la regulación de la Ingeniería genética)

* De acuerdo con la directiva del EEC 2000/54/EC de la Protección de los Trabajadores contra los Riesgos Relacionados con la Exposición a Agentes Biológicos en el Trabajo (OJ No. L262, pp. 21-45 de 18.09.2000)

Forma DSMZ-BP/1- Cultivo Celular Animal y Humano (tercera página) 06/2003

VI. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA ⁷		() ⁸
hu-Mab<P-Selectin>LC1004-001		
VII. DATOS ADICIONALES ⁹		() ⁹
Tomizuka et al. (1997) Nature Genet. 16, 133-143 Tomizuka et al. (2000) PNAS 97, 722-727		
VII. DESTINO DEL CULTIVO TRAS LA DURACIÓN PRESCRITA DE ALMACENAMIENTO ¹⁰		
a) El cultivo será transferido a la colección disponible al público del DSMZ	() si	() no
b) El cultivo será devuelto al depositante previo pago de honorarios	() si	() no
c) El cultivo será destruido por el DSMZ	(X) si	() no
IX. DEPOSITANTE ¹¹		
Nombre:	Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Strasse 116 68305 Mannheim	Firma: (ilegible) (ilegible) ppa. I. V. Dr. Schreiner K.-H. Betke
Dirección:	para correspondencia Roche Diagnostics GmbH	Fecha: Marzo 25, 2004

Nonnenwald 2		
82377 Penzberg		
Teléfono:	08858-60-3450	
Fax:	08858-60-3451	
E-Mail:	<u>karl-helz.betke@roche.com</u>	
Depositantes adicionales:	F. Hoffmann – La Roche AG	Hoffmann – La Roche Inc.
	124 Grenzacherstrasse	340 Kingsland Street
	CH-4070 Basel	Nutley, NJ 07110-1199
	Suiza	EUA

- ⁶ Marque con una X si se da información adicional en una hoja anexa
- ⁷ Se recomienda indicar la descripción científica y / o designación taxonómica propuesta del microorganismo (ver I).
- ⁸ Si se desea, el nombre y la dirección del inventor pueden escribirse acá
- ⁹ Marque con una X si se da información adicional en una hoja anexa (diferente a la que se refirió en la nota 5 de pie de pagina), tal como la fuente del microorganismo, el(los) nombre(s) y dirección(es) de cualquier otra institución depositaria en la cual se haya depositado el microorganismo, o el criterio usado al escribir la designación taxonómica propuesta (El suministro de esta información es opcional).
- ¹⁰ El cultivo se almacenará por un periodo de al menos 5 años tras la solicitud más reciente de una muestra del organismo depositado y, en cualquier caso, por lo menos 30 años después de la fecha de depósito (Regla 9.1) La regulación anterior es válida hasta que haya un cambio en la jurisdicción.
- ¹¹ Esta forma de depósito es el contrato entre el depositante y el depositario. Por lo tanto, debe ser firmada por el depositante. En el caso de una entidad legal, se requiere la firma de dos representantes, designados por dicha entidad de manera oficial. Donde se requiera la firma en nombre de una entidad legal, el (los) nombre(s) escrito(s) de la(s) persona(s) natural(es) que firma(n) en nombre de la entidad legal debe(n) acompañar la(s) firma(s). A menos que se especifique lo contrario, el abajo firmante es el correspondiente del DSMZ.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



STATEMENT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
pursuant to Rule 6.1

To
DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON
MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH
Mascheroder Weg 1b
D-38124 Braunschweig
GERMANY

To be filled in by the Depository Authority

DSMZ-Accession number :

Date culture received:

ANIMAL AND HUMAN CELL CULTURES

THE UNDERSIGNED HEREBY DEPOSITS UNDER THE BUDAPEST TREATY THE CELL CULTURE IDENTIFIED HEREUNDER AND UNDERTAKES NOT TO WITHDRAW THE DEPOSIT FOR THE PERIOD SPECIFIED IN RULE 9.1¹. THE DSMZ DOES NOT PROPAGATE CELL CULTURES.

I. IDENTIFICATION OF THE CELL CULTURE	
Identification reference ² , name of cell line:	<u>hu-Mab<P-Selektin>LC 1004-001</u>
Species of origin ³ :	<u>KM transgenic mouse (Medarex, CA, USA)</u>
Hybridoma:	<u>SP2/0-Ag14 (ATCC: CRL-1581)</u>
II. CONDITIONS FOR CULTIVATION ()	
Please indicate all necessary conditions including type and % of serum, temperature, gaseous phase, optimal split ratio, etc.:	
<u>500 ml (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) + 15 ml FCS + 5 ml Sodium Pyruvate (MEM 100mM)</u>	
<u>+ 5 ml 2-Mercaptoethanol (50mM) or 1000 ml HyQ ADCF-Mab + 50 ml FCS; Start Culture with 1x10⁵ cells</u>	
<u>and split every 3 or 4 days. Doubling time approximately 30 hours; maximal density: 2x10⁶ cells/ml;</u>	
<u>5% CO₂, 37°C; Cells in suspension (or occasionally in clumps) sometime low adherent.</u>	
Have, until now, any additional supplements (including antibiotics) been used? If so, give concentrations:	
<u>1% Hybridoma Cloning Factor</u>	
<u>5 ml Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml Strep, 5000IU/ml Pen)</u>	

- ¹ This form may also be used if the undersigned converts into a deposit under the Budapest Treaty the deposit of an organism that he or his predecessor in title has already deposited, outside the Budapest Treaty, with the same depository institution either before (Rule 6.4(d)) or after the acquisition by that institution of the status of international depository authority.
- ² Number, symbols etc., given to the organism by the depositor.
- ³ It is strongly recommended that the taxonomic designation and/or scientific description (see under VII.) of the organism be indicated.
- ⁴ Mark with a cross if additional information is given on an attached sheet.

27

III. CONDITIONS FOR LONG TERM STORAGE ()			
Composition of medium: <u>90% FCS and 10% DMSO</u>			
Cell concentration: <u>approximately 5x10⁶ cells/ampoule</u>			
Other recommendations: _____			
IV. KNOWN CONTAMINATION AND PATHOGENICITY ()			
Mycoplasma:	Yes ()	No (x)	Unknown ()
Viruses:	Yes ()	No ()	Unknown (x)
Herpes	Yes ()	No ()	Unknown (x)
Hepatitis B	Yes ()	No ()	Unknown (x)
Hepatitis C	Yes ()	No ()	Unknown (x)
HIV	Yes ()	No ()	Unknown (x)
Other contaminants:	Yes ()	No ()	Unknown (x)
If yes, please specify: _____			
Is the material pathogenic to man or animals:	Yes ()	No (x)	Unknown ()
If yes, please specify:			
	pathogenic ()	allergenic ()	
	toxigenic ()	immunogenic ()	
THE CELL LINE HAS TO BE HANDLED UNDER THE FOLLOWING LABORATORY CONTAINMENT			
LEVEL:			
	L1 (x)	L2 ()	

⁴ Mark with a cross if additional information is given on an attached sheet.
⁵ The DSMZ only accepts for deposit organisms which belong to risk group 1 or 2, according to 'Sichere Biotechnologie: Einstufung von biologischen Agenten: Virus' (B 004) of the 'Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie' and can be handled under the laboratory containment level L1 or L2 according to "Gesetz zur Regelung der Gentechnik" (BGBI. I, pp. 2067-2083 of 21.12.1993), last changed on 16.01.2002 (BGBI. I, pp. 3220-3244) and according to EEC Directive 2000/54/EC on the Protection of Workers from Risks Related to Exposure to Biological Agents at Work (OJ No. L262, pp. 21-45 of 18.09.2000).

V. IF THE CELL CULTURE IS GENETICALLY MANIPULATED

Complete answers to be given!

1. DATA CONCERNING THE HOST ORGANISM

designation: mouse

risk group: ☒ risk gr. 1 ☐ risk gr. 2

sensitivities:

resistances:

special properties:

2. DATA CONCERNING THE DONOR ORGANISM

designation:

hazard group: ☒ haz. gr. 1 ☐ haz. gr. 2 ☐ haz. gr. 3

description of the cloned DNA fragment: 2 human chromosome fragments (hCFs) encoding human IgG loci
cloned information:

size of the cloned DNA (in bp): 15 Mb of Chr. 14 with IgH loci, 5-20 Mb of Chr.2 with Igk loci

☐ complete genome

☐ cDNA

☒ subgenomic

☐ synthetic

☐ subgenic

potential risk of the DNA:

☐ pathogenic

☐ tumorigenic

☐ toxicogenic

☐ allergenic

☒ no potential risk

3. DATA CONCERNING THE VECTOR

designation: human chromosome fragment (hCFs) tagged with pSTneoB

derivative of: human chromosome

host specificity: mouse

resistances: G418

plasmid/virus size in bp: without insert not applicable with insert 5-20 Mb

promoters: human IgG promoters

additional reading frames: 17 human V κ appa, 5 J κ appa and C κ appa gene segments; entire human heavy chain locus

own infectivity:

☐ yes

☒ no

mobile/plasmid:

☐ yes

☒ no

own transfer system:

☐ yes

☒ no

transfer by endogenous helper viruses:

☐ yes

☒ no

4. DATA CONCERNING THE GENETICALLY MANIPULATED ORGANISM¹

special properties: expression of functional human IgG1 <P-Selektin>

(e.g. production of ...; use as ...-vector etc.)

foreign DNA:

☒ episomal

☐ chromosomally integrated

potential risk:

☐ pathogenic

☐ tumorigenic

☐ toxicogenic

☐ allergenic

☒ no potential risk

classification according to

please indicate why:

German legislation ☐ S1 ☐ S2 or EU legislation ☐ class 1 ☐ class 2

According to the regulations of the GenTG6 the DSMZ can only accept genetically manipulated, potentially pathogenic organisms for deposition when a copy of the permit issued by the competent authority (or by an equivalent national biological safety commission) for work on the organisms accompanies the deposition form.

¹ Mark with a cross if additional information is given on an attached sheet.

² The DSMZ only accepts for deposit organisms which belong to risk group 1 or 2, according to 'Sichere Biotechnologie: Einweisung von biologischen Agenten: Viren' (B 004) of the 'Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie' and can be handled under the laboratory containment level S1 or S2 according to "Gesetz zur Regelung der Gentechnik" (BGBl. I, pp. 2067-2083 of 21.12.1993) or Class 1 or 2 *.

³ GenTG = Gesetz zur Regelung der Gentechnik (German law for the regulation of genetic engineering)

⁴ according to EEC Directive 2000/54/EC on the Protection of Workers from Risks Related to Exposure to Biological Agents at Work (OJ No. L262, pp. 21-45 of 18.09.2000)

21

VI. SCIENTIFIC DESCRIPTION⁶ ()⁶	
<u>hu-Mab<P-Selectin>LC1004-001</u>	
VII. ADDITIONAL DATA⁷ ()⁷	
<u>Tomizuka et al. (1997) Nature Genet. 16, 133-143</u>	
<u>Tomizuka et al. (2000) PNAS 97, 722-727</u>	
VIII. FATE OF THE CULTURE AFTER THE PRESCRIBED DURATION OF STORAGE⁸	
a) The culture is to be transferred into the publicly available collection of the DSMZ	() yes () no
b) The culture is to be handed back to the depositor against a fee	() yes () no
c) The culture is to be destroyed by the DSMZ	(x) yes () no
IX. DEPOSITOR¹¹	
Name: <u>Roche Diagnostics GmbH</u> <u>Sandhofer Strasse 116</u> <u>68305 Mannheim</u>	Signature:  ppa. <u>Dr. Schreiner</u> i. V. <u>K.-H. Betke</u>
Address: <u>for correspondence</u> <u>Roche Diagnostics GmbH</u> <u>Nonnenwald 2</u> <u>82377 Penzberg</u>	Date: <u>25. March 2004</u>
Phone: <u>08856-60-3450</u>	
Fax: <u>08856-60-3451</u>	
E-Mail: <u>karl-heinz.betke@roche.com</u>	
Further depositors: <u>F. Hoffmann-La Roche AG</u> <u>Hoffmann-La Roche Inc.</u> <u>124 Grenzacherstrasse</u> <u>340 Kingsland Street</u> <u>CH-4070 Basel</u> <u>Nutley, NJ 07110-1199</u> <u>Switzerland</u> <u>USA</u>	

- ⁶ Mark with a cross if additional information is given on an attached sheet.
- ⁷ It is strongly recommended to indicate the scientific description and/or proposed taxonomic designation (see I.) of the microorganism.
- ⁸ If desired name and address of the inventor(s) might be recorded here.
- ⁹ Mark with a cross if additional information (other than the information referred to in footnote 5 is given on an attached sheet, such as the source of the microorganism, the name(s) and the address(es) of any other depository institution(s) with which the microorganism has been deposited, or the criterion used when drafting the proposed taxonomic designation (The supplying of such information is optional).
- ¹⁰ The culture is to be stored for a period of at least five years after the most recent request for the furnishing of a sample of the deposited organism and, in any case, for at least 30 years after the date of deposit (Rule 9.1). The above regulation is valid till there will be binding jurisdiction.
- ¹¹ This Deposition Form is the contract between the depository and the depositor. Therefore it must be signed by the depositor. In case of a legal entity the signatures of two representatives, officially nominated by this entity, are required. Where the signature is required on behalf of a legal entity, the typewritten name(s) of the natural person(s) signing on behalf of the legal entity should accompany the signature(s). Unless otherwise agreed, the undersigned is the correspondent of the DSMZ.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS
PROPÓSITOS DEL PROCESO DE PATENTE

DECLARACIÓN EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL

De acuerdo con la Regla 6.1

Para

DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON
MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH
Mascheroder Weg 1b
D-38124 Braunschweig
ALEMANIA

Para ser llenado por la Autoridad Depositaria

Número de accesoión DSMZ:

Fecha de recepción del cultivo:

CULTIVOS DE CÉLULAS ANIMALES Y HUMANAS

POR MEDIO DE LA PRESENTE, EL ABAJO FIRMANTE DEPOSITA BAJO EL TRATADO DE BUDAPEST EL CULTIVO CELULAR IDENTIFICADO A CONTINUACIÓN Y ACEPTA NO RETIRAR EL DEPÓSITO POR EL PERIODO ESPECIFICADO EN LA REGLA 9.1¹. EL DSMZ NO PROPAGA CULTIVOS CELULARES.

I. IDENTIFICACIÓN DEL CULTIVO CELULAR	
Referencia de identificación ² , nombre de la línea celular: hu-Mab<P-Selektin>LC1004-002	
Especies de origen ³ :	Ratón transgénico KM (Medarex, CA, USA)
Hibridoma:	SP2/0-Ag14 (ATCC: CRL-1581)
II. CONDICIONES PARA EL CULTIVO	
Por favor Indique todas las condiciones necesarias incluyendo tipo y % de suero, temperatura, fase gaseosa, cociente de división óptimo, etc.:	
500 mL (Medio Dubelco Modificado por Iscove) + 15 mL de FCS + 5 mL de Piruvato de Sodio (MEM 100mM) + 5 mL de 2-mercaptoetanol (50 mM) o 1000 mL de HyQ ADCF-Mab + 50 mL de FCS; Inicie el cultivo con 1×10^5 células y haga pases cada 3 ó 4 días. Tiempo de duplicación de la población aproximadamente 30 horas; densidad máxima: 2×10^6 células / mL; 5% CO ₂ , 37°C, células en suspensión (u ocasionalmente en grupos) algunas veces de poca adherencia.	
¿Ha sido usado hasta ahora cualquier suplemento adicional (Incluyendo antibióticos)?	
En caso afirmativo, dé las concentraciones	
1% Factor de clonación del Hibridoma	
5 mL de Penicilina-Streptomicina (5000U/mL Strep, 5000 IU / mL Pen)	

¹ Esta forma puede también ser usada si el abajo firmante convierte en un depósito bajo el Tratado de Budapest, un depósito de un organismo que éste o su predecesor en título haya depositado, fuera del Tratado de Budapest, con la misma institución depositaria anterior (Regla 6.4 (d)) o tras la adquisición de esa institución del estatus de autoridad depositaria internacional.

² Número, símbolos, etc. Dados al organismo por el depositante.

³ Se recomienda que se indique la designación taxonómica y/o la descripción científica del organismo (ver VII)

⁴ Marque con una X si se da información adicional en una hoja anexa.

III. CONDICIONES PARA EL ALMACENAMIENTO A LARGO PLAZO				
Composición del medio:		90% FCS y 10% DMSO		
Concentración de las células:		aproximadamente 5x10 ⁶ células / ampolla		
Otras recomendaciones:				
IV. CONTAMINACIÓN CONOCIDA Y PATOGENICIDAD () ⁴				
Micoplasma		Si ()	No (X)	Desconocido ()
Virus:	Herpes	Si ()	No ()	Desconocido (X)
	Hepatitis B	Si ()	No ()	Desconocido (X)
	Hepatitis C	Si ()	No ()	Desconocido (X)
	VIH	Si ()	No ()	Desconocido (X)
Otros contaminantes:		Si ()	No ()	Desconocido (X)
En caso afirmativo, por favor especifique:				
¿El material es patógeno al hombre o a animales?				
		Si ()	No (X)	Desconocido ()
En caso afirmativo, por favor especifique:				
			Patogénico ()	Alergénico ()
			Toxigénico ()	Tumorigénico ()
LA LÍNEA CELULAR DEBE SER MANEJADA BAJO EL SIGUIENTE NIVEL DE CONTENCIÓN DEL LABORATORIO ⁵				
			L1 (X)	L2 ()

⁴ Marque con una X en caso de que se dé información adicional en una hoja anexa

⁵ El DSMZ solo acepta organismos para depósito que pertenezcan al grupo de riesgo 1 ó 2, de acuerdo con "Sichere Biotechnologie: Einstufung von biologischen Agenzien: Viren" (B 004) de "Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie" y puedan ser manejados bajo el nivel de contención L1 o L2 del laboratorio, de acuerdo con "Gesetz zur Regelung der Gentechnik" (BGBl. I, pp. 2087-2083 de 21.12.1993), último cambio en 16.08.2002 (BGBl. I, pp. 3220-3244) y de acuerdo con la Directiva EEC 2000/54/EC de la Protección de los Trabajadores contra los Riesgos Relacionados con la Exposición a Agentes Biológicos en el Trabajo (OJ No. L262, pp. 21-45 de 18.09.2000)

V. SI EL CULTIVO CELULAR ES MANIPULADO GENÉTICAMENTE

()⁴

Dar respuestas completas

1. DATOS RESPECTO AL ORGANISMO HOSPEDERO

Designación: Ratón

Grupo de Riesgo (X) gr. De riesgo 1 () gr. De riesgo 2

Sensibilidades:

Resistencias:

Propiedades especiales:

2. DATOS RESPECTO AL ORGANISMO DONOR

Designación:

Grupo de peligro (X) gr. de pel. 1 () gr. de pel. 2 () gr. de pel 3

Descripción del fragmento de ADN clonado: 2 fragmentos cromosomales humanos (FChs) codificantes de loci de IgG humano

Información clonada:

Tamaño del ADN clonado (en pb): 15Mb de Chr. 14 con loci de IgH, 5-20 Mb de Chr. 2 con loci de Igk.

() genoma completo () ADNc

(X) subgenómico () sintético

() subgénico

Riesgo potencial del ADN: () patogénico () tumorigénico

() toxigénico () alérgico

(X) no riesgo potencial

3. DATOS RESPECTO AL VECTOR

Designación: Fragmento de cromosoma humano (FChs) marcado con pSTneoB

Derivado de: Cromosoma humano

Especificidad hospedero: Ratón

Resistencias: G418

Tamaño del plásmido/virus en pb: sin inserto: no aplica con inserto: 5-20 Mb

Promotores: Promotores de IgG humana

Marcos de lectura adicionales: 17 segmentos de gen humano V kappa, 5 J kappa y C kappa; locus de cadena pesada totalmente humano

Posibilidad de infección: () si (X) no

Plásmido movilizable () si (X) no

Sistema de transferencia propio () si (X) no

Transferencia por virus endógenos colaboradores () si (X) no

4. DATOS RESPECTO AL ORGANISMO GENÉTICAMENTE MANIPULADO⁵

Propiedades especiales: Expresión de la IgG humana funcional <P-Selektin> (e.g. producción de....; uso como....-vector, etc.)

DNA foráneo (X) episomal () cromosómicamente integrado

Riesgo potencial:	☐ patogénico ☐ tumorigénico ☐ toxigénico ☐ alergénico
☒ no riesgo potencial	
Clasificación de acuerdo con _____ por favor indique el motivo: _____	
Legislación alemana ☐ S1 ☐ S2 o legislación UE ☐ clase 1 ☐ clase 2	
De acuerdo con las regulaciones del GenTG6, el DSMZ solo puede aceptar para el depósito, organismos genéticamente manipulados, potencialmente patogénicos, cuando una copia del permiso expedido por la autoridad competente (o por una comisión nacional de seguridad biológica equivalente) para trabajar en los microorganismos, acompaña la forma de depósito.	

⁴ Marque con una X si se da información adicional en una hoja anexa

⁵ el DSMZ solo acepta para el depósito organismos que pertenezcan al grupo de riesgo 1 ó 2 de acuerdo con "Sichere Biotechnologie: Einstufung von biologischen Agenzien: Viren" (B 004) de "Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie" y puedan ser manejados bajo el nivel de contención S1 o S2 del laboratorio, de acuerdo con "Gesetz zur Regelung der Gentechnik" (BGBl. I, pp. 2067-2083 de 21.12.1993), o clase 1 ó 2*.

⁶ GenTG= Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Ley alemana para la regulación de la Ingeniería genética)

* De acuerdo con la directiva del EEC 2000/54/EC de la Protección de los Trabajadores contra los Riesgos Relacionados con la Exposición a Agentes Biológicos en el Trabajo (OJ No. L262, pp. 21-45 de 18.08.2000)

Forma DSMZ-BP/1- Cultivo Celular Animal y Humano (tercera página) 08/2003

VI. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA ⁷		() ⁴
hu-Mab<P-Selectin>LC1004-002		
VII. DATOS ADICIONALES ⁸		() ⁵
Tomizuka et al. (1997) Nature Genet. 16, 133-143 Tomizuka et al. (2000) PNAS 97, 722-727		
VIII. DESTINO DEL CULTIVO TRAS LA DURACIÓN PRESCRITA DE ALMACENAMIENTO ¹⁰		
a) El cultivo será transferido a la colección disponible al público del DSMZ	☐ sí	☐ no
b) El cultivo será devuelto al depositante previo pago de honorarios	☐ sí	☐ no
c) El cultivo será destruido por el DSMZ	☒ sí	☐ no
IX. DEPOSITANTE ¹¹		
Nombre:	Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Strasse 116 68305 Mannheim	Firma: (ilegible) (ilegible) ppa. I. V. Dr. Schreiner K.-H. Betke
Dirección:	para correspondencia Roche Diagnostics GmbH	Fecha: Marzo 25, 2004

Nonnenwald 2 82377 Penzberg									
Teléfono:	08856-60-3450								
Fax:	08856-60-3451								
E-Mail:	<u>karl-heinz.betke@roche.com</u>								
Depositantes adicionales:	<table border="0"> <tr> <td>F. Hoffmann – La Roche AG</td> <td>Hoffmann – La Roche Inc.</td> </tr> <tr> <td>124 Grenzacherstrasse</td> <td>340 Kingsland Street</td> </tr> <tr> <td>CH-4070 Basel</td> <td>Nutley, NJ 07110-1199</td> </tr> <tr> <td>Suiza</td> <td>EUA</td> </tr> </table>	F. Hoffmann – La Roche AG	Hoffmann – La Roche Inc.	124 Grenzacherstrasse	340 Kingsland Street	CH-4070 Basel	Nutley, NJ 07110-1199	Suiza	EUA
F. Hoffmann – La Roche AG	Hoffmann – La Roche Inc.								
124 Grenzacherstrasse	340 Kingsland Street								
CH-4070 Basel	Nutley, NJ 07110-1199								
Suiza	EUA								

⁶ Marque con una X si se da información adicional en una hoja anexa

⁷ Se recomienda indicar la descripción científica y / o designación taxonómica propuesta del microorganismo (ver I).

⁸ Si se desea, el nombre y la dirección del inventor pueden escribirse acá

⁹ Marque con una X si se da información adicional en una hoja anexa (diferente a la que se refirió en la nota 5 de pie de página), tal como la fuente del microorganismo, el(los) nombre(s) y dirección(es) de cualquier otra institución depositaria en la cual se haya depositado el microorganismo, o el criterio usado al escribir la designación taxonómica propuesta (El suministro de esta información es opcional).

¹⁰ El cultivo se almacenará por un periodo de al menos 5 años tras la solicitud más reciente de una muestra del organismo depositado y, en cualquier caso, por lo menos 30 años después de la fecha de depósito (Regla 9.1) La regulación anterior es válida hasta que haya un cambio en la jurisdicción.

¹¹ Esta forma de depósito es el contrato entre el depositante y el depositario. Por lo tanto, debe ser firmada por el depositante. En el caso de una entidad legal, se requiere la firma de dos representantes, designados por dicha entidad de manera oficial. Donde se requiera la firma en nombre de una entidad legal, el (los) nombre(s) escrito(s) de la(s) persona(s) natural(es) que firma(n) en nombre de la entidad legal debe(n) acompañar la(s) firma(s). A menos que se especifique lo contrario, el abajo firmante es el correspondiente del DSMZ.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



STATEMENT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
pursuant to Rule 6.1

To
DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON
MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH
Mascheroder Weg 1b
D-38124 Braunschweig
GERMANY

To be filled in by the Depository Authority

DSMZ-Accession number :

Date culture received:

ANIMAL AND HUMAN CELL CULTURES

THE UNDERSIGNED HEREBY DEPOSITS UNDER THE BUDAPEST TREATY THE CELL CULTURE IDENTIFIED HEREUNDER AND UNDERTAKES NOT TO WITHDRAW THE DEPOSIT FOR THE PERIOD SPECIFIED IN RULE 9.1¹. THE DSMZ DOES NOT PROPAGATE CELL CULTURES.

I. IDENTIFICATION OF THE CELL CULTURE	
Identification reference ² , name of cell line:	<u>hu-Mab<P-Selektin>LC 1004-002</u>
Species of origin ² :	<u>KM transgenic mouse (Madarox, CA, USA)</u>
Hybridoma:	<u>SP2/0-Ag14 (ATCC: CRL-1581)</u>
II. CONDITIONS FOR CULTIVATION (Y)	
Please indicate all necessary conditions including type and % of serum, temperature, gaseous phase, optimal split ratio, etc.:	
<u>500 ml (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) + 15 ml FCS + 5 ml Sodium Pyruvate (MEM 100mM)</u> <u>+ 5 ml 2-Mercaptoethanol (50mM) or 1000 ml HyQ ADCF-Mab + 50 ml FCS; Start Culture with 1x10⁵ cells</u> <u>and split every 3 or 4 days. Doubling time approximately 30 hours; maximal density: 2x10⁶ cells/ml;</u> <u>5% CO₂, 37°C; Cells in suspension (or occasionally in clumps) sometime low adherent.</u>	
Have, until now, any additional supplements (including antibiotics) been used? If so, give concentrations:	
<u>1% Hybridoma Cloning Factor</u> <u>5 ml Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml Strep, 5000IU/ml Pen)</u>	

- ¹ This form may also be used if the undersigned converts into a deposit under the Budapest Treaty the deposit of an organism that he or his predecessor in title has already deposited, outside the Budapest Treaty, with the same depository institution either before (Rule 6.4(d)) or after the acquisition by that institution of the status of international depository authority.
- ² Number, symbols etc., given to the organism by the depositor.
- ³ It is strongly recommended that the taxonomic designation and/or scientific description (see under VII.) of the organism be indicated.
- ⁴ Mark with a cross if additional information is given on an attached sheet.

36

III. CONDITIONS FOR LONG TERM STORAGE ()			
Composition of medium:		90% FCS and 10% DMSO	
Cell concentration:		approximately 5x10 ⁶ cells/ampoule	
Other recommendations:			
IV. KNOWN CONTAMINATION AND PATHOGENICITY ()			
Mycoplasma:		Yes ()	No (x)
		Unknown ()	
Viruses:		Yes ()	No ()
Herpes		Yes ()	No ()
Hepatitis B		Yes ()	No ()
Hepatitis C		Yes ()	No ()
HIV		Yes ()	No ()
		Unknown (x)	
Other contaminants:		Yes ()	No ()
		Unknown (x)	
If yes, please specify:			
Is the material pathogenic to man or animals:		Yes ()	No (x)
		Unknown ()	
If yes, please specify:			
		pathogenic ()	allergenic ()
		toxigenic ()	tumorigenic ()
THE CELL LINE HAS TO BE HANDLED UNDER THE FOLLOWING LABORATORY CONTAINMENT			
LEVEL:			
		L1 (x)	L2 ()

- ^a Mark with a cross if additional information is given on an attached sheet.
- ^b The DSMZ only accepts for deposit organisms which belong to risk group 1 or 2, according to 'Sichere Biotechnologie: Einstufung von biologischen Agenten: Viren' (B 004) of the 'Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie' and can be handled under the laboratory containment level L1 or L2 according to "Gesetz zur Regelung der Gentechnik" (BGBI. I, pp. 2067-2083 of 21.12.1993), last changed on 16.08.2002 (BGBI. I, pp. 3220-3244) and according to EEC Directive 2000/54/EC on the Protection of Workers from Risks Related to Exposure to Biological Agents at Work (OJ No. L262, pp. 21-45 of 18.09.2000).

39

V. IF THE CELL CULTURE IS GENETICALLY MANIPULATED
Complete answers to be given

1. DATA CONCERNING THE HOST ORGANISM

designation: MOUSE

risk group: ☒ risk gr. 1 ☐ risk gr. 2

sensitivities:

resistances:

special properties:

2. DATA CONCERNING THE DONOR ORGANISM

designation:

hazard group: ☒ haz. gr. 1 ☐ haz. gr. 2 ☐ haz. gr. 3

description of the cloned DNA fragment:
cloned information: 2 human chromosome fragments (hCFs) encoding human IgG loci

size of the cloned DNA (in bp): 15 Mb of Chr.14 with IgH loci, 5-20Mb of Chr.2 with Igk loci

☐ complete genome ☐ cDNA
☒ subgenomic ☐ synthetic
☐ subgenic

potential risk of the DNA: ☐ pathogenic ☐ tumorigenic
☐ toxicogenic ☐ allergenic
☒ no potential risk

3. DATA CONCERNING THE VECTOR

designation: human chromosome fragment (hCFs) tagged with pSTneoB

derivative of: human chromosome

host specificity: mouse

resistances: G418

plasmid/virus size in bp: without insert not applicable with insert 5-20 Mb

promoters: human IgG promoters

additional reading frames: 17 human V κ appa, 5 J κ appa and C κ appa gene segments; entire human heavy chain locus

own infectivity: ☐ yes ☒ no
 mobilisable plasmid: ☐ yes ☒ no
 own transfer system: ☐ yes ☒ no
 transfer by endogenous helper viruses: ☐ yes ☒ no

4. DATA CONCERNING THE GENETICALLY MANIPULATED ORGANISM*

special properties: expression of functional human IgG1 <P-Selektin>
 (e.g. production of ...; use as ...-vector etc.)

foreign DNA: ☒ episomal ☐ chromosomally integrated

potential risk: ☐ pathogenic ☐ tumorigenic
☐ toxicogenic ☐ allergenic
☒ no potential risk

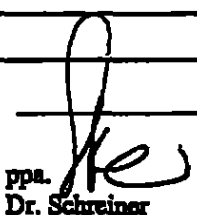
classification according to please indicate why:
 German legislation ☐ S1 ☐ S2 or EU legislation ☐ class 1 ☐ class 2
 According to the regulations of the GenTG6 the DSMZ can only accept genetically manipulated, potentially pathogenic organisms for deposition when a copy of the permit issued by the competent authority (or by an equivalent national biological safety commission) for work on the organisms accompanies the deposition form.

* Mark with a cross if additional information is given on an attached sheet.

6 The DSMZ only accepts for deposit organisms which belong to risk group 1 or 2, according to 'Sichere Biotechnologie: Einleitung von biologischen Agentien: Viren' (B 004) of the 'Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie' and can be handled under the laboratory containment level S1 or S2 according to "Gesetz zur Regelung der Gentechnik" (BGBL I, pp. 2067-2083 of 21.12.1993) or Class 1 or 2 *.

6 GenTG = Gesetz zur Regelung der Gentechnik (German law for the regulation of genetic engineering)

* according to EEC Directive 2000/54/EC on the Protection of Workers from Risks Related to Exposure to Biological Agents at Work (OJ No. L262, pp. 21-45 of 18.09.2000)

VI. SCIENTIFIC DESCRIPTION⁷		() ⁸
<u>hu-Mab<P-Selectin>LC1004-002</u>		
VII. ADDITIONAL DATA⁹		
<u>Tomizuka et al. (1997) Nature Genet, 16, 133-143</u> <u>Tomizuka et al. (2000) PNAS 97, 722-727</u>		
VIII. FATE OF THE CULTURE AFTER THE PRESCRIBED DURATION OF STORAGE¹⁰		
a) The culture is to be transferred into the publicly available collection of the DSMZ	() yes	() no
b) The culture is to be handed back to the depositor against a fee	() yes	() no
c) The culture is to be destroyed by the DSMZ	(x) yes	() no
IX. DEPOSITOR¹¹		
Name: <u>Roche Diagnostics GmbH</u>	Signature: 	
<u>Sandhofer Strasse 116</u>	ppa. <u>Dr. Schreiner</u>	
<u>68305 Mannheim</u>	i. V. <u>K.-H. Beicke</u>	
Address: <u>for correspondence</u>	Date: <u>25. March 2004</u>	
<u>Roche Diagnostics GmbH</u>		
<u>Nonnenwald 2</u>		
<u>82377 Penzberg</u>		
Phone: <u>08856-60-3450</u>		
Fax: <u>08856-60-3451</u>		
E-Mail: <u>karl-heinz.beicke@roche.com</u>		
Further depositors: <u>F. Hoffmann-La Roche AG</u>	<u>Hoffmann-La Roche Inc.</u>	
<u>124 Grenzacherstrasse</u>	<u>340 Kingland Street</u>	
<u>CH-4070 Basel</u>	<u>Nutley, NJ 07110-1199</u>	
<u>Switzerland</u>	<u>USA</u>	

- ⁶ Mark with a cross if additional information is given on an attached sheet.
- ⁷ It is strongly recommended to indicate the scientific description and/or proposed taxonomic designation (see I.) of the microorganism.
- ⁸ If desired name and address of the inventor(s) might be recorded here.
- ⁹ Mark with a cross if additional information (other than the information referred to in footnote 5 is given on an attached sheet, such as the source of the microorganism, the name(s) and the address(es) of any other depository institution(s) with which the microorganism has been deposited, or the criterion used when drafting the proposed taxonomic designation (The supplying of such information is optional).
- ¹⁰ The culture is to be stored for a period of at least five years after the most recent request for the furnishing of a sample of the deposited organism and, in any case, for at least 30 years after the date of deposit (Rule 9.1). The above regulation is valid till there will be binding jurisdiction.
- ¹¹ This Deposition Form is the contract between the depository and the depositor. Therefore it must be signed by the depositor. In case of a legal entity the signatures of two representatives, officially nominated by this entity, are required. Where the signature is required on behalf of a legal entity, the typewritten name(s) of the natural person(s) signing on behalf of the legal entity should accompany the signature(s). Unless otherwise agreed, the undersigned is the correspondent of the DSMZ.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS
PROPÓSITOS DEL PROCESO DE PATENTE

DECLARACIÓN EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL

De acuerdo con la Regla 6.1

Para

DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON
MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH
Mascheroder Weg 1b
D-38124 Braunschweig
ALEMANIA

Para ser llenado por la Autoridad Depositaria

Número de accesión DSMZ:

Fecha de recepción del cultivo:

CULTIVOS DE CÉLULAS ANIMALES Y HUMANAS

POR MEDIO DE LA PRESENTE, EL ABAJO FIRMANTE DEPOSITA BAJO EL TRATADO DE BUDAPEST EL CULTIVO CELULAR IDENTIFICADO A CONTINUACIÓN Y ACEPTA NO RETIRAR EL DEPÓSITO POR EL PERIODO ESPECIFICADO EN LA REGLA 9.1¹. EL DSMZ NO PROPAGA CULTIVOS CELULARES.

I. IDENTIFICACIÓN DEL CULTIVO CELULAR	
Referencia de identificación ² , nombre de la línea celular: hu-Mab<P-Selektin>LC1004-017	
Especies de origen ³ :	Ratón transgénico KM (Medarex, CA, USA)
Hibridoma:	SP2/0-Ag14 (ATCC: CRL-1581)
II. CONDICIONES PARA EL CULTIVO	
Por favor indique todas las condiciones necesarias incluyendo tipo y % de suero, temperatura, fase gaseosa, cociente de división óptimo, etc.:	
500 mL de (Medio Dubelco Modificado por Iscove) + 15 mL de FCS + 5 mL de Piruvato de Sodio (MEM 100mM) + 5 mL de 2-mercaptoetanol (50 mM) o 1000 mL de HyQ ADCF-Mab + 50 mL de FCS; Inicie el cultivo con 1 x 10 ⁵ células y haga pases cada 3 ó 4 días. Tiempo de duplicación de la población aproximadamente 30 horas; densidad máxima: 2 x 10 ⁵ células / mL; 5% CO ₂ , 37°C, células en suspensión (u ocasionalmente en grupos) algunas veces de poca adherencia.	
¿Ha sido usado hasta ahora cualquier suplemento adicional (Incluyendo antibióticos)?	
En caso afirmativo, dé las concentraciones	
1% Factor de clonación del Hibridoma	
5 mL de Penicilina-Streptomicina (5000U/mL Strep, 5000 IU / mL Pen)	

¹ Esta forma puede también ser usada si el abajo firmante convierte en un depósito bajo el Tratado de Budapest, un depósito de un organismo que éste o su predecesor en título haya depositado, fuera del Tratado de Budapest, con la misma institución depositaria anterior (Regla 6.4 (d)) o tras la adquisición de esa institución del estatus de autoridad depositaria Internacional.

² Número, símbolos, etc. Dados al organismo por el depositante.

³ Se recomienda que se indique la designación taxonómica y/o la descripción científica del organismo (ver VII)

⁴ Marque con una X si se da información adicional en una hoja anexa.

III. CONDICIONES PARA EL ALMACENAMIENTO A LARGO PLAZO				
Composición del medio:		90% FCS y 10% DMSO		
Concentración de las células:		aproximadamente 5x10 ⁵ células / ampolla		
Otras recomendaciones:				
IV. CONTAMINACIÓN CONOCIDA Y PATOGENICIDAD ()⁴				
Micoplasma		SI ()	No (X)	Desconocido ()
Virus:	Herpes	SI ()	No ()	Desconocido (X)
	Hepatitis B	SI ()	No ()	Desconocido (X)
	Hepatitis C	SI ()	No ()	Desconocido (X)
	VIH	SI ()	No ()	Desconocido (X)
Otros contaminantes:		SI ()	No ()	Desconocido (X)
En caso afirmativo, por favor especifique:				
¿El material es patógeno al hombre o a animales?				
		SI ()	No (X)	Desconocido ()
En caso afirmativo, por favor especifique:				
			Patogénico ()	Alergénico ()
			Toxigénico ()	Tumorigénico ()
LA LÍNEA CELULAR DEBE SER MANEJADA BAJO EL SIGUIENTE NIVEL DE CONTENCIÓN DEL LABORATORIO⁵				
		L1 (X)	L2 ()	

⁴ Marque con una X en caso de que se dé información adicional en una hoja anexa

⁵ El DSMZ solo acepta organismos para depósito que pertenezcan al grupo de riesgo 1 ó 2, de acuerdo con "Sichere Biotechnologie: Einstufung von biologischen Agenzien: Viren" (B 004) de "Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie" y puedan ser manejados bajo el nivel de contención L1 o L2 del laboratorio, de acuerdo con "Gesetz zur Regelung der Gentechnik" (BGBl. I, pp. 2067-2083 de 21.12.1993), último cambio en 16.08.2002 (BGBl. I, pp. 3220-3244) y de acuerdo con la Directiva EEC 2000/54/EC de la Protección de los Trabajadores contra los Riesgos Relacionados con la Exposición a Agentes Biológicos en el Trabajo (OJ No. L262, pp. 21-45 de 18.09.2000)

V. SI EL CULTIVO CELULAR ES MANIPULADO GENÉTICAMENTE		() ^a
Dar respuestas completas		
1. DATOS RESPECTO AL ORGANISMO HOSPEDERO		
Designación:	Ratón	
Grupo de Riesgo	(X) gr. De riesgo 1	() gr. De riesgo 2
Sensibilidades:		
Resistencias:		
Propiedades especiales:		
2. DATOS RESPECTO AL ORGANISMO DONOR		
Designación:		
Grupo de peligro	(X) gr. de pel. 1	() gr. de pel. 2 () gr. de pel 3
Descripción del fragmento de ADN clonado:	2 fragmentos cromosomales humanos (FChs) codificantes de <i>loci</i> de IgG humano	
Información clonada:		
Tamaño del ADN clonado (en pb):	15Mb de Chr. 14 con <i>loci</i> de IgH, 5-20 Mb de Chr. 2 con <i>loci</i> de Igk.	
	() genoma completo	() ADNc
	(X) subgenómico	() sintético
	() subgénico	
Riesgo potencial del ADN:	() patogénico	() tumorigénico
	() toxigénico	() alergénico
	(X) no riesgo potencial	
3. DATOS RESPECTO AL VECTOR		
Designación:	Fragmento de cromosoma humano (FChs) marcado con pSTneoB	
Derivado de:	Cromosoma humano	
Especificidad hospedero:	Ratón	
Resistencias:	G418	
Tamaño del plásmido/virus en pb:	sin inserto: no aplica	con inserto: 5-20 Mb
Promotores:	Promotores de IgG humana	
Marcos de lectura adicionales:	17 segmentos de gen humano V κ y J κ y C κ ; locus de cadena pesada totalmente humano	
Posibilidad de infección:	() si	(X) no
Plásmido movillizable	() si	(X) no
Sistema de transferencia propio	() si	(X) no
Transferencia por virus endógenos colaboradores	() si	(X) no
4. DATOS RESPECTO AL ORGANISMO GENÉTICAMENTE MANIPULADO^a		
Propiedades especiales:	Expresión de la IgG humana funcional <P-Selektin> (e.g. producción de....; uso como....-vector, etc.)	
DNA foráneo	(X) episomal	() cromosómicamente integrado

Riesgo potencial: (X) no riesgo potencial	☐ patogénico ☐ tumorigénico ☐ toxigénico ☐ alérgico
Clasificación de acuerdo con _____ por favor indique el motivo: _____ Legislación alemana () S1 () S2 o legislación UE () clase 1 () clase 2 De acuerdo con las regulaciones del GenTG ⁶ , el DSMZ solo puede aceptar para el depósito, organismos genéticamente manipulados, potencialmente patogénicos, cuando una copia del permiso expedido por la autoridad competente (o por una comisión nacional de seguridad biológica equivalente) para trabajar en los microorganismos que acompañan la forma de depósito.	

⁴ Marque con una X si se da información adicional en una hoja anexa

⁶ el DSMZ solo acepta para el depósito organismos que pertenezcan al grupo de riesgo 1 ó 2 de acuerdo con "Sichere Biotechnologie: Einstufung von biologischen Agenzien: Viren" (B 004) de "Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie" y puedan ser manejados bajo el nivel de contención S1 o S2 del laboratorio, de acuerdo con "Gesetz zur Regelung der Gentechnik" (BGBl. I, pp. 2067-2083 de 21.12.1993), o clase 1 ó 2*.

⁸ GenTG= Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Ley alemana para la regulación de la Ingeniería genética)

* De acuerdo con la directiva del EEC 2000/54/EC de la Protección de los Trabajadores contra los Riesgos Relacionados con la Exposición a Agentes Biológicos en el Trabajo (OJ No. L262, pp. 21-45 de 18.09.2000)

Forma DSMZ-BP/1- Cultivo Celular Animal y Humano (tercera página) 06/2003

VI. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA⁷		() ⁴
hu-Mab<P-Selectin>LC1004-017		
VII. DATOS ADICIONALES⁸		() ⁴
Tomizuka et al. (1997) Nature Genet. 16, 133-143 Tomizuka et al. (2000) PNAS 97, 722-727		
VII. DESTINO DEL CULTIVO TRAS LA DURACIÓN PRESCRITA DE ALMACENAMIENTO¹⁰		
a) El cultivo será transferido a la colección disponible al público del DSMZ	() si	() no
b) El cultivo será devuelto al depositante previo pago de honorarios	() si	() no
c) El cultivo será destruido por el DSMZ	(X) si	() no
IX. DEPOSITANTE¹¹		
Nombre: Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Strasse 116 68305 Mannheim	Firma: (ilegible) (ilegible) ppa. I. V. Dr. Schreiner K.-H. Betke	
Dirección: para correspondencia Roche Diagnostics GmbH	Fecha: Marzo 25, 2004	

Nonnenwald 2		
82377 Penzberg		
Teléfono:	08858-80-3450	
Fax:	08858-80-3451	
E-Mail:	<u>kari-heinz.betke@roche.com</u>	
Depositantes adicionales:	F. Hoffmann – La Roche AG	Hoffmann – La Roche Inc.
	124 Grenzacherstrasse	340 Kingsland Street
	CH-4070 Basel	Nutley, NJ 07110-1199
	Suiza	EUA

⁶ Marque con una X si se da información adicional en una hoja anexa

⁷ Se recomienda indicar la descripción científica y / o designación taxonómica propuesta del microorganismo (ver I).

⁸ Si se desea, el nombre y la dirección del inventor pueden escribirse acá

⁹ Marque con una X si se da información adicional en una hoja anexa (diferente a la que se refirió en la nota 5 de pie de pagina), tal como la fuente del microorganismo, el(los) nombre(s) y dirección(es) de cualquier otra institución depositaria en la cual se haya depositado el microorganismo, o el criterio usado al escribir la designación taxonómica propuesta (El suministro de esta información es opcional).

¹⁰ El cultivo se almacenará por un periodo de al menos 5 años tras la solicitud más reciente de una muestra del organismo depositado y, en cualquier caso, por lo menos 30 años después de la fecha de depósito (Regla 9.1) La regulación anterior es válida hasta que haya un cambio en la jurisdicción.

¹¹ Esta forma de depósito es el contrato entre el depositante y el depositario. Por lo tanto, debe ser firmada por el depositante. En el caso de una entidad legal, se requiere la firma de dos representantes, designados por dicha entidad de manera oficial. Donde se requiera la firma en nombre de una entidad legal, el (los) nombre(s) escrito(s) de la(s) persona(s) natural(es) que firma(n) en nombre de la entidad legal debe(n) acompañar la(s) firma(s). A menos que se especifique lo contrario, el abajo firmante es el correspondiente del DSMZ.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



51 A4

STATEMENT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
pursuant to Rule 6.1

To
DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON
MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH
Mascheroder Weg 1b
D-38124 Braunschweig
GERMANY

To be filled in by the Depository Authority

DSMZ-Accession number :

Date culture received:

ANIMAL AND HUMAN CELL CULTURES

THE UNDERSIGNED HEREBY DEPOSITS UNDER THE BUDAPEST TREATY THE CELL CULTURE IDENTIFIED HEREUNDER AND UNDERTAKES NOT TO WITHDRAW THE DEPOSIT FOR THE PERIOD SPECIFIED IN RULE 9.1'. THE DSMZ DOES NOT PROPAGATE CELL CULTURES.

I. IDENTIFICATION OF THE CELL CULTURE	
Identification reference ¹ , name of cell line:	<u>hm-Mab<P-Selektin>LC 1004-017</u>
Species of origin ² :	<u>KM transgenic mouse (Medarex, CA, USA)</u>
Hybridoma:	<u>SP2/0-Ag14 (ATCC: CRL-1581)</u>
II. CONDITIONS FOR CULTIVATION ()	
Please indicate all necessary conditions including type and % of serum, temperature, gaseous phase, optimal split ratio, etc.:	
<u>500 ml (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) + 15 ml FCS + 5 ml Sodium Pyruvate (MEM 100mM)</u> <u>+ 5 ml 2-Mercaptoethanol (50mM) or 1000 ml HyQ ADCF-Mab + 50 ml FCS; Start Culture with 1x10e5 cells</u> <u>and split every 3 or 4 days. Doubling time approximately 30 hours; maximal density: 2x10e6 cells/ml;</u> <u>5% CO2, 37°C; Cells in suspension (or occasionally in clumps) sometimes low adherent.</u>	
Have, until now, any additional supplements (including antibiotics) been used? If so, give concentrations:	
<u>1% Hybridoma Cloning Factor</u> <u>5 ml Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml Strep, 5000IU/ml Pen)</u>	

- ¹ This form may also be used if the undersigned converts into a deposit under the Budapest Treaty the deposit of an organism that he or his predecessor in title has already deposited, outside the Budapest Treaty, with the same depository institution either before (Rule 6.4(d)) or after the acquisition by that institution of the status of international depository authority.
- ² Number, symbols etc., given to the organism by the depositor.
- ³ It is strongly recommended that the taxonomic designation and/or scientific description (see under VII.) of the organism be indicated.
- ⁴ Mark with a cross if additional information is given on an attached sheet.

45

III. CONDITIONS FOR LONG TERM STORAGE ()^a			
Composition of medium: <u>90% FCS and 10% DMSO</u>			
Cell concentration: <u>approximately 5x10⁶ cells/ampoule</u>			
Other recommendations:			
IV. KNOWN CONTAMINATION AND PATHOGENICITY ()^a			
Mycoplasma:	Yes ()	No (x)	Unknown ()
Viruses:	Yes ()	No ()	Unknown (x)
Herpes	Yes ()	No ()	Unknown (x)
Hepatitis B	Yes ()	No ()	Unknown (x)
Hepatitis C	Yes ()	No ()	Unknown (x)
HIV	Yes ()	No ()	Unknown (x)
Other contaminations:	Yes ()	No ()	Unknown (x)
If yes, please specify:			
Is the material pathogenic to man or animals:	Yes ()	No (x)	Unknown ()
If yes, please specify:			
	pathogenic ()	allergenic ()	
	toxigenic ()	nonorigenic ()	
THE CELL LINE HAS TO BE HANDLED UNDER THE FOLLOWING LABORATORY CONTAINMENT			
LEVEL ^b :			
	L1 (x)		L2 ()

^a Mark with a cross if additional information is given on an attached sheet.

^b The DSMZ only accepts for deposit organisms which belong to risk group 1 or 2, according to 'Stichwort Biotechnologie: Einstufung von biologischen Agenten: Viren' (B 004) of the 'Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie' and can be handled under the laboratory containment level L1 or L2 according to "Gesetz zur Regelung der Gentechnik" (BGBl. I, pp. 2067-2083 of 21.12.1993), last changed on 16.08.2002 (BGBl. I, pp. 3220-3244) and according to EEC Directive 2000/54/EC on the Protection of Workers from Risks Related to Exposure to Biological Agents at Work (OJ No. L262, pp. 21-45 of 18.09.2000).

46

V. IF THE CELL CULTURE IS GENETICALLY MANIPULATED ()
 Complete answers to be given

1. DATA CONCERNING THE HOST ORGANISM

designation: mouse

risk group: ☒ risk gr. 1 ☐ risk gr. 2

sensitivities:
 resistances:

special properties:

2. DATA CONCERNING THE DONOR ORGANISM

designation:

hazard group: ☒ haz. gr. 1 ☐ haz. gr. 2 ☐ haz. gr. 3

description of the cloned DNA fragment:
 cloned information: 2 human chromosome fragments (hCFs) encoding human IgG loci

size of the cloned DNA (in bp): 15 Mb of Chr. 14 with IgH loci, 5-20 Mb of Chr. 2 with Igk loci

☐ complete genome ☐ cDNA
☒ subgenomic ☐ synthetic
☐ subclone

potential risk of the DNA: ☐ pathogenic ☐ tumorigenic
☐ toxic ☐ allergenic
☒ no potential risk

3. DATA CONCERNING THE VECTOR

designation: human chromosome fragment (hCFs) tagged with pSTneoB

derivative of: human chromosome

host specificity: mouse

resistances: G418

plasmid/virus size in bp: without insert not applicable with insert 5-20 Mb

promoters: Human IgG promoters

additional reading frames: 17 human V κ and J κ gene segments; entire human heavy chain locus

own infectivity: ☐ yes ☒ no
 mobilisable plasmid: ☐ yes ☒ no
 own transfer system: ☐ yes ☒ no
 transfer by endogenous helper viruses: ☐ yes ☒ no

4. DATA CONCERNING THE GENETICALLY MANIPULATED ORGANISM*

special properties: expression of functional human IgG1 <P-Selectin>
 (e.g. production of ...; use as ...-vector etc.)

foreign DNA: ☒ episomal ☐ chromosomally integrated

potential risk: ☐ pathogenic ☐ tumorigenic
☐ toxic ☐ allergenic
☒ no potential risk

classification according to please indicate why:
 German legislation ☐ S1 ☐ S2 or EU legislation ☐ class 1 ☐ class 2
 According to the regulations of the GenTG6 the DSMZ can only accept genetically manipulated, potentially pathogenic organisms for deposition when a copy of the permit issued by the competent authority (or by an equivalent national biological safety commission) for work on the organism accompanies the deposition form.

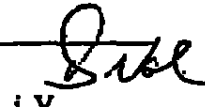
* Mark with a cross if additional information is given on an attached sheet.

* The DSMZ only accepts for deposit organisms which belong to risk group 1 or 2, according to 'Sichere Biotechnologie: Einordnung von biologischen Agenten: Viren' (B 004) of the 'Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie' and can be handled under the laboratory containment level S1 or S2 according to 'Gesetz zur Regelung der Gentechnik' (BGBl. I, pp. 2067-2083 of 21.12.1993) or Class 1 or 2*.

* GenTG = Gesetz zur Regelung der Gentechnik (German law for the regulation of genetic engineering)

* according to EEC Directive 2000/54/EC on the Protection of Workers from Risks Related to Exposure to Biological Agents at Work (OJ No. L243, pp. 21-45 of 18.09.2000)

47

VI. SCIENTIFIC DESCRIPTION¹ ()	
hu-Mab<P-Selectin>LC1004-017.	
VII. ADDITIONAL DATA² ()	
Tomizuka et al. (1997) Nature Genet. 16, 133-143	
Tomizuka et al. (2000) PNAS 97, 722-727	
VIII. FATE OF THE CULTURE AFTER THE PRESCRIBED DURATION OF STORAGE³	
a) The culture is to be transferred into the publicly available collection of the DSMZ	() yes () no
b) The culture is to be handed back to the depositor against a fee	() yes () no
c) The culture is to be destroyed by the DSMZ	(x) yes () no
IX. DEPOSITOR⁴	
Name: Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Strasse 116 68305 Mannheim	Signature:  ppa. Dr. Schreiner  i. V. K.-H. Betke
Address: for correspondence Roche Diagnostics GmbH Nonnenwald 2 82377 Penzberg	Date: 25. March 2004
Phone: 08856-60-3450	
Fax: 08856-60-3451	
E-Mail: karl-heinz.betke@roche.com	
Further depositors: F. Hoffmann-La Roche AG 124 Grenzacherstrasse CH-4070 Basel Switzerland	Hoffmann-La Roche Inc. 340 Kingaland Street Nutley, NJ 07110-1199 USA

- ¹ Mark with a cross if additional information is given on an attached sheet.
- ² It is strongly recommended to indicate the scientific description and/or proposed taxonomic designation (see I.) of the microorganism.
- ³ If desired name and address of the inventor(s) might be recorded here.
- ⁴ Mark with a cross if additional information (other than the information referred to in footnote 3 is given on an attached sheet, such as the source of the microorganism, the name(s) and the address(es) of any other depository institution(s) with which the microorganism has been deposited, or the criterion used when drafting the proposed taxonomic designation (The supplying of such information is optional).
- ⁵ The culture is to be stored for a period of at least five years after the most recent request for the furnishing of a sample of the deposited organism and, in any case, for at least 30 years after the date of deposit (Rule 9.1). The above regulation is valid till there will be binding jurisdiction.
- ⁶ This Deposition Form is the contract between the depository and the depositor. Therefore it must be signed by the depositor. In case of a legal entity the signatures of two representatives, officially nominated by this entity, are required. Where the signature is required on behalf of a legal entity, the typewritten name(s) of the natural person(s) signing on behalf of the legal entity should accompany the signature(s). Unless otherwise agreed, the undersigned is the correspondent of the DSMZ.

48

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS
PROPÓSITOS DEL PROCESO DE PATENTE**

FORMA INTERNACIONAL

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim
F. Hoffmann-La Roche AG,
124, Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street
Nutley NJ07110-1199 USA

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
Publicado de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
Identificada al final de esta página

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE : hu-Mab<P-Selektin>LC 1004-001	Número de accesión dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL : DSM ACC2840
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y / O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
EL microorganismo identificado en la casilla I, estaba acompañado por: ☐ una descripción científica ☐ una designación taxonómica propuesta (Marque con una X si aplica)	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en la casilla I, el cual fue recibido por ésta en 2004-03-30 (Fecha del depósito original) ¹	
IV. RECIBO DE SOLICITUD DE CONVERSIÓN	
El microorganismo identificado en la casilla I fue recibido por esta Autoridad Depositaria Internacional en _____ (fecha de depósito original) Y una solicitud para convertir el depósito original en un depósito bajo el Tratado de Budapest fue recibida por ésta en _____ (fecha del recibo de la solicitud de conversión)	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Dirección : Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Firma(s) de la(s) persona(s) competente(s) para representar a la Autoridad Depositaria Internacional o de oficial(es) autorizado(s) Firma ilegible Fecha: 2004-04-07

¹ Donde aplique la Regla 6.4 (d), esta fecha es la fecha en la cual el estatus de autoridad depositaria Internacional fue adquirido.

51

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS
PROPÓSITOS DEL PROCESO DE PATENTE

FORMA INTERNACIONAL

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim
F. Hoffmann-La Roche AG,
124, Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street
Nutley NJ 07110-1199 USA

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
Publicado de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
Identificada al final de esta página

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE : hu-Mab<P-Selektin>LC 1004-002	Número de accesoión dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL : DSM ACC2841
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y / O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en la casilla I, estaba acompañado por: () una descripción científica () una designación taxonómica propuesta (Marque con una X si aplica)	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en la casilla I, el cual fue recibido por ésta en 2004-03-30 (Fecha del depósito original) ¹	
IV. RECIBO DE SOLICITUD DE CONVERSIÓN	
El microorganismo identificado en la casilla I fue recibido por esta Autoridad Depositaria Internacional en (fecha de depósito original) Y una solicitud para convertir el depósito original en un depósito bajo el Tratado de Budapest fue recibida por ésta en (fecha del recibo de la solicitud de conversión)	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Dirección : Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Firma(s) de la(s) persona(s) competente(s) para representar a la Autoridad Depositaria Internacional o de oficial(es) autorizado(s) Firma ilegible Fecha: 2004-04-07

¹ Donde aplique la Regla 6.4 (d), esta fecha es la fecha en la cual el estatus de autoridad
depositaria Internacional fue adquirido.

50

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS
PROPÓSITOS DEL PROCESO DE PATENTE**

FORMA INTERNACIONAL

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim
F. Hoffmann-La Roche AG,
124, Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street
Nutley NJ 07110-1199 USA

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
Publicado de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
Identificada al final de esta página

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE : hu-Mab<P-Selektin>LC 1004-017	Número de accesión dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL : DSM ACC2842
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y / O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en la casilla I, estaba acompañado por: ☐ una descripción científica ☐ una designación taxonómica propuesta (Marque con una X si aplica)	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en la casilla I, el cual fue recibido por ésta en 2004-03-30 (Fecha del depósito original) ¹	
IV. RECIBO DE SOLICITUD DE CONVERSIÓN	
El microorganismo identificado en la casilla I fue recibido por esta Autoridad Depositaria Internacional en (fecha de depósito original) Y una solicitud para convertir el depósito original en un depósito bajo el Tratado de Budapest fue recibida por ésta en (fecha del recibo de la solicitud de conversión)	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Dirección : Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Firma(s) de la(s) persona(s) competente(s) para representar a la Autoridad Depositaria Internacional o de oficial(es) autorizado(s) Firma ilegible Fecha: 2004-04-07

¹ Donde aplique la Regla 6.4 (d), esta fecha es la fecha en la cual el estatus de autoridad
depositaria internacional fue adquirido.

INTERNATIONAL FORM

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim
F. Hoffmann-La Roche AG,
124, Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street
Nutley NJ 07110-1199, USA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: hu-Mab<P-Selektin>LC 1004-001	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2640
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: () a scientific description () a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2004-03-30 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above was received by this International Depositary Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MICROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <i>V. W. C. 40</i> Date: 2004-04-07

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, each date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

Form DSMZ-BPM (sole page) 12/2001

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

DSMZ

Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH



INTERNATIONAL FORM

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim
F. Hoffmann-La Roche AG,
124, Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street
Nutley NJ 07110-1199, USA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: hu-Mab<P-Selektin>LC 1004-002	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2641
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: () a scientific description () a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2004-03-30 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above was received by this International Depositary Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): V. Wechs Date: 2004-04-07

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

DSMZ
Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH

INTERNATIONAL FORM

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim
F. Hoffmann-La Roche AG,
124, Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street
Nutley NJ 07110-1199, USA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: hu-Mab<P-Selektin>LC 1004-017	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2642
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: () a scientific description () a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2004-03-30 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above was received by this International Depositary Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MICROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): V. Weh Date: 2004-04-07

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.
Form DSMZ-BF/4 (sole page) 12/2001

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

PCT

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

(Capítulo II del Tratado de Cooperación de Patentes)

(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente Caso 22354	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Forma PCT/IPEA/416	
Solicitud internacional No. PCT/EP2005/003581	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 05.04.2005	Fecha de prioridad (día/mes/año) 13.04.2004
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC C07K16/28, C07K16/46, A61K39/395		
Solicitante F. HOFFMANN-LA ROCHE AG		

1. Este reporte es el reporte de examen preliminar internacional, establecido por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y transmitido al solicitante de conformidad con el Artículo 36.

2. Este REPORTE consta de un total de 10 hojas, incluyendo esta carátula.

3. Este reporte también es acompañado por ANEXOS, que comprenden:

a. ☐ (enviado al solicitante y a la Oficina Internacional) un total de _ _ _ _ _ hojas, como sigue:

☐ hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos los cuales han sido modificados y son la base de este reporte y/o hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas).

☐ hojas que reemplazan hojas anteriores, pero las cuales esta Autoridad considera que contienen una modificación que va más allá de la revelación en la solicitud internacional como se presentó, como se indicó en el ítem 4 de la Casilla No. I y la Casilla Suplementaria.

b. ☐ (enviado únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y número de medio(s) electrónico(s)) _ _ , que contienen un listado de secuencias y/o tablas con ello, únicamente en una forma legible en computador, como se indicó en la Casilla Suplementaria Relacionada con el Listado de Secuencias (ver Sección 802 de las Instrucciones Administrativas).

4. Este reporte contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems:

- | | | |
|-------------------------------------|------------------|--|
| ☒ | Casilla No. I | Bases del reporte |
| ☐ | Casilla No. II | Prioridad |
| ☒ | Casilla No. III | No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial |
| ☐ | Casilla No. IV | Falta de unidad de invención |
| ☒ | Casilla No. V | Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación |
| ☐ | Casilla No. VI | Ciertos documentos citados |
| ☐ | Casilla No. VII | Ciertos defectos en la solicitud internacional |
| ☐ | Casilla No. VIII | Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional |

Fecha de presentación de la demanda
16.09.2005

Fecha de terminación de este reporte
14.03.2006

Nombre y dirección de correo de la autoridad internacional de examen preliminar
Oficina de Patentes Europea
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Funcionario autorizado

Perez, C

Teléfono No. +49 89 2399 -

55

Casilla No. I Bases del reporte

1. Respecto al idioma, este reporte se basó en la solicitud internacional en el idioma en el cual fue presentada, a menos que se indique lo contrario según este ítem.

☐ Este reporte se basó en una traducción del idioma original al siguiente idioma, el cual es el idioma de una traducción suministrada para los propósitos de:

- ☐ búsqueda internacional (según la Regla 12.3. y 23.1 (b))
☐ publicación de la solicitud internacional (según la Regla 12.4)
☐ examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2 y/o 55.3)

2. Respecto a los elementos de la solicitud internacional este Reporte se basó en (hojas reemplazadas que han sido suministradas a la oficina receptora en respuesta a una invitación según Artículo 14, son referidas en este reporte como "originalmente presentadas" y no son anexadas a este reporte):

Descripción, Páginas

1-64 como se presentaron originalmente

Parte del listado de secuencias de la descripción, Páginas

1-30 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, No.

1-23 como se presentaron originalmente

Dibujos, Hojas

1/6-6/6 como se presentaron originalmente

☒ listado de secuencia y/o alguna tabla(s)-ver Casilla Suplementaria en relación al Listado de Secuencia

3. ☐ Las modificaciones resultaron en la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
☐ las reivindicaciones, Nos.
☐ los dibujos, hojas/figuras
☐ listado de secuencia (*especificar*)
☐ cualquier tabla(s) relacionadas con la serie de listados (*especificar*)

4. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (alguno de) los anexos corregidos a este reporte y numerado antes no ha sido hecho, desde que ellos han sido considerados a través de la presentación original, como esta indicado en la Casilla Suplementaria (Regla 70.2(c)).

- ☐ la descripción, páginas
☐ las reivindicaciones, Nos.
☐ los dibujos, hojas/figuras
☐ secuencia que enumera (*especificar*):
☐ alguna tabla(s) relatada al listado de secuencia (*especificar*):

* Si el ítem 4 aplica, algunas o todas aquellas hojas pueden ser marcadas "reemplazadas".

58

56

Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

1. Las cuestiones de si la invención reivindicada parece ser novedosa, involucrar nivel inventivo (ser no obvia) o ser industrialmente aplicable no han sido examinadas respecto a:

☐ toda la solicitud internacional

☒ las reivindicaciones Nos. 23 totalmente, 4 parcialmente, 12-13, 19-20 en relación a IA

porque:

☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 12-13 y 19-20 en relación a IA se relacionan con la siguiente materia objeto las cuales no requieren examen preliminar internacional (*especificar*):

ver hoja separada

☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa. (*especifique*):

☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos. están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa.

☒ no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos. 23 totalmente y 4 parcialmente

☐ el listado de secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos no cumple con la norma proporcionada por el Anexo C de las Instrucciones Administrativas en que:

la forma escrita

☐ no ha sido suministrada

☐ no cumple con la norma

la forma legible en computador

☐ no ha sido suministrada

☐ no cumple con la norma

☐ las tablas relacionadas con el listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos, si únicamente en forma legible en computador, no cumple con los requerimientos técnicos proporcionados por el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

☒ ver hoja separada para detalles adicionales.

59

57

Cailla No. V Afirmación razonada bajo el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afirmación

Novedad (N)	Si: Reivindicaciones	1-16
	No: Reivindicaciones	17-22
Nivel Inventivo (IS)	Si: Reivindicaciones	
	No: Reivindicaciones	1-22
Aplicabilidad Industrial (IA)	Si: Reivindicaciones	1-11, 14-18, 21-22
	No: Reivindicaciones	

2. Citaciones y explicaciones (Regla 70.7):

ver hoja separada

Casilla Suplementaria relacionada con listado de secuencia

Continuación de la Casilla I, ítem 2:

1. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:

a. tipo de material:

- ☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b. formato de material:

- ☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador

c. tiempo de presentación/suministro:

- ☒ contenido en la solicitud internacional según se registró
☒ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador
☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda y/o examen.
☐ recibo por esta Autoridad como una corrección sobre

2. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

3. Comentarios adicionales:

1. Observaciones adicionales al ítem III (no opinión)

1.1 La actual reivindicación 4 se refiere a un anticuerpo anti P-selectina caracterizado con base en los siguientes parámetros: (1) estructuralmente, es un anticuerpo humano o humanizado, y (2) funcionalmente, debe unirse por lo menos 1000 veces más específicamente a P-selectina que a E- o L-selectina bajo las condiciones experimentales establecidas en la reivindicación 4. En primer lugar, esta propiedad no está claramente identificada, puesto que es imposible comparar el parámetro que ha el Solicitante decidido emplear (unirse a P-selectina en dichas condiciones experimentales específicas) con lo que está establecido en el arte previo. Además, la reivindicación cubre todos los productos que tengan esta propiedad, mientras que la solicitud provee el soporte para y/o revela, a la luz de los Artículos 6 y 5 del PCT respectivamente, solo un número bastante limitado de tales productos: El Solicitante proporciona solo unos pocos anticuerpos que, con suerte, caen dentro del alcance de dicha reivindicación (los mutantes fueron producidos para suprimir la capacidad de enlace a C1q). En este caso, es tal la magnitud en la que las reivindicaciones carecen de sustento y la solicitud carece de revelación, que no es posible realizar una búsqueda significativa sobre todo el alcance reivindicado. Independientemente del razonamiento anterior, la reivindicación también carece de claridad (Artículo 6 del PCT).

Se hace un intento de definir el producto en referencia al resultado a ser alcanzado. Nuevamente, esta falta de claridad es tal, que no es posible entregar una búsqueda significativa sobre todo el alcance reivindicado.

En consecuencia, tanto el examen como la búsqueda, son llevados a cabo para aquellas partes de las reivindicaciones que aparentemente son claras, tienen sustento y están reveladas, a saber, los anticuerpos específicos revelados en la Tabla 1 en la página 49 que han exhibido selectividad a P-selectina versus E- y L-selectina, i.e. HuMab 002 y sus mutantes IgG1v1, IgG1v2 e IgG4v1 (datos en las páginas 54-56 del ejemplo).

1.2 Regla 29 (6) y Artículo 84 de la EPC

No se establece opinión respecto a la materia objeto de la reivindicación 23, ya que la materia objeto reclamada es tan poco clara que no es posible realizar una interpretación significativa con respecto a la novedad y el nivel inventivo (Artículo 34(4)(a)(ii) del PCT). Para cumplir con los requisitos del Artículo 6 del PCT, la reivindicación debe definir claramente por sí misma la invención para la cual se busca protección (norma II-5.04 del PCT). Adicionalmente, respecto a las características técnicas de la invención, una reivindicación no debe hacer referencia a la descripción (Regla 6.2 (a) del PCT y norma II-5.10 del PCT).

1.3 Las reivindicaciones 12-13 y 19-20 abarcan dentro de su alcance, métodos terapéuticos para organismos humanos y animales, que esta Autoridad considera que se encuentran cubiertos por las disposiciones de la Regla 67.1 (iv) del PCT. En consecuencia, no se formulará opinión alguna con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de las reivindicaciones en mención (Artículo 34(4)(a)(i) del PCT).

2. Observaciones adicionales al ítem V (declaración razonada bajo la Regla 66.2(a)(ii) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial)

2.1 La presente solicitud

La presente solicitud se refiere a anticuerpos anti P-selectina que contienen una parte Fc derivada de origen humano y que no se enlaza al factor-complemento C1q. De manera particular, dichos anticuerpos son de la subclase IgG1 humana que contienen por lo menos una mutación en L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y/o P329, o bien, son de la subclase IgG2 humana con las mutaciones S228P y L235E. También se revelan los anticuerpos humanos anti P-selectina producidos por las líneas celulares de hibridoma caracterizadas por el número de accesión de depósito DSM ACC2640 (HuMab 001), ACC2641 (HuMab 002) y ACC2642 (HuMab 017). Tanto HuMab 002 como sus mutantes IgG1v1, IgG1v2 e IgG4v1 han mostrado selectividad a P-selectina versus E- y L-selectinas. También se reivindica el uso de dichos anticuerpos para el tratamiento, en especial, de desórdenes inflamatorios y trombóticos.

2.2 Documentos del arte previo

El presente comunicado hace referencia a los documentos citados en el Reporte Internacional de Búsqueda (RIB) en el orden en que fueron citados (por ejemplo, D1 es el primer documento citado en el RIB). Esta numeración será mantenida a lo largo del proceso.

Estos documentos revelan, entre otros, los siguientes datos:

- (i) D1 revela anticuerpos a P-selectina y su uso para el tratamiento de desórdenes inflamatorios. De manera particular, proporciona anticuerpos humanizados que son isotipos de IgG1 (Mab PB3.1 HaLa) o de IgG4 (Mab PB1.3 HbLd) y los cuales se unen tanto a P-selectina como al anticuerpo PB1.3 murino. Adicionalmente revela composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos (reivindicaciones 44-45), un método para una mayor producción de anticuerpos en células CHO (ejemplo 13, p.72). y el uso de dichos anticuerpos en terapia, especialmente para el tratamiento de condiciones inflamatorias o trombóticas incluyendo lesión de isquemia (p. 34, l. 11- p.35, l.3).

- (ii) En la introducción, D2 reporta que entre las cuatro subclases de IgG humanas, la IgG4 es el único isotipo, que no es capaz de unirse al complemento y activarlo. Además, dicho estudio enseña que el mutante de IgG4 con mutación Pro 331 sufre una lisis celular mediada por el complemento en niveles similares a los observados con IgG1.
- (iii) D3 hace referencia al mapeo del sitio de enlace a C1q sobre un anticuerpo quimérico con un Fc IgG1 humano llamado rituxan. Se reporta que las sustituciones con alanina en los residuos E318, K320 y K322, reducen significativamente la habilidad de un Mab quimérico con un Fc IgG1 humano de unirse a C1q y activar el complemento, lo cual no sucede si dichas sustituciones se hacen en las posiciones E318 y K320 (p. 4182, último párrafo - p. 4183, columna derecha, primer párrafo). Entonces, E318 y K320, que habían sido previamente designados como "el sitio de enlace para C1q" ya que eran (1) cruciales para la activación del complemento mIgG2 y (2) residuos conservados en IgG e IgG de varias especies, son de poca importancia para la activación del complemento por hIgG1. Los autores concluyen que existen diferencias especie-específica en los sitios de enlace a C1q de las IgGs.
- (iv) D4 enseña que la mutación K322A así como la combinación de las mutaciones de L234A y L235A, eliminan la capacidad de enlace a C1q de los anticuerpos humanos IgG1 contra HIV1 (resumen)

2.3 Declaración con respecto a novedad y nivel inventivo (Artículos 33(2) y (3) del PCT)

2.3.1 Novedad

La materia objeto de las reivindicaciones 17-22 no cumple con los requisitos de los Artículos 33(2) y (3) del PCT, dado que dichas reivindicaciones carecen de novedad con respecto a las enseñanzas de D1.

En vista de que es ampliamente conocido por la persona versada en la materia que los anticuerpos humanos IgG4 no se unen al factor complemento C1q (ver, por ejemplo D2, §2.2 ii), la revelación en D1 de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal humanizado contra P-selectina de subclase IgG4 y el uso de dicho anticuerpo en terapia (§2.2 i) destruye la novedad para las reivindicaciones 17-22.

2.3.2 Nivel Inventivo

La materia objeto de las reivindicaciones 1 - 22 no cumplen con los requisitos del Artículo 33 (3) del PCT dado que comprenden opciones técnicas que no resuelven el problema técnico de la invención.

Se considera que D1 constituye el arte previo más cercano, en vista de que ya enseñaba el uso de anticuerpos a P-selectina humanizados para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y trombóticas.

De esta manera, el problema técnico enfrentado por la presente solicitud, es el de proveer anticuerpos anti P-selectina humanizados que no eliciten la citotoxicidad dependiente de complemento y la lisis mediada por complemento, dependiente de anticuerpo (LMCDA).

El Solicitante afirma haber resuelto dicho problema al proveer anticuerpos que no se enlazan al factor complemento C1q.

Sin embargo, como se estableció en el párrafo [0027] de la descripción, existen numerosos estudios en el arte previo dedicados a la caracterización de los residuos de la parte Fc de IgG humana, que son responsables del enlace a C1q. Por ejemplo, D3 enseña que hay diferencias especie-específicas en el sitio de enlace a C1q de las Igs: las sustituciones con alanina en los residuos E318, K320 y K322 reducen significativamente la habilidad de Mab quimérico con un Fc IgG1 humano de enlazarse a C1q y activar el complemento, lo que no sucede si dichas sustituciones son realizadas en las posiciones E318 y K320, mientras que las posiciones que son cruciales para el enlace de mIgG2 al complemento C1q son E318 y K320 (§2.2 iii). En consecuencia, la Autoridad de Búsqueda Internacional (ABI) ha encontrado razones suficientes para creer que la mutación solamente en el residuo E318 o K320 no permitiría suprimir la capacidad de enlace a C1q de un anticuerpo anti P-selectina que tiene un Fc IgG humano, tal como reclama la reivindicación 1. De hecho, los únicos ejemplos de anticuerpos humanizados mutados para los cuales la descripción proporciona evidencia de la pérdida de la capacidad de enlace a C1q son los mutantes de HuMab 002 enseñados en la Tabla 1 de la descripción: IgG1v2 (mutaciones L234A y L235A), IgG1v1 (mutaciones E233P, L234V, L235A, G236, A327G, A330S, P331S) e IgG4v1 (mutaciones S228P y L235E) (p.49)

Adicionalmente, la reivindicación 3 se encuentra dirigida a proteger los anticuerpos humanos anti P-selectina HuMab 001, 002 y 017. Sin embargo, los datos en la página 61, Tabla 3, muestran claramente que HuMab 002 se une

a C1q, y como tal no resuelve el problema de la invención. No se proveen datos del enlace a C1q para HuMab 001 y 017. De manera similar, la reivindicación 4, cuyo alcance es restringido para el examen a HuMab 002 y sus mutantes IgG1v1, IgG1v2 e IgG4v1 (§1.1), también abarca el anticuerpo anti P-selectina, i.e. HuMab002, lo cual no resuelve el problema anteriormente planteado.

De esta manera, la opinión de esta Autoridad establece que algunas, sino la mayoría, de las opciones técnicas que abarca el alcance de las reivindicaciones en mención no resuelven el problema técnico enfrentado por la presente solicitud, en vista de lo cual, los requisitos del Artículo 33(3) del PCT no son cumplidos por la totalidad del amplio alcance reclamado.

2.4 Declaración con respecto a la aplicabilidad industrial (Artículo 33 (4) del PCT)

Para la evaluación de las actuales reivindicaciones 12 - 15 y 19 - 22 respecto a la aplicabilidad industrial, no existe criterio unificado en los estados contratantes del PCT. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable la materia objeto de reivindicaciones para el uso de un compuesto en tratamiento médico; sin embargo, puede permitir reivindicaciones para el primer uso en tratamiento médico de un compuesto conocido, y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

Notas adicionales acerca de la claridad de la materia reclamada

A) Reivindicación 2

La materia objeto de la reivindicación 2 no es clara a la luz del Artículo 6 del PCT. Una redacción tal como "línea celular del hibridoma que tiene un número de acceso de depósito DSM...." Permitiría superar esta objeción.

B) Reivindicaciones 15 y 22

La materia objeto de las reivindicaciones 15 y 22 se refiere al tratamiento de PAOD y CLI. En vista de que el Artículo 6 del PCT requiere que una reivindicación sea clara, el significado completo de las enfermedades PAOD y CLI debe adicionarse en dichas reivindicaciones y las abreviaturas deben ponerse entre paréntesis después del significado completo correspondiente.

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference Case 22354	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEAA/16	
International application No. PCT/EP2005/003581	International filing date (day/month/year) 05.04.2005	Priority date (day/month/year) 13.04.2004
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K16/28, C07K16/48, A51K39/395		
Applicant F. HOFFMANN-LA ROCHE AG et al.		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 10 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 807 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the opinion ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 16.09.2005	Date of completion of this report 14.03.2006	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523858 apmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized Officer Perez, C Telephone No. +49 89 2399- 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2005/003581

Box No. 1 Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-64 as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1-30 as originally filed

Claims, Numbers

1-23 as originally filed

Drawings, Sheets

1/8-6/6 as originally filed

☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY

66
International application No.
PCT/EP2005/003581

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
- ☒ claims Nos. 23 completely, 4 partially, 12-13, 19-20 as far as IA is concerned
because:
 - ☒ the said international application, or the said claims Nos. 12-13 and 19-20 as far as IA is concerned relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):
see separate sheet
 - ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
 - ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
 - ☒ no international search report has been established for the said claims Nos. 23 completely and 4 partially
 - ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
 - the written form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
 - the computer readable form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
 - ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
 - ☒ See separate sheet for further details

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2005/003581

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-16
	No: Claims	17-22
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-22
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-11, 14-18, 21-22
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2005/003581

68

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☒ filed together with the international application in computer readable form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
 - ☐ received by this Authority as an amendment on
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional observations, if necessary:

71

1. Additional remark to Item III (no opinion)

- 1.1** Present claim 4 relates to an anti P-selectin antibody characterized by reference to the following parameter: (1) structurally, it is a human or humanized antibody, and (2) functionally, it should bind at least 1000 fold more specifically to P-selectin than to E- or L-selectin in the experimental conditions outlined in claim 4. First of all, this property is not clearly identified, because it is impossible to compare the parameter the Applicant has chosen to employ (binding to P-selectin in said specific experimental conditions) with what is set out in the prior art. Moreover the claim covers all products having this property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products: the Applicant has provided only a few antibodies falling, by chance, under the scope of said claim (the mutants were produced to suppress C1q binding capacity). In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Consequently, the examination, like the search, is carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely the specific antibodies disclosed in Table 1 on page 49 which are shown to have selectivity for the P-selectin versus E- and L-selectin, i.e. HuMab 002 and its mutants IgG1v1, IgG1v2 and IgG4v1 (data on p.54-56 of the example).

1.2 Rule 29 (6) and Article 84 EPC

No opinion is established on the subject-matter of claim 23, because the claimed subject-matter is so unclear that no meaningful interpretation with respect to novelty and inventive step can be made (Article 34(4)(a)(ii) PCT). To meet the requirements of Article 6 PCT, the claim itself should clearly define the invention for which protection is sought (PCT Guidelines II-5.04). Moreover, a claim must not, in respect of the technical features of the invention, rely on references to the description (Rule 6.2 (a) PCT and PCT Guidelines II-5.10).

1.3 Claims 12-13 and 19-20 embrace, within their scope, therapeutic methods on human and animal body, which are considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of said claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

2. Additional remarks to item V (reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability)

2.1 Present application

The present application concerns anti P-selectin antibodies containing a Fc part derived from human origin and which do not bind to complement factor C1q. In particular said antibodies are either of human subclass IgG1 containing at least a mutation in L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 and /or P329, or of human subclass IgG2 with the mutations S228P and L235E. Human anti P-selectin antibodies produced by the hybridoma cell lines characterized by the deposit accession number DSM ACC2640 (HuMab 001), ACC2641 (HuMab 002) and ACC2642 (HuMab 017) are also disclosed. HuMab 002 as well as its mutants IgG1v1, IgG1v2 and IgG4v1 are shown to have a selectivity for P-selectin versus E- and L- selectins. Also claimed is the use of said antibodies for therapy, in particular of inflammatory and thrombotic disorders.

2.2 Prior art documents

The present communication refers to the documents cited in the International Search Report (ISR) in the order of their citation (f.e. D1 is the first document cited in the ISR). The numbering will be adhered to in the rest of the procedure.

These documents disclose, among other, the following data:

- (i) D1 discloses antibodies to P-selectin and their use to treat inflammation disorders. In particular humanized antibodies are provided, which are either of IgG1 (Mab PB3.1 HaLa) or IgG4 (Mab PB1.3 HbLd) isotype and which bind P-selectin as well as murine PB1.3 antibody. It further discloses pharmaceutical compositions comprising said antibodies (claims 44-45), a method for increased antibody production in CHO cells (example 13, p.72), and the use of said antibodies in therapy, especially for the treatment of inflammatory and thrombotic conditions including ischemia injury (p.34,

70

73

I.11 - p.35, I.3).

- (ii) D2 reports in its introduction that IgG4 is the only isotype, among the four human IgG subclasses which is unable to bind and activate complement. Furthermore said study shows that IGG4 mutant with Pro 331 mutation displays a complement-mediated cell lysis similar to levels observed with IgG1.
- (iii) D3 is directed to the mapping of C1q binding site on a chimeric antibody with a human IgG1 Fc called rituxan. It reports that alanine substitutions at residues E318, K320 and K322, but not at positions E318 and K320 significantly reduce the ability of a chimeric Mab with a human IgG1 Fc to bind C1q and activate complement (p.4182, last paragraph - p.4183, right column, first paragraph). Thus E318 and K320, which were previously designated "the binding site for C1q" because they were (1) crucial for mlgG2 complement activation and (2) conserved residues in IgG and IgG of several species, are only of minor importance for complement activation by hlgG1. The authors conclude that there are species-specific differences in the C1q binding site of IgGs.
- (iv) D4 teaches that K322A mutation as well as the combination of L234A and L235A mutations, abolish C1q binding capacity of human IgG1 antibodies against HIV1 (abstract).

2.3 Statement with regard to novelty and inventive step (Articles 33 (2) and (3) PCT)

2.31 Novelty

The subject-matter of claims 17-22 does not meet the requirements of Articles 33 (2) and (3) PCT, because said claims lack novelty in view of D1.

Actually since it is well-known by the person skilled in the art that human IgG4 antibodies do not bind complement factor C1q (see, for example D2, § 2.2 ii), the disclosure in D1 of a pharmaceutical composition comprising an humanized monoclonal antibody against P-selectin of IgG4 subclass and the use of said antibody for therapy (§ 2.2 i) are novelty destroying for claims 17-22.

2.32 Inventiveness

The subject-matter of claims 1-22 does not meet the requirements of Article 33 (3) PCT, because the claims on file embrace technical options which do not solve the technical problem of the invention.

D1 is considered to be the closest prior art, because it already teaches the use of humanized antibodies to P-selectin for treating inflammatory and thrombotic diseases.

Thus the technical problem faced by the present application is to provide humanized anti P-selectin antibodies that do not elicit complement dependent cytotoxicity and antibody dependent complement mediated lysis (ADCML).

The Applicant claims to have solve said problem by providing antibodies which do not bind to C1q complement factor.

However, as stated in paragraph [0027] of the specification, there are numerous prior art studies dedicated to the characterization of the residues of the Fc part of human IgG, which are responsible of C1q binding. For example, D3 shows that there are species-specific differences in the C1q binding site of Igs: alanine substitutions at residues E318, K320 and K322, but not at positions E318 and K320 significantly reduce the ability of a chimeric Mab with a human IgG1 Fc to bind C1q and activate complement, whereas the positions crucial for mIgG2 binding to complement C1q are E318 and K320 (§ 2.2 iii). Consequently the International Searching Authority (ISA) has well-founded reasons for believing that the mutation at only residue E318 or K320 would not permit to suppress the C1q binding capacity of an anti P-selectin antibody having a human IgG1 Fc, as claimed in claim 1. In fact the only examples of mutated humanized antibodies for which the specification provides evidence of the loss of the C1q binding capacity are the mutants of HuMab 002 shown in Table I of the specification: IgG1v2 (L234A and L235A mutations), IgG1v1 (E233P, L234V, L235A, G236, A327G, A330S, P331S mutations) and IgG4v1 (S228P and L235E mutations) (p.49).

Additionally claim 3 is directed to human anti P-selectin antibodies HuMab 001, 002 and 017. However the data on page 61, Table 3 clearly shows that HuMab002 binds

73

to C1q, and, as such does not solve the problem of the invention. No C1q binding data is provided for HuMab 001 and 017. Similarly claim 4, whose scope is restricted, for the examination, to HuMab 002 and its mutants IgG1v1, IgG1v2 and IgG4v1 (§ 1.1), also embraces an anti P-selectin antibody, i.e. HuMab 002, which does not solve the above problem.

Thus this Authority is of the opinion that some, if not most, of the technical options embraced by the scope of the claims on file do not solve the technical problem faced by the present application. Thus the requirements of Article 33 (3) PCT are not met over the whole of the broad field claimed.

2.4 Statement with regard to industrial applicability (Article 33 (4) PCT)

For the assessment of the present claims 12-15 and 19-22 on the question whether it is industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Additional notes concerning clarity of the claimed matter

A) Claim 2

The subject-matter of claim 2 is not clear in the sense of Article 6 PCT. A wording such as "hybridoma cell line having the deposit accession number DSM" would permit to overcome this objection.

B) Claims 15 and 22

The subject-matter of claims 15 and 22 refer to the treatment of PAOD and CLI. Since Article 6 PCT requires that a claim should be clear, the complete meaning of PAOD and CLI disease should be added in the wording of said claims and the abbreviations thereof should be put parentheses, after the corresponding complete meaning.

ANTICUERPOS ANTI-P-SELECTINA

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a anticuerpos anti-P-selectina y, en particular, a anticuerpos anti-P-selectina y variantes de los mismos que contienen una parte Fc derivada de un origen humano y no se fijan sobre el factor de complemento Clq. Estos anticuerpos tienen propiedades nuevas y susceptibles de invención, que producen un beneficio a un paciente que sufra isquemia crítica de extremidades o enfermedad oclusiva de arterias periféricas (CLI/PAOD).

75

Esta invención se refiere en general a anticuerpos anti-P-selectina y, en particular, a anticuerpos anti-P-selectina que no fijan el factor de complemento Clq. Estos anticuerpos son, con preferencia, anticuerpos humanos o humanizados.

La P-selectina (CD62P, GMP-140, PADGEM, LECAM-3) es una proteína de 140 kDa que depende del calcio y fija hidratos de carbono y que se expresa en las superficies de plaquetas activadas y en el endotelio en respuesta a la trombina y otros agonistas (McEver y col., J. Biol. Chem. 270:11025 (1995); Varki, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7390 (1994); Springer T.A., Annu. Rev. Physiol. 57:827 (1995)). En ambos tipos de células, la P-selectina se almacena en gránulos secretorios, es decir, gránulos α de plaquetas y cuerpos de Weibel-Palade de células endoteliales (McEver y col., J. Clin. Invest. 84:92 (1984)). Es una glucoproteína transmembrana de tipo I, que se compone de un dominio lectina con grupos NH₂ terminales, seguido de un dominio similar al EGF, nueve repeticiones cortas de consenso con homología con las proteínas reguladoras del complemento, un dominio transmembrana y una corta cola citoplásmica (Johnston y col., Cell 56:1033 (1989)). La estructura de la P-selectina es similar a la de otros dos representantes del grupo de la selectina, la E- y la L-selectina, que se expresan en células endoteliales activadas por citocina (E-selectina) o se expresan constitutivamente en la mayor parte de grupos de leucocitos (L-selectina).

78

Se sabe que todas las selectinas se fijan con poca afinidad sobre los oligosacáridos pequeños sialilados, fucosilados, por ejemplo el sialil-Lewis x (sLe^x; Foxall y col., J. Cell. Biol. 117:895 (1992); Varki, Curr. Opin. Cell. Biol. 5 257:257 (1992)). La P- y la L-selectina, pero no la E-selectina, se fijan también sobre hidratos de carbono sulfatados concretos, por ejemplo el sulfato de heparina (véase una revisión en: McEver y Cummings, J. Clin. Invest. 100:S97 (1997)). Los ligandos de gran afinidad con la P-selectina son 10 glucoproteínas similares a la mucina (McEver y col., J. Biol. Chem. 270:11025 (1995)), que constan de una estructura de polipéptido con racimos de O-glúcanos sialilados. Un ligando sialomucina sobre el que se fija con preferencia la P-selectina es el ligando 1 de glucoproteína de P-selectina 15 (PSGL-1, CD162), que normalmente se expresa como homodímero con dos subunidades unidas mediante un disulfuro de pesos moleculares relativos aproximadamente de 120 kDa con leucocitos circulantes. El punto de unión de la P-selectina se localiza en la parte del extremo de grupos terminales NH₂ del 20 PSGL-1. Mediante la unión a este ligando, la P-selectina interviene en el rodamiento de los leucocitos sobre las plaquetas activadas y células endoteliales. El proceso de rodamiento reduce en gran manera la velocidad de movimiento de los leucocitos, lo cual es un requisito previo para la 25 adhesión firme y posterior trans migración de los leucocitos al subendotelio pero también para la acumulación de leucocitos en los trombos.

Las investigaciones que utilizan ratones deficientes en P-selectina y anticuerpos que bloquean específicamente la P-selectina han puesto de manifiesto que la P-selectina interviene en la patofisiología de numerosas enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, incluida la lesión por isquemia/reperfusión (Winn y col., J. Clin. Invest. 92:2042 (1993); Massberg y col., Blood 92:507 (1998)). Además, existe una contribución clara de la P-selectina a las enfermedades cardiovasculares que tienen un componente inflamatorio, por ejemplo la aterosclerosis (Collins y col., J. Exp. Med. 191: 189 (2000); Johnson y col., J. Clin. Invest. 99:1037 (1997)), la restenosis (Manka y col., Circulation 103:1000 (2001); Bienvenu y col., Circulation 103:1128 (2001)) y la trombosis (Kumar y col., Circulation 99:1363 (1999); Andre y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13835 (2000); Blann y col., Br. J. Haematol. 108:191 (2000); Myers y col., Thromb. Haemostasis 85: 423 (2001)). Evidentemente, la inhibición de la función de la P-selectina podría ser eficaz como terapia en varias enfermedades que implican la adherencia de los leucocitos al endotelio vascular o a las plaquetas (véase, p.ej. WO 93/06863).

En el estado de la técnica se han descrito los anticuerpos contra la P-selectina y se han investigado sus efectos antiinflamatorios y antitrombóticos. En la patente US-4,783,399 y el documento WO 93/06863 se describen anticuerpos monoclonales de ratón contra la P-selectina que reaccionan con plaquetas activadas. Geng J. G. y col. (J. Biol. Chem., 266 (1991) 22313-22318) describen anticuerpos

78

monoclonales de ratón que se fijan sobre el fragmento de aminoácidos (aa) de la P-selectina, que es el fragmento aa 60-75 (de Cis a Glu), realizando el recuento con arreglo a la secuencia Swiss-Prot P16109 que incluye la secuencia de señal. El documento WO 93/21956 se refiere a anticuerpos monoclonales de ratón contra la P-selectina y a anticuerpos humanizados del subgrupo IgG1 que compiten con un anticuerpo definido y se fijan en presencia del fragmento de la P-selectina (aa 60-75) y en ausencia de iones calcio. Ninguno de los anticuerpos monoclonales de ratón mencionados contra la P-selectina humana es útil para el tratamiento de pacientes humanos. Actualmente se halla en fase de desarrollo preclínico un anticuerpo humanizado contra la P-selectina del subgrupo IgG1 humano, mencionado en el documento WO 93/21956 (www.mrctechology.org).

Resumen de la invención

La invención se refiere a anticuerpos caracterizados porque dichos anticuerpos fijan la P-selectina y no fija el factor de complemento Clq humano. Los anticuerpos tampoco fijan con preferencia el receptor Fcγ sobre células NK. Los anticuerpos de la invención contienen una parte Fc derivada de un origen humano. Estos anticuerpos son con preferencia anticuerpos humanizados o humanos. Los anticuerpos tienen propiedades nuevas y susceptibles de invención, que producen un beneficio a un paciente que sufra trastornos inflamatorios y trombóticos, que sufra en especial la enfermedad oclusiva de arterias periféricas (PAOD) y la isquemia crítica de extremidades (CLI).

81

Breve descripción de las figuras

En la figura 1 se muestra que los anticuerpos de la invención inhiben la adhesión de las células HL60, similares a los leucocitos, sobre placas de microvaloración recubiertas con P-selectina purificada.

En la figura 2 se representa la actividad inhibidora de los anticuerpos de la invención en los ensayos de roseteado para medir la adhesión de plaquetas activadas con trombina sobre las células HL60.

En las figuras 3a y 3b se representa la actividad cruzada de los anticuerpos de la invención con la P-selectina de rata y cinomóloga. Según la figura 3a, los anticuerpos anti-P-selectina no afectan la adhesión de las plaquetas de rata activadas con trombina sobre las células HL60, mientras que los anticuerpos anti-P-selectina policlonales disponibles comercialmente (Pharmingen 09361A) inhiben esta interacción. Según la figura 3b, los anticuerpos de la invención inhiben la adhesión de las plaquetas cinomólogas activadas sobre las células HL60.

En las figuras 4a-c se pone de manifiesto la selectividad de los anticuerpos de la P-selectina frente a la E- y la L-selectina mediante curvas representativas de la fijación sobre transfectantes de P-, E- y L-selectina. Los anticuerpos de la invención se fijan sobre células CHO de P-selectina, con valores EC_{50} se sitúan en el margen de 0,01 a 0,07 $\mu\text{g/ml}$. Los valores sobre células CHO de E-selectina y sobre células 300.19 de L-selectina se sitúan con preferencia por encima de los 100 $\mu\text{g/ml}$.

En la figura 5 se representa la actividad inhibidora de los anticuerpos de la invención en un sistema de flujo totalmente humano. Inhiben la adhesión de los leucocitos humanos a una monocapa de plaquetas de una manera dependiente de la concentración en una velocidad de cizallamiento de 65/s.

En la figura 6 se representa el efecto inhibidor de los anticuerpos de la invención en la adhesión de los leucocitos sobre las células endoteliales humanas que expresan la P-selectina. En la figura 6a se pone de manifiesto la inhibición total de la adhesión de leucocitos en % del control, en la figura 6b se pone de manifiesto de modo representativo el efecto inhibidor de uno de los anticuerpos en el número absoluto de diferentes subgrupos de leucocitos.

15 Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

El término "P-selectina" indica una proteína de 140 kDa, expresada por plaquetas y células endoteliales humanas, según han descrito Hsu-Lin y col., J. Biol. Chem. 259: 9121 (1984), y Mc Ever y col., J. Clin. Invest. 84:92 (1989). Esta glucoproteína transmembrana de tipo I se compone de un dominio lectina con grupos NH₂ terminales, seguido por un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y nueve dominios de repetición de consenso. Está anclada en la 25 membrana mediante un solo dominio transmembrana y contiene una pequeña cola citoplásmica. La presente invención proporciona anticuerpos, que son capaces de inhibir una o varias actividades biológicas mediadas por la P-selectina, por

ejemplo, su actividad inflamatoria o trombótica. Los anticuerpos se fijan sobre la P-selectina y actúan de modo que interfieren en la fijación de la P-selectina sobre su ligando.

5 El término "ligando de P-selectina" denota con preferencia el ligando de gran afinidad y biológicamente relevante de la P-selectina, por ejemplo el ligando glucoproteína-1 de P-selectina (PSGL-1), una glucoproteína similar a la mucina, descrita por Moore y col.; J. Cell. Biol. 118:2445 (1992),
10 Sako y col., Cell 75:1179 (1993). El PSGL-1 es una proteína membrana de tipo I con un dominio extracelular rico en serinas, treoninas y prolinas, que incluye una serie de repeticiones decaméricas unidas a racimos de O-glucanos sialilados. Se expresa normalmente como homodímero de dos
15 subunidades unidas mediante un disulfuro, con pesos moleculares relativos aproximados de 120 kDa, por los leucocitos circulantes. El lugar de fijación de la P-selectina se localiza en la parte del extremo con grupos terminales NH₂ del PSGL-1. Recientemente se ha demostrado que
20 la sialomucina GPIb α que se expresa por las plaquetas y tiene semejanzas estructurales con el PSGL-1 es un ligando plaquetario para la P-selectina (Romo y col., J. Exp. Med. 190:803 (1999). Las consecuencias fisiológicas de la fijación de la GPIb α sobre la P-selectina se hallan todavía en
25 investigación, pero es probable que la interacción contribuya a la rodadura y adherencia de las plaquetas sobre las células endoteliales activadas (Berndt y col., Thromb. Haemost. 86:178 (2001). La P-selectina se fija también con poca afi-

nidad sobre oligosacáridos pequeños, sialilados, fucosilados, por ejemplo el sialil-Lewis x (Foxall y col., J. Cell. Biol. 117:895 (1992), Varki, Curr. Opin. Cell. Biol. 257 (1992) y sobre hidratos de carbono sulfatados concretos, por ejemplo
5 el sulfato de heparina (McEver y col., J. Biol. Chem. 270:11025 (1995)).

El término "anticuerpo" abarca las distintas formas de anticuerpos, con preferencia los anticuerpos monoclonales que incluyen, pero no se limitan a anticuerpos completos, frag-
10 mentos de anticuerpo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos de ingeniería genética (anticuerpos variantes o mutantes), en el supuesto de que se mantengan las propiedades características según la invención. Son preferidos en especial los anticuerpos
15 monoclonales humanos o humanizados, sobre todo en forma de anticuerpos humanos recombinantes.

Los términos "anticuerpo monoclonal" y "composición de anticuerpos monoclonales" utilizados en la presente invención se refieren a la obtención de moléculas de anticuerpo de una
20 sola composición de aminoácidos.

El término "anticuerpo quimérico" denota un anticuerpo monoclonal que contiene una región variable, es decir, una región de fijación, de una fuente o especie y por lo menos una porción de una región constante derivada de una fuente o
25 especie diferente, obtenida por lo general mediante técnicas de DNA recombinante. Son preferidos en especial los anticuerpos quiméricos que contienen una región variable murina y una región constante humana. Dichos anticuerpos quiméricos

83

murino/humanos son el producto de los genes de inmunoglobulina expresados que contienen segmentos de DNA que codifican regiones variables de inmunoglobulina murina y segmentos de DNA que codifican regiones constantes de inmunoglobulina humana. Otras formas de "anticuerpos quiméricos" contemplados por la presente invención son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado con respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, en especial en lo que respecta a la fijación del Clq y/o a la fijación del receptor Fc (FcR). Tales anticuerpos "quiméricos" se denominan también "anticuerpos desviados de grupo" (class-switched antibodies). Los métodos para la obtención de anticuerpos quiméricos incluyen las técnicas convencionales de DNA recombinante y de transfección genética, que son bien conocidas en la técnica anterior. Véase, p.ej. Morrison, S.L., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; patentes US-5,202,238 y 5,204,244.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que se han modificado el armazón o las "regiones que determinan la complementariedad" (CDR) para abarcar la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente si se compara con la de la inmunoglobulina original. En una forma preferida de ejecución se injerta una CDR murina en la región de armazón de un anticuerpo humano para obtener el "anticuerpo humanizado". Véase, p.ej. Riechmann, L. y col., Nature 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S. y col., Nature 314 (1985) 268-270. Las CDR especialmente

86

84

preferidas corresponden a aquellas que representan secuencias que reconocen los antígenos mencionados anteriormente de los anticuerpos quiméricos y bifuncionales. Otras formas de "anticuerpo humanizados" contempladas por la presente invención son aquellas en las que la región constante del anticuerpo original se ha modificado o cambiado para generar las propiedades según la invención, en especial en lo tocante a la fijación del Clq y/o a la fijación del receptor Fc (FcR).

El término "anticuerpo humano", utilizado en la descripción, tiene un significado que incluye anticuerpos provistos de regiones variables y constantes, derivados de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368 (2001)). Los anticuerpos humanos pueden producirse también en animales transgénicos (p.ej. ratones) que sean capaces, después de la inmunización, de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de la producción endógena de inmunoglobulina. La transferencia del conjunto genético de la inmunoglobulina de línea germinal humana a dichos ratones mutantes de línea germinal se traducirá en la producción de anticuerpos humanos después del reto de los antígenos (véase, p.ej. Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551-2555 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann y col., Year in Immuno., 7:33 (1993)). Los anticuerpos humanos pueden producirse también en bibliotecas de despliegue de fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1992); Marks y col.,

87

85

J. Mol. Biol, 222:581 (19991)). Se dispone además de las técnicas de Cole y col. y de Boerner y col. para la obtención de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Anticuerpos monoclonales y terapia del cáncer, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner y col., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)). Tal como se ha mencionado antes a raíz de los anticuerpos quiméricos y humanizados según la invención, el término "anticuerpo humano" empleado en la descripción abarca también a los anticuerpos modificados en su región constante para generar las propiedades acordes con la invención, en especial en lo tocan a la fijación del Clq y/o a la fijación del FcR. La invención abarca además anticuerpos humanos que se fijan sobre el Clq y/o el FcR. Tales anticuerpos humanos se caracterizan por una gran selectividad con la P-selectina si se compara con la E- y la L-selectina. Tales anticuerpos según la invención se fijan sobre las células que expresan la P-selectina con valores de EC_{50} comprendidos entre 0,01 y 0,07 $\mu\text{g/ml}$. Los valores de EC_{50} en las células que expresan la E-selectina y la L-selectina se sitúan con preferencia por encima de los 100 $\mu\text{g/ml}$. Tales anticuerpos son útiles con preferencia como productos intermedios de la obtención de anticuerpos humanos provistos de propiedades acordes con la invención.

El término "anticuerpo humano recombinante", utilizado en esta descripción, tiene un significado que incluye todos los anticuerpos humanos que se obtienen, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, por ejemplo los anticuerpos aislados de una célula hospedante, como pueda ser una célula

88

76

NSO o CHO o de un animal (p.ej. un ratón) que sea transgénico para los genes de inmunoglobulina humana o los anticuerpos expresados empleando un vector de expresión recombinante transfectado a la célula hospedante. Tales anticuerpos re-
5 combinantes humanos tienen regiones variables y constantes en una forma preestablecida. Los anticuerpos recombinantes humanos según la invención se han sometido a una hipermutación somática "in vivo". Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos
10 recombinantes son secuencias que, a pesar de derivarse de y guardar relación con las secuencias VH y VL de la línea germinal humana, no pueden existir de forma natural "in vivo" dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos.

15 La "región variable" (región variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH)), tal como se utilizan en esta descripción, denota cada una de las cadenas ligera y pesada que intervienen directamente en la fijación del anticuerpo sobre el antígeno. Los dominios de
20 las cadenas ligera y pesada humanas variables tienen la misma estructura general y cada dominio consta de cuatro regiones de armazón (FR, framework) cuyas secuencias se conservan ampliamente, conectadas a tres "regiones hipervariables" (o regiones que determinan la complementariedad, CDR). Las
25 regiones de armazón adoptan una conformación de lámina β y las CDR pueden formar bucles que conecten con la estructura de lámina β . Las CDR de cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional gracias a las regiones de armazón y

89

87

junto con las CDR de la otra cadena forma un sitio de fijación de antígeno. Las regiones CDR3 de cadena ligera y pesada de anticuerpo desempeñan un papel especialmente importante en la especificidad/afinidad de fijación de los anticuerpos según la invención y por ello constituyen otro objeto de la invención.

El términos "región hipervariable" o "porción de un anticuerpo que fija un antígeno", utilizados en esta descripción, significan los restos aminoácido de un anticuerpo que hacen viable la fijación del antígeno. La región hipervariable comprende los restos aminoácido de las "regiones que determinan la complementariedad" o "CDR". Las regiones de "armazón" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable, diferentes de los restos de región hipervariable definidos en esta descripción. Por lo tanto, las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo constan, desde el extremo N al C, de los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. En especial, el dominio CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la fijación del antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan con arreglo a la definición estándar de Kabat y col. (Secuencias de proteínas de interés inmunológico, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable".

El término "ácido nucleico o molécula de ácido nucleico", utilizado en esta descripción, tiene un significado que incluye las moléculas de DNA y las moléculas de RNA. Una molécula de ácido nucleico puede tener forma mono- o

bicatenaria, pero el DNA tiene con preferencia una forma bicatenaria.

Ácido nucleico está "unido operativamente" cuando guarda una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA de una presecuencia o guía secretorio está unido operativamente al DNA de un polipéptido si se expresa como preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador está unido operativamente a una secuencia codificadora si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión de un ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificadora si está posicionado de modo que facilita la traducción. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de DNA que están unidas son contiguas y, en el caso de una guía secretorio, son contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los intensificadores no tienen que estar contiguos. La unión se lleva a cabo por ligación en los sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, entonces se utiliza adaptadores o engarces de oligonucleótidos sintéticos con arreglo a la práctica convencional.

Tal como se utilizan en esta descripción, las expresiones "célula," "línea celular" y "cultivo celular" se emplean indistintamente y todas estas denominaciones incluye la progenie. De este modo, los términos "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y los cultivos derivados de la misma, con independencia del número de transferencias. Se da también por supuesto que toda

la progenie puede que no sea exactamente idéntica en cuanto al contenido del DNA, debido a las mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie variante que tiene la misma función o la misma actividad biológica que se ha explorado en la célula transformada original. Cuando se emplean denominaciones distintas, su significado resultará claro gracias al contexto.

Los "dominios constantes" no participan directamente en la fijación de un anticuerpo sobre un antígeno, pero despliegan diversas funciones efectoras. En función de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en los grupos siguientes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de ellos pueden dividirse a su vez en subgrupos (isotipos), p.ej. IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a los diferentes grupos de inmunoglobulinas se denominan α , β , ϵ , γ y μ , respectivamente. Los anticuerpos según la invención son con preferencia del tipo IgG.

La parte Fc de un anticuerpo interviene directamente en la activación del complemento, la fijación del Clq y la fijación del receptor Fc. La influencia de un anticuerpo en el sistema de complemento depende de ciertas condiciones, mientras que la fijación sobre el Clq es provocada por sitios de fijación definidos de la parte Fc. Estos sitios de fijación ya son conocidos en el estado de la técnica y se describen p.ej. en Boakle y col., Nature 282 (1975) 742-743, Lukas y col., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560, Brunhouse y

Cebra, Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917, Burton y col., Nature 288 (1980) 338-344, Thommesen y col., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004, Idusogie y col., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184, Hezareh y col., J. Virology 75 (2001) 12161-12168, Morgan y col., Immunology 86 (1995) 319-324, EP 0307434. Dichos sitios de fijación son p.ej. L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (la numeración se realiza con arreglo al índice EU de Kabat, ver más abajo). Los anticuerpos de los subgrupos IgG1, IgG2 e IgG3 presentan por lo general activación del complemento y fijación del Clq y C3, mientras que el IgG4 no activa el sistema del complemento y no fija al Clq ni al C3. Tal como se emplea en esta descripción, el término "parte Fc derivada de origen humano" significa una parte Fc que es una parte Fc de un anticuerpo humano del subgrupo IgG4 o una parte Fc de un anticuerpo humano de los subgrupos IgG1, IgG2 o IgG3 que se ha modificado de manera que no puede detectarse una fijación de Clq ni fijación de FcR definidas a continuación. Una "parte Fc de un anticuerpo" es un término bien conocido de los expertos en la materia y que se define en base a la rotura de anticuerpos con papaína. Los anticuerpos según la invención contienen como parte Fc una parte Fc derivada de un origen humano y con preferencia las partes restantes de regiones constantes humanas. La parte Fc es con preferencia una parte Fc humana y de forma especialmente preferida es de un subgrupo IgG4 humano o una parte Fc mutada de un subgrupo IgG1 humano. De forma muy especialmente preferida, las partes Fc y las regiones

constantes de cadena pesada son las representadas en la SEQ ID NO: 25-28 o en la SEQ ID NO: 25 sin la mutación PVA236.

II. Formas de ejecución preferidas de la invención

La invención comprende un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina caracterizado porque la secuencia CDR3 de aminoácidos de cadena pesada variable de dicho anticuerpo se elige entre el grupo formado por las secuencias CDR3 de cadena pesada SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41 o 42.

La invención proporciona con preferencia un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, que consta de una cadena pesada variable y una cadena ligera variable, caracterizado porque la cadena pesada variable contiene las secuencias CDR siguientes: CDR1, CDR2 y CDR3 y la CDR1 se eligen entre el grupo formado por las SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32; la CDR2 se elige entre el grupo formado por las SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37; la CDR3 se elige entre el grupo formado por las SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41, 42; dichas CDR se eligen con independencia entre sí.

El anticuerpo según la invención está caracterizado con preferencia porque la cadena ligera variable contiene las secuencias CDR siguientes: CDR1, CDR2 y CDR3; y la CDR1 se elige entre las SEQ ID NO: 43, 44; la CDR2 se elige entre las SEQ ID NO: 45, 46; y la CDR3 se elige entre las SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50, 51, 52; dichas CDR se eligen con independencia entre sí.

El anticuerpo está caracterizado con preferencia porque, como CDR de cadena pesada, contiene las CDR de la SEQ ID NO: 2 y como CDR de cadena ligera contiene las CDR de la

91

91

SEQ ID NO: 1; como CDR de cadena pesada contiene las CDR de la SEQ ID NO: 4 y como CDR de cadena ligera contiene las CDR de la SEQ ID NO: 3, como CDR de cadena pesada contiene las CDR de la SEQ ID NO: 6 y como CDR de cadena ligera contiene las CDR de la SEQ ID NO: 5, como CDR de cadena pesada contiene las CDR de la SEQ ID NO: 8 y como CDR de cadena ligera contiene las CDR de la SEQ ID NO: 7, como CDR de cadena pesada contiene las CDR de la SEQ ID NO: 10 y como CDR de cadena ligera contiene las CDR de la SEQ ID NO: 9, como CDR de cadena pesada contiene las CDR de la SEQ ID NO: 12 y como CDR de cadena ligera contiene las CDR de la SEQ ID NO: 11, como CDR de cadena pesada contiene las CDR de la SEQ ID NO: 14 y como CDR de cadena ligera contiene las CDR de la SEQ ID NO: 13, como CDR de cadena pesada contiene las CDR de la SEQ ID NO: 16 y como CDR de cadena ligera contiene las CDR de la SEQ ID NO: 15, como CDR de cadena pesada contiene las CDR de la SEQ ID NO: 18 y como CDR de cadena ligera contiene las CDR de la SEQ ID NO: 17, como CDR de cadena pesada contiene las CDR de la SEQ ID NO: 20 y como CDR de cadena ligera contiene las CDR de la SEQ ID NO: 19, o como CDR de cadena pesada contiene las CDR de la SEQ ID NO: 22 y como CDR de cadena ligera contiene las CDR de la SEQ ID NO: 21.

Las secuencias CDR pueden determinarse con arreglo a la definición estándar de Kabat y col., Secuencias de proteínas de interés inmunológico, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Las CDR de cada cadena están separadas por los aminoácidos de

armazón. Las CDR de las SEQ ID NO: 1-22 se muestran en las SEQ ID NO: 29-52.

- El anticuerpo según la invención está caracterizado con preferencia porque dicho anticuerpo fija la P-selectina y
- 5 consta de una región pesada y una ligera variables que con independencia entre sí se eligen entre el grupo formado por
- a) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 1;
 - 10 b) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 3;
 - c) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 y el dominio variable
 - 15 de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 5;
 - d) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 7;
 - e) el dominio variable de cadena pesada definido por la
 - 20 secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 9;
 - f) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 11;
 - 25 g) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 13;

- h) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 15;
- 5 i) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 17;
- j) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 19; y
- 10 k) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 21.

El anticuerpo según la invención está caracterizado con preferencia porque la región variable de cadena pesada
15 contiene una secuencia de aminoácidos que se elige con independencia entre el grupo formado por las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22.

El anticuerpo según la invención está caracterizado con preferencia porque la región variable de cadena ligera
20 contiene una secuencia de aminoácidos que se elige con independencia entre el grupo formado por las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21.

La presente invención se refiere a un anticuerpo que fija la P-selectina y no fija el factor de complemento Clq ni
25 el receptor Fc. Estos anticuerpos no emanan la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) ni la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Este anticuerpo está caracterizado con preferencia porque fija la P-selectina,

95
contiene una parte Fc derivada de un origen humano y no fija el factor de complemento Clq. Con mayor preferencia, este anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado.

El anticuerpo según la invención está caracterizado con
5 preferencia porque las cadenas constantes son de origen humano. Tales cadenas constantes son bien conocidas en el estado de la técnica y se describen p.ej. en Kabat (véase p.ej. Johnson, G. y Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218). Por ejemplo, una región constante de cadena pesada
10 humana útil contiene una secuencia de aminoácidos elegida con independencia entre el grupo formado por las SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27 y 28. Por ejemplo una región constante de cadena ligera humana útil contiene una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera kappa de la SEQ ID NO:
15 23.

Las funciones efectoras mediadas por la parte Fc de la región Fc del anticuerpo se refieren a las funciones efectores que actúan después de la fijación de un anticuerpo sobre un antígeno (estas funciones incluyen la activación de
20 la cascada del complemento y/o la activación celular por parte del receptor Fc (FcR)).

La función de la cascada del complemento puede evaluarse mediante un ensayo CH50. Se añaden glóbulos rojos de oveja, sensibilizados con anticuerpos anti-glóbulos rojos
25 (EA), al suero de ensayo para activar el mecanismo clásico que provoca la hemólisis. El volumen de suero que se necesita para producir la lisis del 50 % de los glóbulos rojos constituye la unidad de CH50. El AP-CH50 mide los mecanismos alter-

9E

nativo y el terminal. El procedimiento es similar pero ahora se utilizan glóbulos rojos de conejo. El mecanismo alternativo se activa con la adición del suero de ensayo.

El Clq y dos proteasas de serina, C1r y C1s, forman el complejo C1, el primer componente del mecanismo de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Para activar la cascada del complemento, el Clq se fija por lo menos sobre dos moléculas de IgG1 o una molécula de IgM, unidas a la diana antigénica (Ward y Ghetie, Therapeutic Immunology 2:77-94 (1995)). Burton describe (Molec. Immunol., 22(3):161-206 (1985)) que la región de cadena pesada que contiene los restos de aminoácidos de 318 a 337 interviene en la fijación del complemento. Duncan y Winter (Nature 332:738-40 (1988)), aplicando una mutagénesis dirigida a un sitio, describen que el Glu318, Lis320 y Lis322 forman el sitio de fijación para el Clq. El papel que desempeñan los restos Glu318, Lis320 y Lis 322 en la fijación del Clq se confirma con la capacidad que tiene un péptido sintético corto, que contiene estos restos, de inhibir la lisis mediada por el complemento.

El término "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" se refiere a la lisis de la P-selectina que se expresa en células endoteliales y plaquetas humanas por acción del anticuerpo según la invención en presencia del complemento. La CDC se mide con preferencia tratando la P-selectina que se expresa en células endoteliales y plaquetas humanas con un anticuerpo según la invención en presencia del complemento. Las células se marcan preferentemente con calceína. Se observa CDC si el anticuerpo induce la lisis del 20% o más de

96

99

97

las células diana en una concentración de 30 µg/ml. Sin embargo, los inventores han encontrado que para las propiedades de los anticuerpos según la invención es esencial una fijación reducida sobre el factor de complemento Clq en un ensayo ELISA. En tal ensayo se recubre en principio una placa ELISA con una serie de concentraciones del anticuerpo, al que se ha añadido Clq humano purificado o suero humano. La fijación del Clq se detecta mediante un anticuerpo dirigido contra el Clq y después mediante un conjugado marcado con peroxidasa. La detección de la fijación (fijación máxima: Bmax) se mide en forma de densidad óptica a 405 nm (OD405) para el sustrato ABTS (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (6)] de peroxidasa. La presente invención se refiere, pues, a un anticuerpo caracterizado porque la fijación del anticuerpo sobre el factor de complemento Clq se refiere a la medición mediante ensayo ELISA, en el que la fijación máxima (Bmax) del Clq sobre el anticuerpo en una concentración de 10 µg/ml del anticuerpo es ≤ 30% de la Bmax del anticuerpo LC 1004-002 de la línea celular hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641), con preferencia es un 20% o menos.

Es preferido además que un anticuerpo según la invención tenga una fijación reducida sobre el factor de complemento C3 en un ensayo ELISA. Este ensayo se lleva a cabo de igual manera que el ensayo del Clq. En tal ensayo, en principio se recubre la placa ELISA con una serie de concentraciones del anticuerpo, al que se añade C3 humano purificado o suero humano. La fijación del C3 se detecta

100

98

mediante un anticuerpo dirigido contra el C3 y después con un conjugado marcado con peroxidasa. La detección de la fijación (fijación máxima: Bmax) se mide en forma de densidad óptica a 405 nm (OD405) para el sustrato ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolinasulfonato (6)] de peroxidasa. La presente invención se refiere, pues, a un anticuerpo caracterizado porque la no fijación del anticuerpo al factor de complemento C3 se refiere a una medición mediante ensayo ELISA en el que la fijación máxima (Bmax) del C3 sobre el anticuerpo en una

10 concentración de 10 µg/ml del anticuerpo es un 10% de la Bmax del anticuerpo LC 1004-002 de la línea celular hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641), con preferencia un 5% o menos.

El término "citotoxicidad celular dependiente del

15 anticuerpo (ADCC)" es una función mediada por la fijación del receptor Fc y se refiere a la lisis de células diana en las que se expresa la P-selectina mediante un anticuerpo según la invención en presencia de las células efectoras. La ADCC se mide con preferencia tratando una preparación de células

20 endoteliales en las que se expresa la P-selectina con un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras, por ejemplo células PBMC (células mononucleares de sangre periférica) recién aisladas o células efectoras purificadas de recubrimientos pulidos, como son los monocitos

25 y las células asesinas naturales (NK, natural killer). Las células diana se marcan con Cr⁵¹ y seguidamente se incuban con los anticuerpos. Se incuban las células marcadas junto con células efectoras y se analiza el líquido sobrenadante

101

para determinar el Cr^{51} liberado. Los controles incluyen la incubación de las células endoteliales diana con células efectoras, pero sin el anticuerpo. La capacidad de los anticuerpos de inducir las etapas iniciales que median la

5 ADCC se determina midiendo su fijación sobre las células en las que se expresan los receptores $\text{Fc}\gamma$, por ejemplo los granulocitos (en los que se expresan el $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ y RIII), las células NK (en las que se expresan $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$) y los monocitos (en los que se expresan el $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ y RII).

10 Las funciones efectoras de fijación del receptor Fc pueden mediar con la interacción de la región Fc de un anticuerpo con receptores Fc (FcR), que son receptores de superficie especializados en células hematopoyéticas. Los receptores Fc pertenecen a la superfamilia de las inmunoglo-

15 bulinas y se ha constatado que intervienen tanto en la eliminación de patógenos recubiertos con anticuerpos por fagocitosis de complejos inmunes, como en la lisis de eritrocitos y diversas dianas celulares más (p.ej. células tumorales) recubiertos con los anticuerpos correspondiente,

20 gracias a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), véase Van de Winkel y Anderson, J. Leuk. Biol. 49:511-24 (1991). Los FcR se definen por su especificidad para los isotipos de inmunoglobulina; los receptores Fc de los anticuerpos IgG anticuerpos se denominan $\text{Fc}\gamma\text{R}$, de los IgE se llaman $\text{Fc}\epsilon\text{R}$, de los IgA se llaman $\text{Fc}\alpha\text{R}$, etcétera. La

25 fijación del receptor Fc se describe p.ej. en Ravetch y Kinet, Ann. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492, Capel y col., Immunomethods 4 (1994) 32-34, de Has y col., J. Lab. Clin.

Med. 126 (1995) 330-341 y Gessner y col., Ann. Hematol. 76 (1998) 231-248. Los anticuerpos según la invención presentan con preferencia una fijación reducida sobre los receptores Fcγ, con preferencia sobre los FcγRI, -IIA, -IIB y/o IIIA.

5 Los anticuerpos según la presente invención anticuerpos no despliegan con preferencia función efectora alguna y no se fijan sobre el FcγR existente en las células NK. El término "no fijación del FcγR" significa, pues, que en una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml la fijación de un
10 anticuerpo según la invención sobre células NK es del 1% o menos con respecto a la fijación observada para el anticuerpo LC 1004-002 de la línea celular hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641).

El IgG4 muestra una fijación reducida al FcR, pero los
15 anticuerpos de otros subgrupos IgG despliegan una fijación fuerte. Sin embargo, los restos Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida de hidrato de carbono de Fc), Pro329 y 234, 235, 236 y 237, Ile253, Ser254, Lis288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435 son restos que, si se alteran, proporcionan
20 también una fijación reducida sobre el FcR (Shields y col., J. Biol. Chem. 276 (2001), 6591-6604, Lund y col., FASEB J. 9 (1995), 115-119, Morgan y col., Immunology 86 (1995) 319-324, EP 0307434). Un anticuerpo según la invención es con preferencia, en lo que respecta a la fijación sobre el FcR,
25 del subgrupo IgG4 o de los subgrupos IgG1 o IgG2 con una mutación en S228, L234, L235 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236 o GLPSS331. Son especialmente preferidas las mutaciones S228P (IgG4), L234A (IgG1), L235A (IgG1), L235E

100

102

(IgG4), GLPSS331 (IgG1) y/o PVA236 (IgG1). En la tabla 1 se presentan también las combinaciones preferidas de mutaciones. Una combinación adicional también preferida es la D265A/N297A.

5 El término "fijación sobre la P-selectina" empleado en esta descripción indica la fijación del anticuerpo sobre la P-selectina ya sea en un ensayo BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Upsala, Suecia), ya sea en un ensayo ELISA en el que las placas de microvaloración se recubren con P-selectina
10 purificada o con transfectantes CHO de P-selectina.

En el ensayo BIAcore se fija el anticuerpo sobre una superficie y se mide la fijación de la P-selectina mediante una Surface Plasmon Resonance (SPR). La afinidad de la fijación se define en términos k_a (constante de la asociación
15 del anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno), k_d (constante de disociación) y K_D (k_d/k_a). Los anticuerpos según la invención poseen un valor K_D de 10^{-8} o menos, con preferencia entre 10^{-11} y 10^{-9} M (ver ejemplos). La presente invención se refiere, pues, a un anticuerpo ya descrito anteriormente,
20 dicho anticuerpo se fija sobre la P-selectina con un valor K_D inferior a 10^{-8} M en un ensayo BIAcore, el valor K_D se sitúa con preferencia entre 10^{-11} y 10^{-9} M.

El anticuerpo es con preferencia de un subtipo IgG1 o IgG4 humano.

25 El anticuerpo está caracterizado con mayor preferencia porque ser un anticuerpo del subgrupo IgG1 humano, que contiene por lo menos una mutación en L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y/o P329 o un anticuerpo del subgrupo

101

104

IgG4 humano, que lleva por lo menos una mutación en L235 y S228 (numeración con arreglo al índice EU).

En el ensayo ELISA específico de la P-selectina, se recubren con P-selectina purificada las placas de microva-
5 loración y se detecta la fijación del anticuerpo sobre la P-selectina con un IgG biotinilado antihumano y las etapas usuales de un ELISA. Los valores de la EC_{50} en este ensayo se sitúan con preferencia entre 0,002 y 0,03 $\mu\text{g/ml}$ en células CHO de P-selectina, es decir, la presente invención se
10 refiere a anticuerpos, cuyos valores EC_{50} para la fijación sobre la P-selectina se sitúan en el margen comprendido entre 0,002 y 0,03 $\mu\text{g/ml}$ en células CHO que presentan P-selectina en un ensayo ELISA. En un ensayo, en el que se recubren las placas de microvaloración con transfectantes CHO en los que
15 se expresa la P-selectina, los valores de EC_{50} se sitúan entre 0,01 y 0,08 $\mu\text{g/ml}$, con preferencia entre 0,01 y 0,04 $\mu\text{g/ml}$.

Los valores de EC_{50} en los transfectantes de E- y L-selectina son con preferencia superiores a 100 $\mu\text{g/ml}$. Los
20 anticuerpos de la presente invención están caracterizados porque se fijan por lo menos con una especificidad 1000 mayor sobre la P-selectina que sobre la E- y/o L-selectina en base a los valores EC_{50} medidos en un ensayo ELISA, en el que las placas de microvaloración se recubren con P- y E- y/o L-
25 selectina.

El término "inhibición de la fijación del ligando de la P-selectina sobre la P-selectina" empleado en esta descripción indica la fijación de la P-selectina purificada o

102

105

expresada en células sobre su ligando, presente en células HL60. La fijación de la P-selectina sobre su ligando se inhibe mediante los anticuerpos según la invención. La inhibición se mide en forma de IC_{50} en ensayos "in vitro" que
5 analizan la capacidad del anticuerpo de inhibir la fijación de la P-selectina sobre un ligando. Tales ensayos se describen en los ejemplos. Como fuentes idóneas de P-selectina se emplean en los ejemplos la P-selectina purificada por afinidad y plaquetas activadas y como fuentes idóneas de
10 ligando se emplean células de tipo leucocito, por ejemplo células HL60. En tales ensayos se mide la adhesión de las células HL60, en las que se expresa el PSGL-1 como ligando fisiológicamente relevante de la P-selectina, sobre la P-selectina o plaquetas activadas sin y con concentraciones
15 crecientes del anticuerpo. Los valores IC_{50} se determinan como valores promedio por lo menos de tres mediciones independientes. La inhibición significa un valor IC_{50} no superior a 1 $\mu g/ml$, con preferencia entre 0,5 y 0,08 $\mu g/ml$.

Los anticuerpos de la presente invención inhiben la
20 adhesión de células HL60 de tipo leucocito sobre la P-selectina purificada con valores IC_{50} comprendidos entre 0,08 y 0,5 $\mu g/ml$, con preferencia entre 0,08 y 0,11 $\mu g/ml$. La adhesión de células HL60 de tipo leucocito sobre plaquetas activadas se inhibe con valores IC_{50} comprendidos entre 0,05
25 y 0,3 $\mu g/ml$.

Otras formas de ejecución de la presente invención se refieren, pues, a anticuerpos caracterizados porque los valores EC_{50} de la fijación de la P-selectina se sitúan entre

0,01 y 0,08 µg/ml en un ensayo ELISA en el que las placas de microvaloración se recubren con transfectantes CHO en los que se expresa la P-selectina. El margen preferido se sitúa entre 0,01 y 0,04 µg/ml. Los valores EC50 en transfectantes de E- y L-selectina son mayores que 100 µg/ml. En otra forma de ejecución, los anticuerpos de la presente invención inhiben la adhesión de células HL60 de tipo leucocito sobre P-selectina purificada con valores IC50 comprendidos entre 0,08 y 0,5 µg/ml. El intervalo preferido se sitúa entre 0,08 y 0,11 µg/ml.

Los anticuerpos de la presente invención inhiben la interacción de los leucocitos y una monocapa de plaquetas con preferencia en más del 70% en un sistema de flujo humano complejo (en una concentración de 10 µg/ml). Además, estos anticuerpos inhiben la adhesión de los leucocitos sobre células endoteliales activadas en un sistema de flujo humano en un orden del 60-90 % en una concentración de 3 µg/ml (con efectos diferentes según los subtipos de leucocitos).

Los anticuerpos de la presente invención son capaces con preferencia de fijarse sobre la P-selectina en presencia del fragmento aa 60-75 de P-selectina (Swiss-Prot secuencia P16109) y/o no inhiben competitivamente la fijación de un anticuerpo secretado por una línea celular designada con el número de entrada (accession) ATCC HB11041 sobre la P-selectina.

Los anticuerpos de la invención con preferencia no inhiben la interacción de la P-selectina la glucoproteína de membrana de plaqueta GPIbα en un formato de ensayo ELISA. En

105

el ensayo ELISA, la glucocalicina, la porción extracelular soluble de la GPIIb está inmovilizada en los hoyos de las placas de microvaloración, tal como se ha descrito en Romo y col., J. Exp. Med. 190:803 (1999) y la fijación de la P-selectina purificada después de la preincubación con la P-selectina HuMabs se detecta con un anticuerpo anti-P-selectina policlonal.

En otra forma preferida de ejecución de la presente invención, el anticuerpo, caracterizado porque no fija la proteína C3, está caracterizado con mayor preferencia porque no despliega citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Además, el anticuerpo puede caracterizarse porque no se fija sobre los receptores Fcy de las células efectoras NK. El anticuerpo está caracterizado porque es un anticuerpo del subgrupo IgG1 humano, que contiene por lo menos una mutación en los restos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y/o P329 o un anticuerpo del subgrupo IgG4 humano, que lleva por lo menos una mutación en los restos L235 y S228 (numeración con arreglo al índice EU). En otra forma preferida de ejecución, el anticuerpo está caracterizado porque no despliega citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC).

En otra forma incluso más preferida de ejecución, los anticuerpos de la presente invención están caracterizados porque fijan la P-selectina y porque llevan una región variable, que se elige con independencia entre el grupo formado por:

105

- a) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 2;
- b) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 4;
- c) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 6;
- 10 d) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 8;
- e) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 10;
- 15 f) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 12;
- g) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 14;
- 20 h) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 15 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 16;
- i) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 18;
- 25

- j) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 20; y
- k) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 22.

Los anticuerpos contienen con preferencia el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 4.

Los anticuerpos preferidos están caracterizados porque los anticuerpos son del subgrupo IgG4 humano o llevan por lo menos una mutación de aminoácido que provoca la no fijación sobre el factor de complemento Clq. Estos anticuerpos variantes llevan por ejemplo la secuencia de aminoácidos elegida con independencia entre el grupo formado por la SEQ ID NO: 25 o la SEQ ID NO: 26 y la SEQ ID NO: 28.

Un anticuerpo anti-P-selectina "variante" significa en este caso una molécula que difiere en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-P-selectina "original" en virtud de la adición, delección y/o sustitución de uno o varios restos de aminoácido en la secuencia del anticuerpo original. En la forma preferida de ejecución, la variante comprende una o varias sustituciones de aminoácidos en una o varias regiones variables o constantes del anticuerpo original, con preferencia en la región constante. Por ejemplo, la variante puede comprender por lo menos una, p.ej. de una a diez y con preferencia de dos a

cinco sustituciones en una o varias regiones variables del anticuerpo original. Normalmente, la variante tendrá una secuencia de aminoácidos provista por lo menos de un 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias de dominio constante y/o variable del anticuerpo original, con mayor preferencia por lo menos un 95% y con preferencia especial por lo menos un 99%.

La identidad u homología con respecto a esta secuencia se defina en esta descripción como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos con los restos del anticuerpo original, después de alinear las secuencias e introducir brechas (gaps), si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo en la identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, deleciones o inserciones N-terminales, C-terminales o internas de la secuencia del anticuerpo debería diseñarse para afectar la identidad u homología de secuencias. La variante conserva la capacidad de fijar la P-selectina humana y tiene con preferencia propiedades, que son superiores a las del anticuerpo original. Por ejemplo, la variante puede tener una afinidad de fijación más fuerte, una capacidad mayor de tratar una enfermedad asociada con la isquemia crítica de extremidades o la enfermedad oclusiva de arterias periféricas (CLI/PAOD).

El anticuerpo variante de interés especial en esta solicitud es un que despliega por lo menos una intensificación 4 veces mayor de la actividad inhibidora, si se compara con el anticuerpo original, debido a la eliminación de la fijación sobre los receptores Fcγ.

El anticuerpo "original" de esta descripción es uno que, se codifica mediante una secuencia de aminoácidos empleada para la preparación de la variante. El anticuerpo original tiene con preferencia una región de armazón humana y, si está presente, tiene regiones constantes de anticuerpo humano. Por ejemplo, el anticuerpo original puede ser un anticuerpo humano o humanizado.

Los anticuerpos según la invención incluyen, además, aquellos anticuerpos que tienen "modificaciones de secuencias conservadoras", modificaciones de nucleótidos y de secuencia de aminoácidos, que no afectan ni alteran las características mencionadas anteriormente del anticuerpo según la invención. Las modificaciones pueden introducirse por métodos estándar ya conocidos en la técnica, por ejemplo la mutagénesis dirigida a un sitio y la mutagénesis mediada por la PCR. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen aquellas en las que se reemplaza el resto aminoácido por otro resto aminoácido que contiene una cadena lateral similar. En la técnica ya se han definido los grupos de restos de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estos grupos incluyen los aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas (p.ej. lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p.ej. ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p.ej. glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (p.ej. alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en beta (p.ej.

110

treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p.ej. tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un resto aminoácido no esencial previsto en un anticuerpo anti-P-selectina humano puede reemplazarse con
5 preferencia por otro resto aminoácido del mismo grupo de cadenas laterales.

Las sustituciones de aminoácidos pueden llevarse a cabo con preferencia por mutagénesis basada en un modelado molecular, descrito por Riechmann, L. y col., Nature 332 (1988)
10 323-327 y Queen, C. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033.

En otra forma preferida de ejecución, los anticuerpos contienen una región constante de cadena ligera κ como la definida en la SEQ ID NO: 23.

15 Los anticuerpos preferidos según la invención son anticuerpos definidos como IgG1v1 (PVA-236; GLPSS331 especificado con E233P; L234V; L235A; delta G236; A327G; A330S; P331S), IgG1v2 (L234A; L235A) e IgG4v1 (S228P; L235E).

En otra forma preferida de ejecución, estos anticuerpos
20 contienen además fragmentos de anticuerpo seleccionados entre el grupo formado por Fab, F(ab')₂ y fragmentos de cadena simple.

La invención se refiere además a un método para la producción de un anticuerpo según la invención que consiste
25 en las etapas siguientes: a) transformar una célula hospedante con una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo humano original según la invención y una segunda secuencia de DNA que

113

codifica una cadena pesada de dicho anticuerpo humano original, en el que la parte Fc se modifica en el sentido de que dicha parte Fc no fija el factor de complemento Clq ni el receptor Fc; b) expresar dichas secuencias primera y segunda
5 de DNA de modo que se produzcan dichas cadenas ligera y pesada de anticuerpo y c) recuperar dicho anticuerpo de la célula hospedante o del cultivo de células hospedantes.

La invención se refiere también a anticuerpos intermedios, es decir, anticuerpos anti-P-selectina caracterizados
10 porque estos anticuerpos son anticuerpos humanos o humanizados y se fijan sobre la P-selectina con una especificidad por lo menos 1000 veces mayor que sobre la E- o la L-selectina, según mediciones efectuadas en ensayo ELISA, en el que las placas de microvaloración se recubren con P- y
15 E- y/o L-selectina. Estos anticuerpos son con preferencia anticuerpos IgG1 o IgG4. Estos anticuerpos pueden llevar además la secuencia de aminoácidos definida mediante la región constante de cadena pesada γ 1 de SEQ ID NO: 24 o la región constante de cadena pesada γ 4 de SEQ ID NO: 27. Estos
20 anticuerpos son con preferencia los anticuerpos producidos mediante una línea celular elegida entre el grupo formado por la hu-Mab<P-selectina>LC 1004-001 (DSM ACC2640), la hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641) y la hu-Mab<P-selectina>LC 1004-017 (DSM ACC2642).

25 Los anticuerpos según la invención incluyen además aquellos anticuerpos que tienen "modificaciones de secuencias conservadoras", modificaciones de nucleótidos y de secuencia de aminoácidos, que no afectan ni alteran las características

111

114

112

mencionadas anteriormente del anticuerpo según la invención. Las modificaciones por métodos estándar ya son conocidas en la técnica, por ejemplo la mutagénesis dirigida a un sitio y la mutagénesis mediada por la PCR. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen aquellas en las que se reemplaza el resto aminoácido por otro resto aminoácido que contiene una cadena lateral similar. En la técnica ya se han definido los grupos de restos de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estos grupos incluyen los aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas (p.ej. lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p.ej. ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p.ej. glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (p.ej. alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en beta (p.ej. treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p.ej. tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un resto aminoácido no esencial previsto en un anticuerpo anti-P-selectina humano puede reemplazarse con preferencia por otro resto aminoácido del mismo grupo de cadenas laterales.

Las sustituciones de aminoácidos pueden llevarse a cabo con preferencia por mutagénesis basada en un modelado molecular, descrito por Riechmann, L. y col., Nature 332 (1988) 323-327 y Queen, C. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033.

115

La presente invención comprende además moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo mencionado anteriormente, los vectores correspondientes que contienen estos ácidos nucleicos y la correspondiente célula hospedante para estos vectores. La invención abarca un método para la obtención de los anticuerpos que consiste en cultivar las correspondientes células hospedantes en condiciones que permitan la síntesis de dichas moléculas de anticuerpo y en recuperar dichos anticuerpos de dicho cultivo, p.ej. expresando un ácido nucleico que codifica una cadena pesada y un ácido nucleico que codifica una cadena ligera en una célula hospedante procariótica o eucariótica y recuperando dicho polipéptido de dicha célula.

Se contemplan los usos diagnóstico y terapéutico del anticuerpo. En una aplicación diagnóstica, la invención proporciona un método para determinar la presencia de la proteína P-selectina que consiste en exponer una muestra, de la que se sospecha que contiene P-selectina, a un anticuerpo anti-P-selectina y en determinar la fijación del anticuerpo sobre la muestra. Para este uso, la invención proporciona un kit que contiene el anticuerpo e instrucciones de uso del anticuerpo para detectar la proteína P-selectina.

Los anticuerpos de la presente invención son útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y trombóticas. Tales enfermedades incluyen los trastornos vasculares, por ejemplo la aterosclerosis, las trombosis arteriales, las trombosis de venas profundas, la restenosis después de una angioplastia o colocación de un catéter. Las aplicaciones

preferidas son la enfermedad oclusiva de arterias periféricas (PAOD) y la isquemia crítica de extremidades (CLI). Otras aplicaciones son el tratamiento de lesiones post-isquémicas de tejidos, mediadas por leucocitos, provocadas por infartos de miocardio, episodios isquémicos cerebrales (p.ej. apoplejía), el infarto renal y similares. Los anticuerpos son idóneos además para el tratamiento de la sepsis, de la lesión pulmonar aguda, mediada por leucocitos, y las reacciones alérgicas, por ejemplo el asma. Otras aplicaciones son la prevención del rechazo de órganos trasplantados y las enfermedades autoinmunes, incluida la artritis reumatoide. Con la inhibición de la adhesión de las células cancerosas en circulación puede prevenirse además la metástasis de tumores.

La invención proporciona además un método para el tratamiento de mamíferos que sufren los trastornos inflamatorios y trombóticos recién mencionados, en especial la PAOD y la CLI (enfermedad oclusiva de arterias periféricas e isquemia crítica de extremidades, respectivamente).

La invención proporciona además el uso de los anticuerpos anteriores para la terapia, p.ej. para la fabricación de medicamentos destinados al tratamiento de estas enfermedades.

La invención se refiere también al uso de los anticuerpos definidos anteriormente para la fabricación de una composición farmacéutica y comprende una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según la invención en una cantidad farmacéuticamente eficaz, opcionalmente junto

con un tampón y/o un adyuvante útil para la formulación de anticuerpos para fines farmacéuticos.

La invención proporciona además composiciones farmacéu-
ticas que contienen dichos anticuerpos en un excipiente
5 farmacéuticamente aceptable. En una forma de ejecución, la
composición farmacéutica puede incluirse en un artículo de
fabricación o kit:

La invención proporciona líneas celulares de hibridoma,
que producen tales anticuerpos monoclonales antagonistas,
10 p.ej. los anticuerpos originales, según la invención.

Las líneas celulares preferidas de hibridoma según la
invención, hu-Mab<P-selectina>LC 1004-001 (anticuerpo HuMab
001) hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (anticuerpo HuMab 002) y
hu-Mab<P-selectina>LC 1004-017 (anticuerpo HuMab 017) se han
15 depositado, con arreglo al Tratado de Budapest sobre el
reconocimiento internacional del depósito de microorganismos,
para los fines del procedimiento de patente en la Colección
Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (Deutsche
Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ),
20 Alemania.

Línea celular	n° depósito	fecha depósito
hu-Mab<P-selectina>LC 1004-001	DSM ACC2640	30.03.2004
hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002	DSM ACC2641	30.03.2004
hu-Mab<P-selectina>LC 1004-017	DSM ACC2642	30.03.2004

Los anticuerpos que pueden obtenerse a partir de dichas
líneas celulares son formas de ejecución preferidas de la
invención.

Los anticuerpos según la invención se producen con preferencia por medios recombinantes. Tales métodos son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y consisten en la expresión de la proteína en células procarióticas y eucarióticas y el posterior aislamiento del polipéptido del anticuerpo y normalmente en la purificación para obtener una pureza farmacéuticamente aceptable: Para la expresión de la proteína se insertan ácidos nucleicos que codifican cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de las mismas en vectores de expresión aplicando métodos estándar. La expresión se realiza en células hospedantes procarióticas o eucarióticas apropiadas del tipo células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, levadura o células de *E.coli* y se recupera el anticuerpo de las células (líquido sobrenadante o células después de la lisis).

La producción recombinante de anticuerpos es bien conocida en el estado de la técnica y se describe por ejemplo en los artículos de revisión de Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., y col., *Proten Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880.

Los anticuerpos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. La purificación se realiza con el fin de eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, p.ej. otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, por técnicas estándar, incluido el tratamiento alcalino/SDS, la cromatografía de columna y otros bien

conocidos de la técnica. Véase Ausubel, F. y col., coord., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York (1987).

La expresión en células NS0 se describe p.ej. en
5 Barnes, L.M. y col., Cytotechnology 32 (2000) 109-123; y
Barnes, L.M. y col., Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270. La
expresión transitoria se describe p.ej. en Durocher, Y. y
col., Nucl. Acids Res. 30 (2002) E9. La clonación de dominios
variables se describe en Orlandi, R. y col., Proc. Natl.
10 Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P. y col., Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; y Norderhaug, L. y
col., J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87. Un sistema
preferido de expresión transitoria (HEK 293) se describe en
Schlaeger, E.-J. y Christensen, K., Cytotechnology 30 (1999)
15 71-83 y en Schlaeger, E.-J., J. Immunol. Methods 194 (1996)
191-199.

Las secuencias de control que son idóneas para
procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente
una secuencia operadora y un sitio para la fijación de
20 ribosoma. Las células eucariotas se sabe que utilizan
promotores, intensificadores y señales de poliadenilación.

El ácido nucleico está "unido operativamente" cuando
está situado en una relación funcional con otra secuencia de
ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA de una presecuencia o
25 guía secretorio está unido operativamente al DNA de un
polipéptido si se expresa como una preproteína que participa
en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador
está unido operativamente a una secuencia codificadora si

afecta la transcripción de tal secuencia; o un sitio de unión de ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificadora si está posicionado de forma que facilita la traducción. En general, "unido operativamente" significa que
5 las secuencias de DNA que se van a unir son contiguas y, en el caso del guía secretorio, son contiguas y están dentro del marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no tienen que estar contiguos. La unión se lleva a cabo por ligación en los sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no
10 existen, entonces se emplearán adaptadores o engarces de oligonucleótidos sintéticos con arreglo a las prácticas convencionales.

Los anticuerpos monoclonales se separan de forma apropiada del medio de cultivo por procedimientos convencio-
15 nales de purificación de inmunoglobulina, por ejemplo, por proteína A-Sepharose, cromatografía a través de hidroxilapatita, electroforesis a través de gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El DNA y el RNA que codifican los anticuerpos monoclonales se aíslan fácilmente y se secuencian
20 utilizando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir de fuente de tales DNA y RNA. Una vez aislado, el DNA puede insertarse en vectores de expresión, que seguidamente se transfectan a células hospedantes, por ejemplo células HEK 293, células CHO o células de mieloma
25 que, de otro modo, no producirían la proteína inmunoglobulina para lograr la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células hospedantes.

Las variantes (o mutantes) de secuencia de aminoácidos

de un anticuerpo anti-P-selectina humano se preparan introduciendo cambios apropiados de nucleótidos en el DNA del anticuerpo o sintetizando nucleótidos. Sin embargo, tales modificaciones pueden llevarse a cabo solamente en un margen
5 muy limitado, p.ej. el descrito anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características del anticuerpo mencionado anteriormente, por ejemplo la fijación del isotipo de IgG y del epítipo, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de
10 la proteína o facilitar la purificación.

Puede sustituirse también cualquier resto cisteína que no intervenga en el mantenimiento de la conformación correcta del anticuerpo anti-P-selectina, normalmente por serina, para mejorar la estabilidad a la oxidación de la molécula y
15 prevenir reticulaciones aberrantes. También a la inversa, los enlaces de cisteína pueden añadirse al anticuerpo para mejorar su estabilidad (en particular cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo un fragmento Fv).

Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo
20 altera el modelo original de glucosilación del anticuerpo. Se entiende por alterar la delección de uno o varios restos hidrato de carbono existentes en el anticuerpo, y/o la adición de uno o varios sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glucosilación de anticuerpos
25 se realiza normalmente con enlaces N. Enlaces N significa la unión del resto hidrato de carbono con la cadena lateral de un resto asparagina. Las secuencias tripéptido de asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier

aminoácido, excepto la prolina, son las secuencias de reconocimiento de la unión enzimática del resto hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de estas secuencias tripéptido en un polipéptido
5 crea un sitio de glucosilación potencial. La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se lleva a cabo de modo conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o varias de las secuencias tripéptido recién descritas (para sitios de glucosilación con enlaces N).

10 Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-P-selectina se obtienen por un gran número de métodos, ya conocidos de la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a: el aislamiento a partir de una fuente natural (en
15 el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de existencia natural) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a un sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis de cassette de una variante preparada anteriormente o de una versión no variante de un anticuerpo
20 anti-P-selectina humanizado.

La invención se refiere además a inmunoconjugados que contienen el anticuerpo según la invención conjugado con un agente citotóxico, por ejemplo un agente quimioterapéutico, una toxina (p.ej. una toxina activa enzimáticamente de origen
25 bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de la misma), un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado) o un profármaco (prodrug) de un agente para la profilaxis o tratamiento de trastornos inflamatorios y trombóticos, en

especial de la PAOD y la CLI. Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se obtienen utilizando un gran número de agentes de unión de proteínas bifuncionales, por ejemplo el 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), el 5 iminotiolano (IT), los derivados bifuncionales de imidoésteres. (por ejemplo el adipimidato de dimetilo HCl), los ésteres activos (como el suberato de disuccinimidilo), los aldehídos (como el glutaraldehído), los compuestos bis-azido (por ejemplo la bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), los derivados de bis-diazonio (por ejemplo la bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), los diisocianatos (por ejemplo el 2,6-diisocianato de toluileno) y los compuestos de difluor activo (por ejemplo el 1,5-difluor-2,4-dinitrobenceno). Puede obtenerse, por ejemplo, una inmunotoxina de ricino del modo descrito por Vitetta, E.S. y col., Science 238 (1987) 1098-1104). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno-tri-aminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos con el anticuerpo. Véase WO 94/11026.

20 Otro tipo de modificación covalente implica la adición de glucósidos por vía química o enzimática al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos por cuanto no requieren la producción del anticuerpo en una célula hospedante que tenga capacidad de glucosilación con uniones N u O.

25 Dependiendo del modo de unión utilizado, el o los azúcares pueden unirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres, como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres, como los de la

serina, treonina o hidroxiprolina, (e) restos aromáticos, por ejemplo los de fenilalanina, tirosina o triptófano o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en WO 87/05330 y en Aplin, J.D. y Wriston, J.C. Jr., CRC Crit.

5 Rev. Biochem. (1981) 259-306.

La eliminación de cualquier resto hidrato de carbono que esté presente en el anticuerpo puede llevarse a cabo por vía química o enzimática. La desglucosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluormetanosulfónico o un compuesto equivalente. Este tratamiento produce la rotura de la mayor parte o de todos los azúcares, excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), quedando intacto el anticuerpo. La desglucosilación química se describe en Sojahn, H.T. y Bahl, O.P., Arch. Biochem. Biophys. 259 (1987) 52-57 y en Edge, A. S. y col., Anal. Biochem. 118 (1981) 131-137. La rotura enzimática de los restos hidrato de carbono de los anticuerpos puede llevarse a cabo aplicando una gran variedad de endo- y exo-glucosidasas del modo descrito por Thotakura, N.R. y Bahl, O.P., Meth. Enzymol. 138 (1987) 350-359.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo consiste en unir el anticuerpo a uno de los muchos polímeros no proteínicos, p.ej. el polietilenglicol, el polipropilenglicol o poli(óxidos de alquileo), del modo descrito en las patentes US-4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 ó 4,179,337.

En otro aspecto, la invención proporciona células B aisladas de un animal transgénico no humano, p.ej. un ratón

173

transgénico, que expresa el anticuerpo anti-P-selectina humano (p.ej. los anticuerpos originales producidos por una línea celular, elegida entre el conjunto formado por la hu-Mab<P-selectina>LC 1004-001 (DSM ACC2640), hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641) y hu-Mab<P-selectina>LC 1004-017 (DSM ACC2642) según la invención. Los ratones KM son ratones transcromosómicos idóneos. El ratón KM contiene un transcromosoma de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera kappa humano. Los genes de cadena pesada y ligera de ratón endógeno pueden haberse roto también en los ratones KM de modo que la inmunización de los ratones conduce a la producción de inmunoglobulinas humanas antes que a la producción de inmunoglobulinas de ratón. El diseño de ratones KM y su utilización para generar inmunoglobulinas humanas se describe con detalle en el documento WO 02/43478.

Las células B aisladas se obtienen con preferencia de un animal transgénico no humano, p.ej. un ratón transgénico, que se ha inmunizado con una forma purificada o recombinante del antígeno anti-P-selectina y/o células que expresan la P-selectina. El animal transgénico no humano, p.ej. un ratón transgénico, tiene con preferencia un genoma que consiste en un transgén de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera humano que codifica todo el anticuerpo de la invención o una porción del mismo. Las células B aisladas se immortalizan seguidamente para proporcionar una fuente (p.ej. un hibridoma) de anticuerpos anti-P-selectina humanos. Por lo tanto, la presente invención proporciona también un hibridoma capaz de producir anticuerpos monoclonales humanos según la

12

invención. En una forma de ejecución, el hibridoma incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, p.ej., un ratón transgénico que tiene un genoma que contiene un transgén de cadena pesada humano y un transgén de cadena 5 ligera humano que codifican a todo el anticuerpo de la invención o una parte del mismo, fusionado sobre una célula inmortalizada.

En una forma particular de ejecución, el animal transgénico no humano es un ratón transgénico que tiene un 10 genoma provisto de un transgén de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera humano que codifican todo el anticuerpo de la invención o una porción del mismo. El animal transgénico no humano puede inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida en el antígeno de P-selectina y/o 15 células que expresan la P-selectina. El animal transgénico no humano, p.ej. el ratón transgénico, es capaz con preferencia de producir isotipos de P-selectina de anticuerpos monoclonales humanos de la P-selectina.

Los anticuerpos monoclonales humanos según la invención 20 pueden producirse inmunizando un animal transgénico no humano, p.ej. un ratón transgénico, que tenga un genoma provisto de un transgén de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera humano que codifica todo el anticuerpo de la invención o una porción del mismo, con una preparación 25 purificada o enriquecida en antígeno de P-selectina y/o células que expresan la P-selectina. Después se obtienen las células B (p.ej. células B del bazo) del animal y se fusionan con células de mieloma para formar células inmortales de

125
hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales humanos contra la P-selectina.

En una forma preferida de ejecución, los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra la P-selectina pueden generarse utilizando ratones transgénicos que lleven partes del sistema inmune humano con preferencia sobre el sistema murino. Estos ratones transgénicos, denominados en la descripción ratones "HuMab", contienen un miniloci de gen de inmunoglobulina humana que codifica genes no realineados de inmunoglobulina humana, que incluyen la cadena pesada (μ y γ) y cadena ligera κ (genes de región constante), junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de las cadenas μ y κ (Lonberg, N. y col., Nature 368 (1994) 856-859). Por consiguiente, los ratones presentan una expresión expresión reducida de la IgM o K de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes humanos de cadena pesada y ligera introducidos sufren desviación de grupo y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG humanos de alta afinidad (Lonberg, N. y col., Nature 368 (1994) 856-859; revisión en Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113 (1994) 49-101; Lonberg, N. y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25 (1995) 65-93; y Harding, F. y Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci. 764 (1995) 536-546). La obtención de ratones HuMab se describe en Taylor, L. y col., Nucleic Acids Research 20 (1992) 6287-6295; Chen, J. y col., International Immunology 5 (1993) 647-656; Tuailon, N. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 3720-3724; Choi, T.K. y col., Nature Genetics 4 (1993) 117-123; Chen, J. y

12E

col., EMBO J. 12 (1993) 821-830; Tuailon, N. y col., Immunol. 152 (1994) 2912-2920; Lonberg, N. y col., Nature 368 (1994) 856-859; Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113 (1994) 49-101; Taylor, L. y col., Int. Immunol. 6 (1994) 579-591; Lonberg, N. y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25 (1995) 65-93; Harding, F. y Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci. 764 (1995) 536-546; Fishwild, D.M. y col., Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851, los contenidos de dichas publicaciones se incorporan a la presente descripción en su totalidad como referencias. Véanse además las patentes US-5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 5,545,807; 5,770,429; WO 98/24884; WO 94/25585; WO 93/1227; WO 92/22645; y WO 92/03918.

15 Para generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra la P-selectina pueden inmunizarse los ratones HuMab con una preparación purificada o enriquecida en antígeno de P-selectina y/o células que expresan la P-selectina con arreglo al método general, descrito por Lonberg, N. y col., Nature 368 (1994) 856-859; Fishwild, D.M. y col., Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851 y WO 98/24884. Los ratones tendrán con preferencia una edad de 6-16 semanas en el momento de la primera inmunización. Puede utilizarse, por ejemplo, una preparación purificada o enriquecida en antígeno soluble de P-selectina (p.ej. purificada a partir de células que expresan la P-selectina) para inmunizar los ratones HuMab por vía intraperitoneal. En el caso de que las inmunizaciones empleando una preparación purificada o enriquecida en

126

129

127'

antígeno de P-selectina no produzcan anticuerpos, los ratones podrán inmunizarse también con células que expresan la P-selectina, p.ej. una línea celular tumoral, para promover respuestas inmunes. La experiencia acumulada con varios

5 antígenos pone de manifiesto que los ratones HuMab transgénicos responden muy bien cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (i.p.) con el antígeno en un adyuvante de Freund completo y posteriormente se inmunizan en cualquier otra semana (por ejemplo, hasta un total de 6) por vía i.p.

10 con el antígeno en un adyuvante de Freund incompleto. Puede hacerse el seguimiento de la respuesta inmune a lo largo del programa de inmunización con muestras de plasma obtenidas por sangrados retroorbitales. El plasma puede analizarse con un ensayo ELISA y los ratones con una concentración suficiente

15 de inmunoglobulina humana anti-P-selectina pueden utilizarse para la inmortalización de las células B correspondientes. Los ratones pueden estimularse por vía intravenosa con el antígeno de 3 a 4 días antes del sacrificio y extracción de los nodos esplénicos y linfáticos. Se espera que tengan que

20 realizarse 2-3 fusiones para cada antígeno. Se inmunizan varios ratones para cada antígeno. Por ejemplo, puede inmunizarse un total de doce ratones HuMab de las cepas HCo7 y HCo12.

Los ratones HCo7 tienen una disrupción JKD en sus genes

25 endógenos de cadena ligera (kappa) (descrita en Chen, J. y col., EMBO J. 12 (1993) 821-830), una disrupción CMD en sus genes endógenos de cadena pesada (descrita en el ejemplo 1 del documento WO 01/14424), un transgén de cadena ligera

130

kappa humano KCo5 (descrito en Fishwild, D.M. y col., Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851), y un transgén HCo7 de cadena pesada humano (descrito en la patente US-5,770,429).

Los ratones HCo12 tienen una disrupción JKD en sus
5 genes endógenos de cadena ligera (kappa) (descrita en Chen, J., y col., EMBO J. 12 (1993) 821-830), una disrupción CMD en sus genes endógenos de cadena pesada (descrita en el ejemplo 1 del documento WO 01/14424), un transgén KCo5 de cadena ligera kappa humano (descrito en Fishwild, D.M. y col., Nat.
10 Biotechnol. 14 (1996) 845-851), y un transgén HCo12 de cadena pesada humano (descrito en el ejemplo 2 del documento WO 01/14424). Los linfocitos de ratón pueden aislarse y fusionarse con una línea celular de mieloma de ratón empleando PEG en base a programas estándar para generar hibridomas. A
15 continuación se exploran los hibridomas resultantes para producir anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, se fusionan suspensiones celulares individuales de linfocitos derivados de nodos esplénicos y linfáticos de ratones inmunizados con un sexto del número de las células de mieloma
20 de ratón que no secretan SP 2/0 (ATCC, CRL 1581) con un 50% de PEG. Se depositan las células en placas de microvaloración de fondo plano a razón de 2×10^5 , a continuación se incuban durante unas dos semanas en un medio selectivo.

Después se exploran los hoyos individuales con un
25 ensayo ELISA en busca de los anticuerpos IgM e IgG monoclonales anti-P-selectina humanos. Una vez se ha producido el crecimiento extensivo del hibridoma, se analiza el medio, normalmente después de 10-14 días. Se vuelven a colocar en

139
placas los anticuerpos que secretan hibridomas, se exploran de nuevo y, si todavía da resultado positivo de anticuerpos monoclonales IgG anti-P-selectina humanos, entonces pueden subclonarse por lo menos dos veces limitando la dilución.

- 5 Seguidamente se cultivan los subclones estables "in vitro" para producir anticuerpos en un medio de cultivo de tejido para la caracterización.

Dado que se atribuyen a las secuencias CDR las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar los
10 anticuerpos recombinantes según la invención construyendo vectores de expresión que incluyan las secuencias CDR según la invención sobre secuencias de armazón de un anticuerpo humano diferente (ver, p.ej. Riechmann, L. y col., Nature 332 (1998) 323-327; Jones, P. y col., Nature 321 (1986) 522-525;
15 y Queen, C. y col., Proc. Natl. Acad. U.S.A. 86 (1989) 10029-10033). Dichas secuencias de armazón pueden obtenerse de bases de datos públicas de DNA que incluyen secuencias de genes de anticuerpos humanos de línea germinal. Estas secuencias de línea germinal serán diferentes de las
20 secuencias de genes de anticuerpos maduros porque no incluyen genes variables completamente ensamblados, que se forman por unión de V(D)J durante la maduración de la célula B. Las secuencias de genes de línea germinal diferirán también de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de
25 gran afinidad tanto en la región constante individual como en la variable.

La invención se refiere además al uso de un anticuerpo según la invención para el diagnóstico de la P-selectina "in

132

vitro", con preferencia mediante un ensayo inmunológico que determine la fijación entre la P-selectina de una muestra y el anticuerpo de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una
5 composición, p.ej. una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo monoclonal humano o una combinación de anticuerpo monoclonales humanos, o la porción de los mismos que se une a un antígeno, de la presente invención, formulados junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Más en
10 concreto, la composición es una composición farmacéutica o de diagnóstico y de modo todavía más específico la composición farmacéutica contiene un anticuerpo ya definido anteriormente y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden
15 administrarse también en terapias de combinación, es decir combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención con por lo menos un agente útil para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad asociada con la isquemia
20 crítica de extremidades (CLI/PAOD) u otra terapia convencional.

Tal como se utiliza en esta descripción, "excipiente farmacéuticamente aceptable" indica uno cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos,
25 agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. El excipiente es con preferencia idóneo para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, paren-

teral, espinal o epidérmica (p.ej. mediante inyección o infusión).

Una "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal que conserva la actividad biológica deseada del anticuerpo y no aporta efectos toxicológicos molestos de ningún tipo (véase p.ej. Berge, S.M. y col., J. Pharm. Sci. 66 (1977) 1-19). Dichas sales se incluyen en la invención. Son ejemplos de dichas sales las sales de adición de ácido y las sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, por ejemplo las sales clorhidrato.

Una composición de la presente invención puede administrarse mediante gran número de métodos ya conocidos en la técnica. El experto en la materia comprenderá fácilmente que la vía y/o el modo de administración pueden variar en función de los resultados deseados.

Para administrar un compuesto de la invención mediante determinadas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con un material para impedir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un excipiente apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen la solución salina y las soluciones acuosas tamponadas.

Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen las soluciones o dispersiones acuosas estériles y los polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de

131.

134

tales medios y agentes para principios activos farmacéuticos ya es conocido en la técnica.

Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" que se emplean en esta descripción indican modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección e incluyen, sin limitación, la inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal así como la infusión.

Estas composiciones pueden contener además excipientes o adyuvantes, por ejemplo conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse tanto por procedimientos de esterilización, ver antes, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, paraben, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Puede ser también deseable integrarse en las composiciones agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, cloruro sódico y similares. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede realizarse mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción, por ejemplo el monoestearato de aluminio y la gelatina.

Con independencia de la vía de administración que se elija, los compuestos de la presente invención, que pueden utilizarse en una forma hidratada idónea y/o las composi-

132

135

ciones farmacéuticas de la presente invención se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales ya conocidos de los expertos en la materia.

5 Los niveles actuales de dosificación de los ingredientes activos de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse con el fin de obtener una cantidad de ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada en un paciente particular, en
10 una composición y modo de administración concretos, sin que sea tóxica para el paciente. El nivel de dosificación elegido dependerá de un gran número de factores farmacocinéticos, incluida la actividad de las composiciones particulares de la presente invención que se empleen, o del éster, sal o amida
15 de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de eliminación de un compuesto concreto que se emplee, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales que se empleen en combinación con las composiciones concretas aplicadas, la edad, el
20 sexo, el peso, el estado físico, el estado de salud y el historial médico anterior del paciente que se va a tratar y factores similares, que los facultativos médicos conocen bien. Una dosificación semanal típica puede situarse entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg o más, en función de los factores recién
25 mencionados.

La composición tiene que ser estéril y fluida hasta el punto de que dicha composición pueda administrarse con una jeringuilla. Además de agua, el excipiente puede ser una

134

solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerina, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) así como las mezclas adecuadas de los mismos.

La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, utilizando un recubrimiento, por ejemplo lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y empleando tensioactivos. En muchos casos es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, como la manita o la sorbita, y cloruro sódico en la composición. La absorción de larga duración de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, el monoestearato de aluminio o la gelatina.

La invención comprende un método para el tratamiento de un paciente que necesite una terapia, caracterizado porque se administra al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, que contiene una parte Fc derivada de un origen humano y que no se fija sobre el factor de complemento Clq.

La invención comprende el uso de anticuerpo que fija la P-selectina, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y no fija el factor de complemento Clq para fines terapéuticos.

La invención comprende el uso de un anticuerpo que fija la P-selectina, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y no fija el factor de complemento Clq para la fabricación de un medicamento destinado a la profilaxis y el tratamiento de trastornos inflamatorios y trombóticos.

135

La invención comprende el uso de un anticuerpo que fija la P-selectina, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y no fija el factor de complemento Clq para el tratamiento de la PAOD y la CLI.

5 La presente invención proporciona, pues, un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento Clq, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y está caracterizado porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG1, que contiene por lo
10 menos una mutación en el resto L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y/o P329 o es un anticuerpo del subgrupo humano IgG4 en el que S228 se ha reemplazado por P y L235 se ha reemplazado por E. En una forma de ejecución, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En otra forma de
15 ejecución, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

En una forma de ejecución, la presente invención proporciona un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento Clq, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y está caracterizado
20 porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG1, que contiene por lo menos una mutación en L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y/o P329 o es un anticuerpo del subgrupo humano IgG4 en el que S228 se reemplaza por P y L235 se reemplaza por E, en el que la no
25 fijación del anticuerpo sobre el factor de complemento Clq se refiere a una medición realizada mediante un ensayo ELISA en el que la fijación máxima (Bmax) del Clq al anticuerpo en una concentración de 10 µg/ml del anticuerpo es $\leq 30\%$ de la Bmax

135

138

del anticuerpo LC 1004-002 de la línea celular hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641). En otra forma de ejecución, la fijación máxima es $\leq 20\%$ de la Bmax del anticuerpo LC 1004-002 de la línea celular hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641).

En una forma de ejecución, la presente invención proporciona un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento C1q, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y está caracterizado porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG1, que contiene por lo menos una mutación en L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y/o P329 o es un anticuerpo del subgrupo humano IgG4 en el que S228 se reemplaza por P y L235 se reemplaza por E, en el que el anticuerpo se fija sobre la P-selectina con un valor K_D de menos de 10^{-8} M en un ensayo BIAcore. En otra forma de ejecución, el valor de K_D se sitúa entre 10^{-11} y 10^{-9} M.

En una forma de ejecución, la presente invención proporciona un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento C1q, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y está caracterizado porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG1, que contiene por lo menos una mutación en L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y/o P329 o es un anticuerpo del subgrupo humano IgG4 en el que S228 se reemplaza por P y L235 se reemplaza por E, en el que el anticuerpo se fija sobre la P-selectina con una especificidad por lo menos 1000 mayor que sobre la E- y/o L-selectina según se determina

a partir de los valores de EC₅₀ hallados en un ensayo ELISA, en el que se recubre la placa de microvaloración con la P- y E- y/o L-selectina. En otra forma de ejecución, los valores de EC₅₀ de los transfectantes de E- y L-selectina se sitúan
5 por encima de 100 µg/ml.

En una forma de ejecución, la presente invención proporciona un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento C1q, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y está caracterizado
10 porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG1, que contiene por lo menos una mutación en L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y/o P329 o es un anticuerpo del subgrupo humano IgG4 en el que S228 se reemplaza por P y L235 se reemplaza por E, en el que el anticuerpo
15 inhibe la adhesión de células HL60 similares a leucocitos sobre la P-selectina purificada con un valor de IC₅₀ no superior a 1 µg/ml. En otra forma de ejecución, el valor de IC₅₀ se sitúa entre 0,08 y 0,5 µg/ml. En otra forma de ejecución adicional, el valor de IC₅₀ está comprendido entre
20 0,08 y 0,11 µg/ml.

En una forma de ejecución, la presente invención proporciona un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento C1q, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y está caracterizado
25 porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG1, que contiene por lo menos una mutación en L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y/o P329 o es un anti-

cuerpo del subgrupo humano IgG4 en el que S228 se reemplaza por P y L235 se reemplaza por E, en el que

(a) la adhesión de las células HL60 similares a leucocitos sobre las plaquetas activadas se inhibe con un valor de IC₅₀ situado entre 0,05 y 0,3 µg/ml;

(b) el anticuerpo inhibe la interacción de los leucocitos con una monocapa de plaquetas en más del 70%;

(c) el anticuerpo inhibe la adhesión de leucocitos sobre células endoteliales activadas de un sistema de flujo humano en un intervalo del 60 al 90% en una concentración de 3 µg/ml;

(d) el anticuerpo no fija la proteína C3;

(e) el anticuerpo no despliega citotoxicidad dependiente del complemento (CDC);

(f) el anticuerpo no se fija sobre receptores Fcγ de células efectoras NK; o

(g) el anticuerpo no despliega citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

En una forma de ejecución, la presente invención proporciona un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, caracterizado porque la secuencia variable de aminoácidos de cadena pesada CDR3 de dicho anticuerpo se elige entre el grupo formado por las secuencias CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41 o 42.

En una forma de ejecución, la presente invención proporciona un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, que consta de una cadena pesada variable y una cadena ligera variable, caracterizado porque la cadena pesada variable

139

contiene las secuencias CDR siguientes: CDR1, CDR2 y CDR3 y la CDR1 se elige entre el grupo formado por las SEQ ID NO: 29, 30, 31 y 32; la CDR2 se elige entre el grupo formado por las SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36 y 37; y la CDR3 se elige entre el grupo formado por las SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41 y 42; dichas CDR se eligen con independencia entre sí.

En una forma de ejecución, la presente invención proporciona un anticuerpo caracterizado porque la cadena ligera variable contiene las secuencias CDR siguientes: CDR1, CDR2 y CDR3; y la CDR1 se elige entre las SEQ ID NO: 43 y 44; la CDR2 se elige entre las SEQ ID NO: 45 y 46; y la CDR3 se elige entre las SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50, 51 y 52; dichas CDR se eligen con independencia entre sí.

En una forma de ejecución, la presente invención proporciona un anticuerpo, caracterizado porque dicho anticuerpo se fija sobre la P-selectina y porque el anticuerpo contiene una región variable, elegida con independencia entre el grupo formado por:

a) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y el dominio variable de cadena pesada definido por la SEQ ID NO: 2;

b) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de cadena pesada definido por la SEQ ID NO: 4;

c) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5 y el dominio variable de cadena pesada definido por la SEQ ID NO: 6;

d) el dominio variable de cadena ligera definido por la

1.42

secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 y el dominio variable de cadena pesada definido por la SEQ ID NO: 8;

e) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9 y el dominio variable de cadena pesada definido por la SEQ ID NO: 10;

f) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11 y el dominio variable de cadena pesada definido por la SEQ ID NO: 12;

g) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13 y el dominio variable de cadena pesada definido por la SEQ ID NO: 14;

h) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 15 y el dominio variable de cadena pesada definido por la SEQ ID NO: 16;

i) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17 y el dominio variable de cadena pesada definido por la SEQ ID NO: 18;

j) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19 y el dominio variable de cadena pesada definido por la SEQ ID NO: 20; y

k) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21 y el dominio variable de cadena pesada definido por la SEQ ID NO: 22.

En una forma de ejecución, la presente invención proporciona un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento C1q, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y está caracterizado porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano

140

143

IgG1, que contiene por lo menos una mutación en L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y/o P329 o es un anticuerpo del subgrupo humano IgG4 en el que S228 se reemplaza por P y L235 se reemplaza por E, en el que el anticuerpo
5 contiene las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 y las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de cadena pesada definido por la SEQ ID NO: 4. En otra forma de ejecución, el anticuerpo comprende el dominio
10 variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de cadena pesada definido por la SEQ ID NO: 4.

En una forma de ejecución, la presente invención proporciona un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina,
15 no se fija sobre el factor de complemento Clq, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y está caracterizado porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG1, que contiene por lo menos una mutación en L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y/o P329 o es un anti-
20 cuerpo del subgrupo humano IgG4 en el que S228 se reemplaza por P y L235 se reemplaza por E, en el que

(a) el anticuerpo contiene por lo menos una mutación de aminoácido en la parte Fc que provoca la no fijación sobre el factor de complemento Clq;

25 (b) la región constante de cadena pesada humana contiene la secuencia de aminoácidos elegida con independencia entre el grupo formado por la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26 y 28;

(c) el anticuerpo contiene una región constante de cadena ligera x definida con la SEQ ID NO: 23;

(d) el anticuerpo contiene por lo menos una mutación de aminoácido que provoca la no fijación sobre el complemento
5 Clq;

(e) el anticuerpo contiene una región constante de cadena pesada elegida entre el grupo formado por IgG1v1, IgG1v2 y IgG4v1; o

(f) el anticuerpo es un fragmento Fab, F(ab')₂ o un
10 fragmento de cadena simple.

En una forma de ejecución, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-P-selectina, caracterizado porque a) es un anticuerpo humano o humanizado y b) se fija sobre la P-selectina con una especificidad por lo menos 1000
15 mayor que sobre la E- o la L-selectina a tenor de los valores de EC₅₀ medidos en un ensayo ELISA, en el que la placa de microvaloración se recubre con la P- y E- y/o L-selectina. En otra forma de ejecución, el anticuerpo contiene la secuencia de aminoácidos definida por la región constante de cadena
20 pesada γ1 de la SEQ ID NO: 24, 25 ó 26 o la región constante de cadena pesada γ4 de la SEQ ID NO: 27 ó 28. En otra forma de ejecución más, el anticuerpo se produce en una línea celular elegida entre el grupo formado por la hu-Mab<P-selectina>LC 1004-001 (DSM ACC2640), la hu-Mab<P-selectina>LC
25 1004-002 (DSM ACC2641) y la hu-Mab<P-selectina>LC 1004-017 (DSM ACC2642).

Se debe entender que la invención proporciona las formas de ejecución con las definiciones descritas en los

142

143

párrafos anteriores, de [00129] a [00141], y también las combinaciones de los mismos.

Los siguientes ejemplos, referencias, listados de secuencias y figuras se facilitan para ayudar la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se define en las reivindicaciones anexas. Es obvio que se pueden introducir modificaciones en los procedimientos descritos sin apartarse del espíritu de la invención.

Descripción de los listados de secuencias.

- 10 SEQ ID NO: 1 LC1004-001 dominio variable de cadena ligera del HuMab 1004-001
- SEQ ID NO: 2 LC1004-001 dominio variable de cadena pesada del HuMab 1004-001
- SEQ ID NO: 3 LC 1004-002 dominio variable de cadena ligera
- 15 del HuMab 002
- SEQ ID NO: 4 LC 1004-002 dominio variable de cadena pesada del HuMab 002
- SEQ ID NO: 5 LC 1004-003 dominio variable de cadena ligera del HuMab 003
- 20 SEQ ID NO: 6 LC 1004-003 dominio variable de cadena pesada del HuMab 003
- SEQ ID NO: 7 LC 1004-004 dominio variable de cadena ligera (I) del HuMab 004 (I)
- SEQ ID NO: 8 LC 1004-004 dominio variable de cadena pesada
- 25 (I) del HuMab 004 (I)
- SEQ ID NO: 9 LC 1004-004 dominio variable de cadena ligera (II) del HuMab 004 (II)
- SEQ ID NO: 10 LC 1004-004 dominio variable de cadena pesada

44.

(II) del HuMab 004 (II)

SEQ ID NO: 11 dominio variable de cadena ligera del HuMab
005

5 SEQ ID NO: 12 dominio variable de cadena pesada del HuMab
005

SEQ ID NO: 13 dominio variable de cadena ligera del HuMab
010 (I)

SEQ ID NO: 14 dominio variable de cadena pesada del HuMab
010 (I)

10 SEQ ID NO: 15 dominio variable de cadena ligera del HuMab
010 (II)

SEQ ID NO: 16 dominio variable de cadena pesada del HuMab
010 (II)

15 SEQ ID NO: 17 dominio variable de cadena ligera del HuMab
010 (III)

SEQ ID NO: 18 dominio variable de cadena pesada del HuMab
010 (III)

SEQ ID NO: 19 dominio variable de cadena ligera del HuMab
011

20 SEQ ID NO: 20 dominio variable de cadena pesada del HuMab
011

SEQ ID NO: 21 dominio variable de cadena ligera del HuMab
017

25 SEQ ID NO: 22 dominio variable de cadena pesada del HuMab
017

SEQ ID NO: 23 región constante de cadena ligera κ

SEQ ID NO: 24 región constante de cadena pesada γ1

SEQ ID NO: 25 región constante de cadena pesada γ1 PVA236/

145

145

GLPSS331 (IgG1v1)

SEQ ID NO: 26 región constante de cadena pesada γ 1 L234A/
L235A (IgG1v2)

SEQ ID NO: 27 región constante de cadena pesada γ 4

5 SEQ ID NO: 28 región constante de cadena pesada γ 4 S228/L235E
(IgG4v1)

SEQ ID NO: 29-32 cadena pesada CDR1

SEQ ID NO: 33-37 cadena pesada CDR2

SEQ ID NO: 38-42 cadena pesada CDR3

10 SEQ ID NO: 43-44 cadena ligera CDR1

SEQ ID NO: 45-46 cadena ligera CDR2

SEQ ID NO: 47-52 cadena ligera CDR3

Abreviaturas:

Los aminoácidos se abrevian aplicando el código de tres
15 letras (Leu) o de una letra (L).

El anticuerpo HuMab 00X se denomina también anticuerpo
00X.

L234 significa el aminoácido leucina de la posición 234
según la numeración EU (Kabat).

20 L234A significa que el aminoácido leucina de la
posición 234 se ha cambiado por alanina.

PVA236 significa que en la región 236, el ELLG del IgG1
o el EFLG del IgG4 se modifica en PVA.

GLPSS331 significa que en la región 331, el ALPAP del
25 IgG1 o el GLPAP del IgG2 se cambia por GLPSS.

Las modificaciones o enmiendas en los demás subgrupos
IgG se indican de forma similar.

148

EJEMPLOS

Generación de una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos anti-P-selectina

Cultivo de hibridomas

- 5 Se cultivan los hibridomas de HuMab en un medio IMDM (Cambrex), suero bovino Fetal clone 1 (Perbio Science), factor de clonación de hibridoma de origen (Igen), piruvato sódico, penicilina/estreptomicina, 2-mercaptoetanol, HAT (Sigma-Aldrich) y canamicina (Invitrogen) a 37°C y un 5% de
- 10 CO₂.

Generación de una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos anti-P-selectina

Procedimiento de inmunización de ratones transgénicos

Protocolo A:

- 15 Se inmunizan 10 ratones transgénicos HCo7 (5 machos y 5 hembras), de la cepa GG2201 (Medarex, San José, CA, USA) con una forma truncada recombinante de la P-selectina que carece de la transmembrana y del dominio citoplásmico de la P-selectina y que se adquiere de la empresa R&D Systems. Para
- 20 la primera inmunización se mezclan 50 µg de P-selectina recombinante, disueltos en 100 µl de PBS, con 100 µl adyuvante de Freund completo. Para las inmunizaciones restantes se utiliza P-selectina recombinante unida a KLH. Para la segunda inmunización se disuelven 50 µg de P-
- 25 selectina recombinante unida a KLH en 100 µl de PBS y se mezclan con 100 µl de adyuvante de Freund incompleto. Para las inmunizaciones restantes se disuelven 20 µg P-selectina recombinante unida a KLH en 100 µl de PBS y se mezclan con

146

149

100 µl de adyuvante de Freund incompleto. Se administran las inmunizaciones de forma alternada por vía interperitoneal y subcutánea, empezando con la inmunización interperitoneal.

Protocolo B:

- 5 Se inmunizan 3 ratones HCo7 (todas hembras) y 3 ratones KM (todos machos) transgénicos, de la cepa GG2489 (Medarex, San José, CA, USA) con una P-selectina de longitud completa, purificada a partir de plaquetas humanas obsoletas por cromatografía de inmunoafinidad (ver a continuación). Para la
- 10 primera inmunización se mezclan 50 µg de la P-selectina purificada, disueltos en 100 µl de PBS, con 100 µl de adyuvante de Freund completo (CFA; Difco Laboratories, Detroit, USA). Para la segunda inmunización se mezclan 50 µg de la P-selectina purificada, disueltos en 100 µl de PBS, con 100 µl
- 15 de adyuvante de Freund incompleto (ICFA; Difco).

Para las demás inmunizaciones se utilizan 20 µg de la P-selectina purificada y se mezclan con 100 µl de adyuvante de Freund incompleto.

Ensayo ELISA específico de antígeno

- 20 Se determinan las concentraciones del anti-P-selectina en los sueros de ratones inmunizados mediante un ensayo ELISA específico de antígeno. Se recubre la placa (placa ELISA de fondo plano con 96 hoyos, Greiner) con 0,1 µg/ml de P-selectina purificada, disuelta en PBS y se recubre durante una
- 25 noche a temperatura ambiente. A continuación se bloquean los hoyos con PBSTC (PBS que contiene un 0,05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemie BV) y un 2% de suero de pollo (Gibco)) a temperatura ambiente durante 1 hora.

147

150

Se diluyen calidades de suero comprobadas en proporción 1:100 con PBSTC y se añaden a los hoyos. Se disuelve el suero obtenido de los ratones antes de la inmunización en proporción 1:100 con PBSTC y se emplea como control negativo. Se
5 disuelve un anticuerpo de ratón dirigido contra la P-selectina humana (1/7, producción interna de la empresa Roche, Basilea) en proporción 1:100 con PBSTC y se emplea como control positivo. Se incuban las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Seguidamente se lavan las placas dos
10 veces con PBST (PBS que contiene un 0,05% de Tween 20). Se diluye el Gt- α -huIgG-HRP (Jackson) en proporción 1:5000 con PBSTC y se añade a los hoyos que contienen las calidades comprobadas y el control negativo. Se diluye el Rb- α -mIgG (Jackson) en proporción 1:3000 con PBSTC y se añade a los
15 hoyos que contienen el control positivo. Se incuban las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente se lavan las placas dos veces con PBST se revelan con una solución de ABTS® recién preparada (1 mg/ml) (ABTS: 2,2'-azinobis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) a temperatura ambiente (RT) durante 30 minutos en la oscuridad. Se
20 mide la absorbancia en 405 nm.

Estimulación de los ratones

Cuando las concentraciones del anti-P-selectina en suero son suficientes, se estimulan los ratones adicional-
25 mente con 20 μ g de P-selectina recombinante humana en 100 μ l de PBS, por vía intravenosa 4 y 3 días antes de la fusión.

Generación de hibridoma

Se sacrifican los ratones y se les extraen los nodos

esplénicos y linfáticos que flanquean la aorta abdominal y la vena cava. Se efectúa la fusión de los esplenocitos y las células de nodos linfáticos con el reactivo de fusión, las células SP 2.0, con arreglo a procedimientos operativos
5 estándar.

Con el procedimiento de inmunización se obtienen anticuerpos monoclonales humanos de secuencias pesada y ligera variables, de las SEQ ID NO 1 - 22.

ELISA κ

10 Para determinar si los hibridomas resultantes de la fusión generan anticuerpos humanos se efectúa un ensayo ELISA κ . Se recubren las placas ELISA con anticuerpos IgG de cadena ligera κ antihumanos de ratón (DAKO) diluidos 1/10000 con PBS mediante una incubación a 4°C durante una noche. Después de
15 descartar los hoyos, se bloquean las placas por incubación con PBSTC a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se incuban los hoyos con el líquido sobrenadante del cultivo de hibridoma, diluido 1/2 con PBSTC. Se diluye el medio de cultivo a 1/2 con PBSTC y se utiliza como control
20 negativo, se diluye el suero de ratón positivo ligero κ en proporción 1/100 con PBSTC y se emplea como control positivo. A continuación se lavan los hoyos tres veces y se incuban con IgG F(ab')₂ antihumano de ratón, conjugado con HRP (DAKO), diluido en proporción 1/2000 con PBSTC a 37°C durante 1 h. Se
25 lavan los hoyos tres veces y se revelan las muestras con una solución de ABTS® recién preparada (1 mg/ml) a temperatura ambiente (RT) durante 30 minutos en la oscuridad. Se mide la absorbancia en 405 nm con un lector de placas ELISA.

149.

152

Clonación y análisis de secuencias de los dominios variables del HuMab anti-P-selectina (cadenas ligeras κ y cadenas pesadas $\gamma 1$)

Se aíslan las secuencias de nucleótido que codifican a la región variable de cadena ligera VL y la región variable de cadena pesada VH de los HuMab anti-P-selectina por un procedimiento estándar de síntesis de cDNA/PCR.

Se prepara el RNA total a partir de 1×10^6 - 1×10^7 células de hibridoma utilizando el minikit RNeasy® (Qiagen). El DNA derivado del hibridoma se utiliza como molde para la síntesis del cDNA de la 1ª hebra o cadena que se transforma con arreglo a un método convencional, recurriendo a un cebador oligo dT. La síntesis del cDNA de la 2ª cadena y la posterior amplificación por PCR de los fragmentos de cDNA que codifican a la VL y VH se realiza con cebadores de cadena ligera y pesada inversos, complementarios de las secuencias de nucleótido de las regiones constantes de cadena ligera κ y de cadena pesada $\gamma 1$ y cebadores de cadena ligera y pesada específicos de 5', respectivamente. Los productos de la PCR se clonan empleando el kit de clonación TOPO TA de la empresa Invitrogen™ Life Technologies y el pCR4-TOPO como vector de clonación. Se identifican los productos de la PCR clonados por mapeo de restricción de los plásmidos apropiados empleando EcoRI para la digestión y los tamaños de los fragmentos de DNA esperados/calculados de 740 y 790 bp para la VL y la VH, respectivamente.

La secuencia de DNA de los fragmentos de la PCR clonados se determina por secuenciación bicatenaria.

150

15E

151

Para procesar los datos generales se emplea el paquete de programas informáticos de GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin), versión 10.2. Las secuencias de DNA y proteínas se alinean empleando el módulo CLUSTALW de GCG. Las alineaciones de secuencia se tabulan, se editan y se codifican con color empleando el programa GENEDOC (versión 2.1).

Diseño de plásmidos de expresión para un HuMab IgG1 anti-P-selectina

Los genes que codifican la cadena ligera y pesada del HuMab anti-P-selectina se ensamblan por separado en vectores de expresión de células de mamíferos.

Para ello se juntan los segmentos de genes que codifican la región variable de cadena ligera (V_L) del HuMab anti-P-selectina y la región constante de cadena ligera κ humana (C_L) al igual que los segmentos de genes de la región variable de cadena pesada (V_H) de los HuMab anti-P-selectina y la región constante de cadena pesada $\gamma 1$ humana (C_{H1} -Hinge- C_{H2} - C_{H3}).

Se encontrará información general referente a las secuencias de nucleótidos de cadenas ligeras y pesadas humanas, a partir de las que se puede deducir el uso de codón, en: Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. y Foeller, C. (1991) Secuencias de proteínas de interés inmunológico, quinta ed., publicación NIH n° 91-3242.

La unidad de transcripción de la cadena ligera κ del HuMab anti-P-selectina se compone de los elementos siguientes:

- El intensificador y promotor inmediatamente anterior

del citomegalovirus humano (HCMV),

- Un 5'-UT sintético, incluida una secuencia Kozak,
- Una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina, incluido el intrón de la secuencia de señal,
- 5 • El cDNA de cadena ligera variable de HuMab anti-P-selectina clonado, dispuesto en un único sitio de restricción BsmI en el extremo 5' y un sitio dador de empalme y un único sitio de restricción NotI en el extremo 3',
- La región constante del gen κ humano genómico,
- 10 incluido el intensificador Ig- κ de ratón de intrón 2 [Picard, D. y Schaffner, W. (1984) Nature 307, 80-82] y
- La secuencia de señal de poliadenilación κ ("poly A") de inmunoglobulina humana.

La unidad de transcripción de la cadena pesada $\gamma 1$ del
15 HuMab anti-P-selectina se compone de los elementos siguientes:

- El intensificador y promotor inmediatamente anterior del citomegalovirus humano (HCMV),
- Un 5'-UT sintético, incluida una secuencia Kozak, .
- 20 • Una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina modificada, incluido el intrón de la secuencia de señal,
- El cDNA de cadena pesada variable del HuMab anti-P-selectina clonado, dispuesto en un único sitio de restricción BsmI en el extremo 5' y un sitio dador de empalme y un único
- 25 sitio de restricción NotI en el extremo 3',
- La región constante del gen pesada $\gamma 1$ humana genómica, incluido el intensificador μ Ig de ratón [Neuber-

ger, M. S. (1983) Embo J. 2, 1373-1378],

- La secuencia de señal de poliadenilación ("poly A") de inmunoglobulina $\gamma 1$ humana.

Elementos funcionales de los plásmidos de expresión de
5 cadena pesada $\gamma 1$ y de cadena ligera κ del HuMab anti-P-selectina: aparte del cassette de expresión de la cadena ligera κ y de la cadena pesada $\gamma 1$ del HuMab anti-P-selectina, estos plásmidos contienen:

- Un gen de resistencia a la higromicina
- 10 • Un origen de replicación, oriP, del virus de Epstein-Barr (EBV)
- Un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en la *E. coli* y
- Un gen de β -lactamasa que confiere resistencia a la
15 ampicilina en la *E. coli*.

Diseño de plásmidos de expresión para un HuMab IgG4 anti-P-selectina

Se deriva un plásmido de expresión prototipo de cadena pesada $\gamma 4$ anti-P-selectina a partir del plásmido de expresión
20 de cadena pesada $\gamma 1$ anti-P-selectina reemplazando la región constante $\gamma 1$ genómica humana y la secuencia de señal de poliadenilación ("poly A") de inmunoglobulina $\gamma 1$ por la región constante $\gamma 4$ genómica humana y la secuencia de señal de poliadenilación de inmunoglobulina $\gamma 4$.

25 Para la expresión de las cadenas ligeras κ del HuMab anti-P-selectina se utilizan los mismos plásmidos de expresión descritos para el IgG1 (ver antes).

Diseño de plásmidos de expresión para IgG1 e IgG4 anti-

P-selectina mutantes (variantes)

Los plásmidos de expresión que codifican las cadenas pesadas $\gamma 1$ y $\gamma 4$ del anti-P-selectina mutante se crean por mutagénesis dirigida a un sitio de los plásmidos de expresión de tipo salvaje utilizando el kit llamado QuickChange[™] Site-Directed mutagenesis Kit (Stratagene).

Se generan los siguientes mutantes para el LC1004-002. Los aminoácidos se numeran con arreglo al sistema de numeración EU [Edelman, G. M., Cunningham, B. A., Gall, W. E., Gottlieb, P. D., Rutishauser, U. y Waxdal, M. J. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 78-85; Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. y Foeller, C. (1991) Secuencias de proteínas de interés inmunológico, quinta ed., publicación NIH n° 91-3242].

154

157

Tabla 1

Isotipo	Abreviatura	Mutaciones	Descripción
IgG1	IgG1v1	PVA-236; GLPSS331 especificado por E233P; L234V; 235A; delta G236; A327G; A330S; P331S SEQ ID NO: 25	La secuencia de aminoácidos Glu ₂₃₃ Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ Gly ₂₃₆ de la cadena pesada γ1 humana se sustituye por la secuencia de aminoácidos Pro ₂₃₃ Val ₂₃₄ Ala ₂₃₅ de la cadena pesada γ2 humana. La secuencia de aminoácidos Ala ₃₂₇ Leu ₃₂₈ Pro ₃₂₉ Ala ₃₃₀ Pro ₃₃₁ de la cadena pesada γ1 humana se sustituye por la secuencia de aminoácidos Gly ₃₂₇ Leu ₃₂₈ Pro ₃₂₉ Ser ₃₃₀ Ser ₃₃₁ de la cadena pesada γ4 humana.
IgG1	IgG1v2	L234A; L235A SEQ IDNO:26	La secuencia de aminoácidos Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ de la cadena pesada γ1 humana se sustituye por la secuencia de aminoácidos Ala ₂₃₄ Ala ₂₃₅
IgG4	IgG4v1	S228P; L235E SEQ ID NO: 28	Ser ₂₂₈ de la cadena pesada γ4 humana se sustituye por Pro ₂₂₈ y Leu ₂₃₅ de la cadena pesada γ4 humana se sustituye por Glu ₂₃₅

Producción de HuMab anti-P-selectina recombinantes

Los HuMab recombinantes se generan por transfección transitoria de células HEK293-EBNA adherentes (ATTC n° CRL-
5 10852) cultivadas en medio DMEM (Gibco) suplementado con un
10 % de IgG FCS ultra-bajo (Gibco), 2mM de glutamina (Gibco),
1% v/v de aminoácidos no esenciales (Gibco) y 250 µg/ml de
G418 (Roche). Para la transfección se emplea el reactivo
llamado Fugene™ 6. (Roche) Transfection Reagent en una
10 proporción entre reactivo (µl) y DNA (µg) comprendida entre
3:1 y 6:1. Las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina

156

se expresan a partir de dos plásmidos diferentes, aplicando una proporción molar entre el plásmido que codifica la cadena ligera y el plásmido que codifica la cadena pesada comprendida entre 1:2 y 2:1. Los líquidos sobrenadantes de
5 cultivos celulares que contienen los HuMab se recolectan en los días de 4 a 11 después de la transfección. Los líquidos sobrenadantes se guardan almacenados a -20°C hasta el momento de la purificación.

Se encontrará información general relativa a la
10 expresión recombinante de anticuerpos humanos p.ej. en HEK293 en la referencia: Meissner, P., Pick, H., Kulangara, A., Chastellard, P., Friedrich, K. y Wurm, F. M., Biotechnol. Bioeng. 75, 197-203 (2001).

15 Determinación de la afinidad de los HuMab anti-P-selectina

Equipo:

Instrumento: BIACORE® 2000

Chip: CM5

Adición: adición de aminos

20 Tampón: HBS (HEPES, NaCl), pH 7,4, 25°C.

Para las mediciones de afinidad se unen anticuerpos Fcγ de conejo antihumanos (Dianova) por adición de amina sobre la superficie del chip para la presentación del anticuerpo contra la P-selectina. Se fijan aproximadamente 400 RU de
25 anticuerpos anti-P-selectina. Se añade P-selectina recombinante (R&D Systems) en diversas concentraciones comprendidas entre 0 y 50 nM. Se mide la asociación por inyección de la P-selectina durante 120 segundos; se mide la disociación por

159

lavado de la superficie del chip con solución tampón durante 180 segundos. Los datos de afinidad de los diferentes anticuerpos anti-P-selectina se recogen en la tabla 2. Utilizando un programa informático de Biaevaluation se ajustan los datos 5 cinéticos a un modelo de unión de Langmuir 1:1 de la P-selectina con el anticuerpo monoclonal presentado.

Tabla 2

Datos de afinidad medidos por SPR (BIAcore® 2000)				
Anticuerpo HuMab	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)
001	$6,08 \times 10^5$	$4,19 \times 10^{-4}$	$1,45 \times 10^9$	$6,89 \times 10^{-10}$
002	$8,10 \times 10^5$	$2,13 \times 10^{-3}$	$3,81 \times 10^9$	$2,63 \times 10^{-9}$
003	$6,60 \times 10^5$	$2,91 \times 10^{-4}$	$2,27 \times 10^9$	$4,41 \times 10^{-10}$
005	$8,42 \times 10^5$	$2,89 \times 10^{-4}$	$2,91 \times 10^9$	$3,43 \times 10^{-10}$
011	$1,77 \times 10^6$	$2,38 \times 10^{-3}$	$7,44 \times 10^8$	$1,34 \times 10^{-9}$
012	$1,08 \times 10^6$	$1,25 \times 10^{-4}$	$8,65 \times 10^9$	$1,16 \times 10^{-10}$
013	$1,46 \times 10^6$	$2,02 \times 10^{-4}$	$7,22 \times 10^9$	$1,39 \times 10^{-10}$
017	$7,79 \times 10^5$	$1,39 \times 10^{-3}$	$5,59 \times 10^9$	$1,79 \times 10^{-11}$

10 Actividad inhibidora de los anticuerpos anti-P-selectina en un ensayo de adhesión de base celular y en un ensayo de roseteado

Materiales y métodos

Ensayo de adhesión celular

En el ensayo de adhesión se evalúa el efecto de los HuMab en la adhesión de las células HL60 (ATCC CCL 240), 15 similares a leucocitos, sobre la P-selectina que recubre las placas de microvaloración. Las células HL60 se marcan con

158

BCECF-AM (éster acetoximetílico de la 2',7'-bis-(2-carboxi-
etil)-5-(y -6)-carboxifluoresceína; n° de catálogo 216254, de
Calbiochem). Con P-selectina purificada de longitud completa
(procedimiento de purificación: ver páginas anteriores) de
5 una concentración de 1 µg/ml en un tampón que contiene 150 mM
NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 20 mM Tris (pH 7,4) y un 0,0005%
de Tx100 se recubren a 4°C durante una noche las placas de 96
hoyos (Nunc Immunoplate Maxisorp F96). A continuación se
bloquean los hoyos con el tampón mencionado anteriormente que
10 contiene un 3,5% de albúmina de suero bovino (BSA, Fluka) a
temperatura ambiente (RT) durante 2 h. Se preincuban los
hoyos con 50 µl de diferentes diluciones de los HuMab anti-P-
selectina o con anticuerpos anti-P-selectina de ratón de
referencia (WAPS 12.2, la correspondiente línea celular de
15 hibridoma facilitada por la ATCC) en el tampón mencionado
anteriormente que contiene un 1% de BSA a RT durante 20
minutos. Se añaden las células HL60 marcadas (50 µl, 70.000
células/hoyo) y se dejan unir a RT durante 45 min. En algunos
ensayos se preincuban las células HL60 con 20 µg/ml de IgG1
20 humano durante 30 minutos antes de introducirlas en los
hoyos, con el fin de bloquear los receptores Fc. Una vez
eliminadas las células HL60 sin fijar mediante un lavado
suave (4 veces con el tampón mencionado anteriormente), las
células adherentes se someten a una lisis con 120 µl de NP-40
25 (Fluka; al 1% en H₂O). Se transfieren 100 µl del líquido
sobrenadante a placas para medir la fluorescencia respectiva
en una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión

161

de 538 nm empleando para ello un espectrómetro de luminiscencia LS 50B (Perkin Elmer).

Ensayo de roseteado

Para evaluar el efecto de los anticuerpos en la interacción de las plaquetas activadas con las células HL60 se lleva a cabo un ensayo de roseteado (Jungi y col., Blood 67:629 (1986)) combinado con un análisis citofluorimétrico de doble color (Evangelista y col., Blood 88:4183 (1996)). Se preparan plaquetas humanas lavadas del modo descrito (Fox y col., Methods Enzymol. 215:45 (1992)). Se activan con trombina (conc. final: 1 U/ml) durante 5 min y se marcan con un anticuerpo pl-36 antihumano GPIIb conjugado con FITC (Kouns y col., J. Biol. Chem. 267:18844 (1992)). Seguidamente se incuban $1,4-2 \times 10^6$ plaquetas dentro de 70 μ l de una solución de Tyrode con diferentes diluciones de los HuMab (100 μ l) en la oscuridad, a RT durante 30 min. Se añaden 50 μ l de una suspensión de células HL60 (en solución de Tyrode) ajustada a 20×10^6 /ml. Se marcan las células HL60 por incubación con 20 μ l de un anticuerpo CD45 antihumano conjugado con PE (ficoeritrina) (n° de código: 555483, de Pharmingen). Después de incubar las células HL60 marcadas con las plaquetas y los HuMab en tubos FACS (Becton Dickinson) a temperatura ambiente durante 30 min, se analiza la formación de agregados mixtos o rosetas midiendo la fluorescencia del marcador tanto en plaquetas como en células HL60 empleando para ello un FACScan (Becton Dickinson). Se captan la difusión frontal y lateral así como las señales del verde (FITC) y del rojo (PE) mediante amplificación logarítmica con

160

longitud de onda de excitación de 488 nm y longitud de onda de emisión de 530 nm (FITC) y de 570 nm (PE), respectivamente. Se realiza una compensación electrónica para eliminar el solapamiento espectral. Se identifican las células HL60 sobre la fase de la difusión frontal y lateral. Se efectúa una estimulación (gating) de casos identificados como células HL60 para excluir las plaquetas simples. Se miden cinco mil casos de células HL60 estimuladas en cada muestra. Se utiliza una muestra, en la que se mezclan plaquetas no activadas o plaquetas activadas con trombina con células HL60 en presencia de EDTA (10 mmol/l), para establecer el umbral en la escala de fluorescencia verde. El porcentaje de células HL60 superior al umbral representa el porcentaje de plaquetas que se fijan sobre células HL60. El desplazamiento de la fluorescencia del marcador de plaquetas hacia valores de fluorescencia más bajos refleja la reducción del número de agregados mezclados con un número mayor de plaquetas adheridas en favor de un incremento del número de agregados mezclados con un número bajo de plaquetas adheridas.

20 Resultados:

En el ensayo de adhesión de las células HL60, los anticuerpos de la P-selectina inhiben la adhesión de las células HL60 sobre la P-selectina purificada con valores de IC50 comprendidos entre 0,08 y 0,5 µg/ml. Aunque las mutaciones se introducen en la porción Fc del anticuerpo, las dos variantes IgG4 e IgG1 de los HuMab son más potentes que el anticuerpo original con valores de IC50 entre 0,08 y 0,11 µg/ml según se ilustra en la figura 1. Cuando se preincuban

163

161

las células HL60 con IgG1, la potencia de los anticuerpos originales no mutados aumenta con una reducción en un factor de 3 a 4 de los valores de IC50, según se pone de manifiesto para el HuMab 002 en la figura 1. Este resultado sugiere que la mayor eficacia de los mutantes en el ensayo de adhesión se debe ante todo a la eliminación de la adhesión de las células HL60 sobre la P-selectina gracias a la porción Fc del anticuerpo con los receptores Fcγ.

En el ensayo de roseteado que evalúa la adhesión de las plaquetas activadas humanas que expresan la P-selectina sobre las células HL60, los valores de IC50 de los HuMab son incluso inferiores a los del ensayo de adhesión debido al bajo número de receptores de P-selectina en este ensayo (IC50: 0,05 - 0,3 µg/ml, con preferencia entre 0,05 y 0,2 µg/ml). La eficacia de las variantes de Fc de los HuMab correspondientes tiende a aumentar si se compara con el anticuerpo original no mutado (fig. 2). La preincubación de las células HL60 con IgG1 e IgG4 antes de la incubación con las plaquetas activadas no afecta de modo significativo la actividad inhibidora tanto de los mutantes como del anticuerpo original, indicando un papel menos acusado de la fijación mediada por los receptores Fcγ en el ensayo de roseteado si se compara con el ensayo de adhesión.

Reactividad cruzada de los anticuerpos de la P-selectina con la P-selectina de especies animales

Materiales y métodos

La reactividad cruzada de los HuMab de la P-selectina se evalúa midiendo (1) la fijación de los HuMab sobre las

162

plaquetas activadas de la rata y del mono cinomólogo aplicando un análisis FACS y (ii) su actividad inhibidora en el ensayo de roseteado que evalúa la adhesión de las plaquetas de la rata y del cinomólogo sobre las células HL60.

- 5 Para medir la fijación de los HuMab sobre plaquetas activadas de rata y cinomólogo, se lavan las plaquetas de la rata y del cinomólogo y se preparan de modo similar al aplicado para la preparación de plaquetas humanas lavadas (ver páginas anteriores). Se activan con trombina (conc.
- 10 final: 1 U/ml) durante 5 min. Se incuban las plaquetas activadas con diferentes diluciones de los HuMab (20 µl) a RT durante 30 min. Después de la unión de los HuMab se fijan las plaquetas con PFA del 2% a RT durante 15 min. Se lavan las muestras con tampón Tyrode y se resuspenden en 300 ml de
- 15 Tyrode. La unión de los HuMab se detecta con un fragmento F(ab')₂ conjugado con FITC de un IgG de conejo antihumano (código n° F0056, de Dako). Como anticuerpo de control que presenta P-selectina de rata se utiliza un anticuerpo policlonal anti-P-selectina de conejo antihumano (código n°
- 20 09361A, de Pharmingen).

- Para medir el efecto inhibidor de los HuMab de la P-selectina en el ensayo de roseteado se preparan plaquetas lavadas de rata y de cinomólogo del modo ya descrito para las plaquetas humanas. Se lleva a cabo el ensayo de roseteado
- 25 esencialmente del modo ya descrito para las plaquetas humanas. Para el marcado de las plaquetas del cinomólogo se emplea el anticuerpo pl-36 antihumano GPIIb conjugado con FITC, mientras que las plaquetas de rata se marcan con el

165

anticuerpo antirrata CD61 de ratón conjugado con FITC (código n° 554952, de Pharmingen).

Resultados

Ninguno de los anticuerpos específicos de la P-selectina de la invención, que inhiben funciones mediadas por la P-selectina humana, demostró fijarse sobre la P-selectina de rata o inhibir la formación de agregados mezclados, compuestos por plaquetas de rata y células HL60, tal como se pone de manifiesto en algunos ejemplos de la fig. 3a. Sin embargo, los HuMab de la P-selectina se fijan sobre e inhiben la P-selectina del cinomólogo (fig. 3b).

Selectividad de los anticuerpos de la P-selectina frente a la E- y la L-selectina

Materiales y métodos

La selectividad de los HuMab de la P-selectina frente a la E- y la L-selectina se determina en un ensayo ELISA sin células que mide la fijación de los anticuerpos sobre la E- y L-selectina recombinantes (ADP1 y ADP2, R&D Systems) y en un ensayo ELISA con células que mide la fijación de los anticuerpos sobre los transfectantes CHO de la E-selectina y los transfectantes 300.19 de la L-selectina (los transfectantes se generan del modo descrito por Goetz y col., J. Cell. Biol. 137:509 (1997); Ley y col., Blood 82:1632 (1993)).

En el ensayo ELISA sin células se recubren con las P-, E- o L-selectina recombinantes en una concentración de 1 µg/ml en un tampón que contiene 150 mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 20 mM Tris (pH 7,4) más un 0,0005% de Tx100 a 4°C durante una noche las placas de 96 hoyos (Nunc Immunoplate

164

Maxisorp F96). A continuación se bloquean los hoyos con el tampón mencionado anteriormente que contiene un 3,5% de albúmina de suero bovino (BSA, Fluka) a RT durante 2 h. Se preincuban los hoyos con 50 µl de diferentes diluciones de los HuMab de la P-selectina o del anticuerpo de ratón de la P-, E-selectina de referencia (BBA26; R&D Systems) y del anticuerpo de cabra de la L-selectina (AF728; R&D Systems) en el tampón mencionado anteriormente que contiene un 1% de BSA a RT durante una noche. La fijación de los HuMab se detecta empleando un IgG antihumano biotinilado (Amersham, RPN1003, concentración final: 1:1000) o para los anticuerpos de control los IgG correspondientes biotinilados antirratón o anticabra. Después de una incubación de 1 h se lavan los hoyos (3 veces) con el tampón mencionado anteriormente y se añaden 0,1 ml del complejo de estreptavidina-peroxidasa biotinilada (Amersham, RPN1051), diluido 1:750 en el tampón mencionado que contiene un 0,1% de BSA durante 30 min. Seguidamente se lavan los hoyos y se añaden 0,2 ml de la solución de sustrato de peroxidasa que contiene ABTS (2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina sulfonato), Boehringer, Mannheim) (solución patrón de ABTS: 1 ml de 40 mM ABTS, 5 µl de H₂O₂ del 30 % y 20 ml de 0,1 M acetato Na, 0,05 NaH₂PO₄). Se interrumpe la reacción al cabo de unos 10 min empleando 50 µl de citrato 0,1 M y un 0,01% de NaN₃. La reacción del color se lee en 405 nm.

En el ensayo ELISA con células se siembran los transfectantes CHO de la P- y la E-selectina, después de separar las células de la solución de disociación celular (Sigma

167

165

C5914), en cada uno de los 96 hoyos de las placas (TC Microwell F96 Nunc 167008) ajustados a 100.000 células/hoyo y se cultivan en los medios respectivos a 37°C durante una noche (medio para los transfectantes CHO de la P-selectina: 5 DMEM + 10% FCS + 2 mM glutamina + penicilina 100 U/ml /estreptomicina 100 µg/ml; medio para los transfectantes de la E-selectina: HAM F-12 + 10% FCS + 2 mM glutamina + penicilina 100 U/ml /estreptomicina 100 µg/ml + 0.1% Fungizone + 100 µg/ml de neomicina). Después de eliminar los 10 medios y bloquear los hoyos con tampón A-T (150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris (pH 7,4)) que contiene un 3% de TopBlock (código n° TB232010; Juro) durante 1 h, se añaden 50 µl de diferentes diluciones de los HuMab de la P-selectina o del anticuerpo de referencia de ratón de la P- y la E- 15 selectina (ver antes) en el tampón mencionado anteriormente que contiene un 1% de TopBlock y un 0,1% de azida y se incuban a RT durante 60 min. Después de lavar los hoyos (4 veces), se detectan los anticuerpos fijados aplicando las mismas etapas que se mencionan en el ensayo ELISA sin 20 células.

Dado que las células 300.19 de la L-selectina son células en suspensión, se ha tenido que modificar el formado del ELISA con células depositando los transfectantes 300.19 de la L-selectina en placas filtro de poliestireno de 96 25 hoyos (Corning 3510). Utilizando las placas filtro se eliminan las soluciones de bloqueo y de incubación por filtrado de las mismas a través del fondo de las placas, por lo demás el protocolo es el mismo que se ha aplicado a las

168

166
células CHO de la P- y E-selectina. Como controles se emplean CHO y 300.19 no transfectadas.

Resultados

Los anticuerpos de la invención son muy selectivos
5 frente a la E- y la L-selectina. Se fijan sobre las células CHO de la P-selectina con valores de EC50 comprendidos entre 0,01 y 0,08 µg/ml, con preferencia entre 0,01 y 0,04 µg/ml, mientras que los valores de EC50 de las células CHO de la E-selectina y las 300.19 de la L-selectina se sitúan claramente
10 por encima de 50 µg/ml, con preferencia por encima de 100 µg/ml. El HuMab 002 tiene la selectividad más elevada con un factor de selectividad frente a la E- y la L-selectina de más de 4.000 en el ensayo ELISA con células. Además, el HuMab 002 no se fija sobre los transfectantes de la E- y L-selectina
15 por encima de los niveles de base hasta una concentración de 100 µg/ml. La selectividad de las variantes IgG4v1 e IgG1v1 de Fc del HuMab 002 es similar a la del HuMab 002 original (fig. 4a-c).

Actividad inhibidora "ex vivo" de los anticuerpos de la 20 P-selectina en un sistema de flujo sanguíneo humano completo

Efecto de los HuMab de la P-selectina en la adhesión de los leucocitos a una monocapa de plaquetas

Materiales y métodos

Para abordar el efecto de los anticuerpos de la P-
25 selectina en el reclutamiento de leucocitos hacia sitios de lesión de pared vascular y trombos de plaquetas se utiliza un sistema de flujo sanguíneo humano completo, que permite medir la interacción de los leucocitos humanos y las plaquetas

humanas en diferentes velocidades de cizallamiento, esencialmente del modo ya descrito (Kirchhofer y col., Blood 89:1270 (1997)). En un dispositivo paralelo de perfusión en placa se extrae sangre humana total de la vena antecubital de un donante sano realizando la perfusión sobre una superficie de colágeno que simula un pared vascular desnuda lesionada. Se preparan las hojas de tapa recubiertas de colágeno del modo descrito (Kirchhofer y col., Blood 89:1270 (1997)). Se colocan en tres cámaras paralelas de la placa de perfusión.

10 Para permitir la medición de las diferentes velocidades de cizallamiento (65/s y 280/s) se utilizan diferentes dimensiones de cámaras de perfusión y se perfunde la sangre sobre las hojas de tapa recubiertas con colágeno con un flujo constante de sangre de 1 ml/min que se controla con bombas

15 individuales de rodillo situadas en posición distal con respecto al dispositivo de perfusión. Inmediatamente después de la extracción de la sangre de la vena y de separar la sangre en tres tubos se añade un inhibidor GPIIb/IIIa (0,5 μ mol/lamifiban) para impedir la agregación plaquetaria y

20 generar monocapas de plaquetas. Al mismo tiempo se administran los anticuerpos de la P-selectina (los HuMab, los mutantes, los correspondientes anticuerpos de referencia o los IgG1 e IgG4 humanos como controles) en diferentes concentraciones y seguidamente se introduce la mezcla del

25 inhibidor de sangre en la cámara de perfusión que contiene las hojas de tapa recubiertas con colágeno. Después de un período de perfusión de 5,5 minutos se perfunde el PBS a través de la cámara de perfusión sin interrumpir el flujo

167

170

durante 3 min. Después de una breve interrupción del flujo se fijan las cámaras con un 3% de paraformaldehído en PBS a 1 ml/min durante 2 min. A continuación se retiran las hojas de tapa de las cámaras, se fijan de nuevo durante 1 h en un 3% de paraformaldehído en PBS a 4°C y se almacenan en PBS-0,03% de azida sódica. Para evaluar el número de leucocitos que se han adherido a la monocapa de plaquetas, después de secar con aire las hojas de tapa, estas se tiñen con una solución de Diff-Quick (Dade Behring AG) y se impregnan en Merckoglas (Merck, Germany). Se utiliza un sistema de análisis por la imagen (MCID, Imaging Research Inc.) para determinar el número de leucocitos adheridos a una superficie estándar, orientada en sentido perpendicular al flujo de la sangre, separada 1 mm del comienzo de las hojas de tapa. Con una velocidad de cizallamiento de 65/s y de 280/s, el área sobre la que se cuenta el número de leucocitos es de 3,1 mm² y 2,1 mm², respectivamente.

Resultados

Los HuMab de la P-selectina inhiben la adhesión de los leucocitos a la monocapa de plaquetas de un modo dependiente de la concentración. En una velocidad de cizallamiento de 65/s y una concentración de 10 µg/ml, los HuMab inhiben la adhesión de los leucocitos en un 60 - 99 %; con preferencia en un 70-99 %. El efecto inhibidor de los HuMab es más pronunciado cuando la velocidad de cizallamiento es mayor, es decir, de 280/s (más próxima a una situación arterial) si se compara a una velocidad de cizallamiento venosa de 65/s. En conjunto, a una velocidad de cizallamiento de 280/s el número

de leucocitos adheridos es menor que en la velocidad de 65/s. Si se comparan las variantes Fc con los correspondientes anticuerpos originales, aquellas tienen una actividad inhibidora similar en la cámara de perfusión "ex vivo", tal como se ha demostrado para el HuMab 002 y sus variantes IgG4v1 e IgG1v1 (Fig.5). El aumento de la actividad inhibidora de los mutantes frente al anticuerpo original, que se ha constatado en los ensayos "in vitro", no se observa en la cámara de perfusión "ex vivo", lo cual puede ser debido a la saturación de los receptores Fc γ de los leucocitos en la sangre humana total.

Efecto de los HuMab de la P-selectina en la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales

Materiales y métodos

Para abordar el potencial antiinflamatorio de los HuMab de la P-selectina en condiciones de cizallamiento se utiliza el sistema de flujo sanguíneo humano mencionado antes para un ensayo en el que las células endoteliales se aplican como cubierta sobre hojas de tapa. Se aíslan células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) del cordón umbilical por digestión con collagenasa de tipo II (Roche, Suiza) con arreglo al método de Jaffe y col., 1993 (añadir la cita completa). Se cultivan en frascos de cultivo de tejido cubierto con un 1 % de gelatina en un medio 199 (M199, Sigma, Alemania) suplementado con un 20% de suero fetal de ternera (Gibco, Auckland), 100 IU/ml de penicilina (Gibco, Auckland), 0,1 mg/ml de estreptomycin (Gibco, Auckland), 2 mmol/l de L-glutamina (Gibco, Auckland), 10 U/ml de heparina (Sigma) y 50

170

µg/ml de EC suplemento de crecimiento (Sigma, Alemania). Se cultivan las HUVEC hasta confluencia (aprox. 4 días), se pasan con tripsina/ácido etilendiaminotetraacético (Gibco, Auckland) y se siembran sobre hoja de tapa de plástico

5 Thermanox (aprox 200.000 EC/hoja de tapa) recubierta previamente con un 1% de gelatina (Fluka, Alemania). Se dejan sedimentar las HUVEC que se convierten en confluyentes en un período de 1-2 días. Se estimulan con 20 ng/ml de IL-4 (R&D Systems) 24 h antes de iniciar la perfusión y con histamina

10 10^{-4} M (Fluka, Germany) 5-10 min antes de la perfusión. Cada ensayo se realiza con las HUVEC del pasaje 1. Se colocan las hojas de tapa con las monocapas confluyentes de las HUVEC estimulados en las cámaras de perfusión de placas paralelas del modo descrito antes. De modo semejante a los ensayos de

15 perfusión descritos antes, se extrae sangre total de donantes sanos. Sin embargo, en estos ensayos se anticoagula la sangre con un inhibidor de trombina Ro-46-6240 (10 µM) y se preincuba con diferentes concentraciones de los anticuerpos de la P-selectina (HuMab, mutantes, anticuerpos de referencia

20 correspondientes) o IgG1 e IgG4 humanos como controles durante 5 min inmediatamente antes de la perfusión a través de las células endoteliales activadas. Se ajusta el caudal de sangre a 1 ml/min, la velocidad de cizallamiento a 65/s y el tiempo de perfusión a 5,5 min. Después de un período de

25 lavado de 3 min con PBS, se fijan las HUVEC y los leucocitos adheridos con un 3% de paraformaldehído durante 2 min en las mismas condiciones de flujo ya descritas. A continuación se retiran las hojas de tapa de las cámaras, se sumergen en un

171

fijador fresco durante 1 h y se almacenan en PBS-0,02% de azida sódica. Para los análisis morfométricos se tiñen los leucocitos con un anticuerpo de ratón contra el antígeno CD45 común de leucocitos, que se ha marcado previamente empleando
5 una inmunoglobulina antirratón biotinilada modificada (Animal Research Kit, Dako, USA). Los núcleos se contratiñen con hematoxilina (J.T. Baker, Holanda).

Resultados

La estimulación de las HUVEC con la combinación de la
10 IL-4 y la histamina da como resultado la expresión de la P-selectina y la adhesión de los diferentes tipos de leucocitos a los granulocitos (incluidos los PMN y los eosinófilos) que constituyen la porción predominante de los leucocitos adheridos. Los HuMab de la invención inhiben la adhesión de
15 la población total de leucocitos en un 60-90 % en 3 µg/ml. La actividad inhibidora global de las variantes Fc no es significativamente diferente de la de los HuMab no mutados.

Los HuMab de la P-selectina no presentan un efecto diferencial en los diferentes subtipos de leucocitos. El
20 efecto en los granulocitos es más pronunciado si se compara con los leucocitos mononucleados. Los anticuerpos de la invención inhiben la adhesión de los granulocitos (incluidos los PMN y los eosinófilos) en un 90-99 %, de los monocitos en un 50-88 % y de los linfocitos en un 5-40 %. La respectiva
25 disminución de los números absolutos de los diferentes subtipos de leucocitos se presenta a título representativo en la figura 6 para el IgG4v1.

174

Potencial de los HuMab de la P-selectina para activar el sistema de complemento

Ensayo ELISA de fijación de Clq y C3c

Para determinar la capacidad de los anticuerpos de la invención para inducir la fijación de Clq y la activación de C3 se lleva a cabo un ensayo ELISA. El Clq forma parte del sistema inmune adaptador y, después de unirse a complejos inmunes, dispara la activación secuencial de diversos cimógenos. Las enzimas a su vez provocan la rotura de las moléculas de C3 lo cual puede traducirse en el inicio de una reacción inflamatoria, la opsonización de partículas extrañas o aberrantes y la lisis de las membranas celulares.

En principio se recubre la placa ELISA con una serie de concentraciones del anticuerpo, al que se añaden Clq o suero humano recogido, como fuentes de C3. La fijación del Clq o C3c se detecta con un anticuerpo dirigido contra el Clq o C3c humanos y después con un conjugado marcado con peroxidasa.

El HuMab 002 (el material derivado del hibridoma y del transfectoma transitorio), sus variantes mutantes y los anticuerpos de control se ensayan en concentraciones de 0,16-20 µg/ml. Como control negativo se utiliza un IgG4 humano (CLB, Holanda, 0,5 µg/ml patrón), que fija muy débilmente el Clq. Se incorpora como control positivo el IgG1 humano (Sigma, 2 µg/ml patrón). Para la detección del Clq se utiliza un anticuerpo de conejo dirigido contra el Clq (Dako) y un anticuerpo IgG de cerdo anticonejo, conjugado con peroxidasa de rábano picante (horseradish) (Sigma). Para la detección del C3c se aplica un anticuerpo C3 de ratón antihumano y un

172

175

anticuerpo IgG de conejo antirratón, conjugados con peroxidasa de rábano picante (Sigma).

Los cálculos relativos a los valores de EC50 o de la fijación máxima en 10 µg/ml (Bmax) de los HuMab ensayados se realizan empleando un ajuste de curva de regresión no lineal (fijación sobre un sitio) con un programa informático de la empresa Graphpad Prism.

Resultados

El HuMab 002 según la invención es capaz de fijar con
10 eficacia el Clq según se desprende de los valores de EC50 de 0,946 µg/ml y 1,159 µg/ml, y de los valores de la Bmax (OD405) de 0,987 y 0,711 para el material derivado del hibridoma y del transfectoma, respectivamente. Como se esperaba, el control negativo humano IgG4 no fija el Clq, como se
15 deduce del valor de la Bmax de 0,222 en OD405. Sin embargo, las tres variantes de Fc ensayadas (IgG4v1, IgG1v1, IgG1v2) han perdido su capacidad de fijar el Clq, como indican los valores OD405 de la Bmax de 0,132, 0,119 y 0,132, respectivamente (tabla 3). En línea con las capacidades de fijación del
20 Clq, la deposición del C3 sobre el HuMab 002 (derivado de hibridoma y de transfectoma) tiene lugar de un modo dependiente de la concentración de anticuerpo y los valores de EC50 se sitúan entre 2,7 µg/ml y 8,3 µg/ml. No obstante, las tres variantes de Fc son incapaces de iniciar la
25 deposición del C3, tal como indican los valores OD405 de la Bmax de 0,104, 0,156 y 0,133, respectivamente (tabla 3).

Dado que el HuMab 002 interacciona con los componentes del complemento, este anticuerpo tiene el potencial intrín-

seco de inducir la CDC "in vivo". Por consiguiente, la parte Fc de este anticuerpo se modifica con arreglo a la invención.

Tabla 3

	ELISA de Clq		ELISA de C3	
	Bmax (OD405 a 10 µg/ml)	fondo (OD405)	Bmax (OD405 a 10 µg/ml)	fondo (OD405)
HuMab 002 (hibridoma)	0,987	0,079	4,47	0,098
IgG4v1	0,132		0,104	
IgG1v1	0,119		0,156	
IgG1v2	0,132		0,133	
HuMab 002 (transitorio)	0,711		4,071	-
IgG4	0,222		0,182	

Potencial de los HuMab de la P-selectina para fijar los

5 receptores Fcy

Los efectos de citotoxicidad dependientes de los anticuerpos IgG vienen mediados por los receptores Fcy de las células efectoras. Se investiga mediante análisis FACS la fijación del HuMab 002 derivado de hibridoma y de trans-
10 fectoma así como de las variantes mutantes y los anticuerpos de control sobre las células efectoras de la sangre humana que expresan el Fcy.

Materiales y métodos

Los transfectantes FcyRI IIA1.6 o las células efectoras
15 recién aisladas se incuban con anticuerpos y se detecta la fijación del anticuerpo con IgG F(ab)₂ de conejo antihumano

175

marcado con FITC (DAKO) o con IgG F(ab)₂ de conejo antihumano marcado con FITC (BD/Pharmingen). Se ensaya el HuMab 002 (material transitorio derivado de transfectoma y/o de hibridoma y variantes mutantes) en una concentración de 1 5 µg/ml (transfectantes IIA1.6) o de 10 µg/ml (células efectoras). Como control negativo se utiliza la ausencia de anticuerpo primario o IgG4 humano (10 µg/ml). Para detectar la expresión de FcγRI en células IIA1.6 se utiliza el CD65 de ratón antihumano marcado con FITC (BD/Pharmingen). En los 10 ensayos en los que se utilizan células mononucleadas de sangre periférica enriquecidas con células NK, las células NK se identifica por doble tinción empleando el CD56 de ratón antihumano marcado con PE (BD/Pharmingen). Los granulocitos y monocitos se identifican en base al perfil FSC/SSC.

15 Se incuban las células IIA1.6, transfectante IIA1.6-FcγRI y células efectoras recién aisladas con anticuerpos. Se detecta la fijación del anticuerpo con Rb-α-huIgG F(ab)₂ marcado con FITC (DAKO) o con Rb-α-huIgG F(ab)₂ marcado con FITC (BD/Pharmingen).

20 Se ensaya el HuMab 002 (material transitorio derivado de transfectoma, de hibridoma y variante mutante) en una concentración de 1 µg/ml en un ensayo de fijación de transfectante IIA1.6-FcγRI. Se utilizan como control negativo las células IIA1.6 de tipo salvaje. Como control de la 25 expresión del FcγRI se utiliza el m-α-huCD64-FITC (BD/Pharmingen).

Se ensaya el HuMab 002 (material transitorio derivado de transfectoma, de hibridoma y variante mutante) en una

176
concentración de 10 µg/ml en el ensayo de fijación de células efectoras. El material transitorio de transfectoma no se somete al ensayo de fijación de granulocitos. Se utiliza el IgG4 (10 µg/ml) como control negativo en todos los ensayos de
5 fijación de células efectoras, excepto en el ensayo de fijación de granulocitos.

Se enriquece la sangre total con células NK empleando un kit de aislamiento de NK (Dyna1 Biotech ASA, Oslo, Noruega). Las células NK se identifican por tinción con m-α-
10 huCD56-FITC.

Las PBMC (células mononucleadas de la sangre periférica) se obtienen de sangre total empleando un procedimiento Ficoll descrito en el protocolo incluido en el kit de aislamiento de las células NK (Dyna1 Biotech ASA,
15 Oslo, Noruega). Se identifican los monocitos en base a su perfil FSC/SSC. Los granulocitos se aíslan de la sangre total empleando el tampón de lisis FACS y se identifican en base al perfil FSC/SSC.

Se incuban las células efectoras recién aisladas con
20 los anticuerpos y se detecta la fijación con IgG F(ab)₂ de conejo antihumanos marcados con FITC (DAKO) o IgG F(ab)₂ de conejo antihumanos marcados con FITC (BD/Pharmingen). Se ensaya el HuMab 002 (material transitorio derivado de transfectoma, de hibridoma y variantes mutantes) en una
25 concentración de 10 µg/ml. Se utiliza como control negativo la ausencia del anticuerpo primario o el IgG4 humano (10 µg/ml). Se aíslan las células NK de las muestras de MNC con el kit de aislamiento NK (Miltenyi Biotec, USA). En los

179

179

ensayos en los que se utilizan células mononucleadas de sangre periférica enriquecidas con células NK, las células NK se identifica por doble tinción empleando el CD56 de ratón antihumano marcado con PE (BD/Pharmingen). Los granulocitos y monocitos se aíslan con arreglo al estado de la técnica a partir de las PBMC (p.ej. con el kit de aislamiento de monocitos (Miltenyi, ver más arriba). Los granulocitos y los monocitos se identifican en base al perfil FSC/SSC.

Resultados

10 El HuMab 002 según la invención es capaz de fijarse sobre el FcR como indica la fijación sobre granulocitos, monocitos y células NK. Las tres variantes de Fc ensayadas (IgG4v1, IgG1v1 e IgG1v2) han perdido por complejo la capacidad de fijarse sobre las células NK (tabla 4). Además,
15 el HuMab 002 se une eficazmente sobre granulocitos y monocitos, mientras que las variantes mutantes presentan niveles de fijación comparables a la ausencia de anticuerpo primario o de IgG4, tal como indican los porcentajes de células que se unen al anticuerpo en las tablas 5 y 6. Esto
20 indica que las variantes mutantes han perdido la capacidad de interaccionar con el FcR de las células efectoras.

Dado que el HuMab 002 puede interaccionar eficazmente con FcR, este anticuerpo tiene el potencial intrínseco de inducir la citotoxicidad "in vivo" mediada por células
25 dependiente de anticuerpo. La inactivación de la interacción con FcR realizada para las variantes de Fc según la invención impide la ADCC de manera eficaz.

180

Tabla 4

Anticuerpo	fijación a células NK (% de fijación del anticuerpo a células)
ninguno	0,03
HuMab 002 (hibridoma)	90,92
HuMab 002 (transitorio)	37,40
IgG4 humano	0,06
IgG4v1	0,06
IgG1v1	0,12
IgG1v2	0,00

Tabla 5

Anticuerpo	fijación a monocitos (% de fijación del anticuerpo a monocitos)
ninguno	8,5
HuMab 002 (hibridoma)	38,4
HuMab 002 (transitorio)	31,3
IgG4 humano	9,4
IgG4v1	14,5
IgG1v1	12,3
IgG1v2	14,0

Tabla 6

Anticuerpo	fijación a granulocitos (% de fijación del anticuerpo a granulocitos)
ninguno	1,2
HuMab 002 (hibridoma)	63,6
IgG4v1	1,6
IgG1v1	2,1
IgG1v2	2,0

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento Clq, que contiene una parte Fc derivada de un origen humano y está caracterizado porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG1, que contiene por lo menos una mutación en L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y/o P329 o es un anticuerpo del subgrupo humano IgG4, en el que S228 se reemplaza por P y L235 se reemplaza por E.
- 10 2. Línea celular de hibridoma DSM ACC2640, DSM ACC2641 o DSM ACC2642.
3. Un anticuerpo anti-P-selectina que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma DSM ACC2640, DSM ACC2641 o DSM ACC2642
- 15 4. Un anticuerpo anti-P-selectina, caracterizado porque
 - a) es un anticuerpo humano o humanizado y
 - b) se fija sobre la P-selectina con una especificidad 1000 veces mayor que sobre la E- o la L-selectina según se mide por los valores de EC50 en un ensayo ELISA, en el que la P- y E- y/o L-selectina se aplican recubriendo la placa de microvaloración.
- 20 5. Una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, 3 ó 4.
- 25 6. Un vector que contiene la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5.
7. Una célula hospedante que contiene el vector de la reivindicación 6.

8. Un método para la obtención de una molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, 3 ó 4 que consiste en cultiva la célula hospedante de la reivindicación 7 en condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo y en recuperar dicha molécula de anticuerpo de dicho cultivo.

9. Una composición que contiene una molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, 3 ó 4 o una molécula de anticuerpo producida por el método de la reivindicación 8.

10 10. La composición de la reivindicación 9, que es una composición farmacéutica o de diagnóstico.

11. Una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo de la reivindicación 1, 3 ó 4 y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 12. Método para el tratamiento de un paciente que necesite la terapia, caracterizado por la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según la reivindicación 1, 3 ó 4.

20 13. Uso de un anticuerpo definido en las reivindicaciones 1, 3 ó 4 para la terapia.

14. Uso de un anticuerpo definido en las reivindicaciones 1, 3 ó 4 para la fabricación de un medicamento destinado a la profilaxis y el tratamiento de trastornos inflamatorios y trombóticos.

25 15. Uso según la reivindicación 14 para el tratamiento de la PAOD o de la CLI.

16. Kit que contiene una molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, 3 ó 4, una molécula de ácido nucleico de la

reivindicación 5, un vector de la reivindicación 6 o una célula hospedante de la reivindicación 7.

17. Una composición que contiene un anticuerpo, caracterizada porque dicho anticuerpo se fija sobre la P-selectina, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y no se fija sobre el factor de complemento Clq.

18. La composición de la reivindicación 17, que es una composición farmacéutica o de diagnóstico.

19. Método para el tratamiento de un paciente que necesite la terapia, caracterizado por la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y no se fija sobre el factor de complemento Clq.

20. Uso de un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y no se fija sobre el factor de complemento Clq para la terapia.

21. Uso de un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y no se fija sobre el factor de complemento Clq para la fabricación de un medicamento destinado a la profilaxis y el tratamiento de trastornos inflamatorios y trombóticos.

22. Uso según la reivindicación 21 para el tratamiento de la PAOD y de la CLI.

23. La invención tal como se ha descrito.

182

185

. - 110 - ;

LISTADO DE SECUENCIAS

184

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- <120> ANTICUERPOS ANTI-P-SELECTINA
- <130> 22354WO
- <160> 52
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

- <210> 2
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 2

187

- 112 -

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Thr Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Arg Ile Ser Met Asp Arg Gly Val Lys Asn Asn Trp Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 4
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Thr Ala Ala Gly Asp Ile Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Arg Tyr Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Asp Trp Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 6

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Phe Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Ser
65 70 75 80

Leu Leu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Phe Asp Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 7
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 8
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asp Asp Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

- 117 -

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 10

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asp Asp Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 12

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Phe Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Ser
65 70 75 80

- 119 -

Leu Leu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Phe Asp Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 14
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

- 120 -

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Arg Phe Asp Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Asp Trp Phe Asp
 100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 16
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Arg Phe Asp Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Asp Trp Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 18

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Arg Phe Asp Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Asp Trp Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 20
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Thr Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gln Asn Trp Ile Asp Val Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 22
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Gln Pro Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Asn Thr Leu Thr Glu Leu
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asn Gly Glu Ala Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asp Leu Ala Gly Gly Ser Asp Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 24
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

201

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 25

<211> 329

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
115 120 125

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145 150 155 160

21

22

- 129 -

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
165 170 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 26

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

205

103

- 130 -

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 27

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

205

- 132 -

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

208

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 28
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

207

- 134 -

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Ser Tyr Asp Met His
1 5

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

210

208

<400> 30

Asn Tyr Asp Met His
1 5

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Glu Leu Ser Met His
1 5

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Gly Ile Thr Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Ala Ile Thr Ala Ala Gly Asp Ile Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Phe Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Ala Ile Ser Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 38

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Gly Arg Ile Ser Met Asp Arg Gly Val Lys Asn Asn Trp Phe Asp Pro
1 5 10 15

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Gly Arg Tyr Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Asp Trp Phe Asp Pro
1 5 10 15

<210> 40
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Phe Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Asp Asp Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 42
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Gly Arg Phe Asp Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Asp Trp Phe Asp Pro
1 5 10 15

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Gln Gln Arg Asn Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Val Thr
1 5 10

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Gln Gln Arg Tyr Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

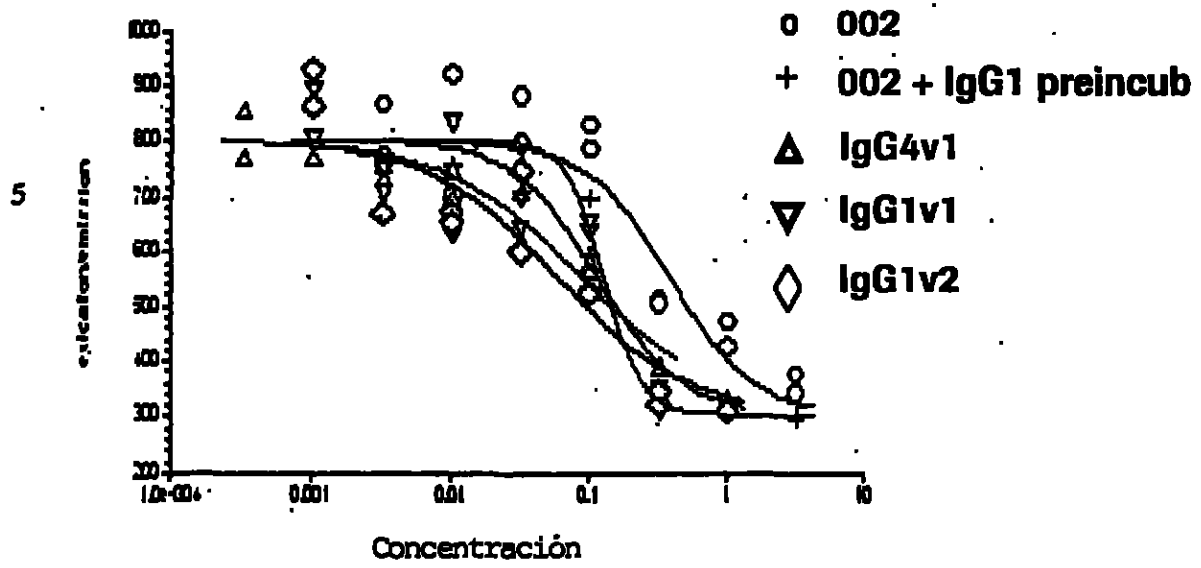


Fig.1

10

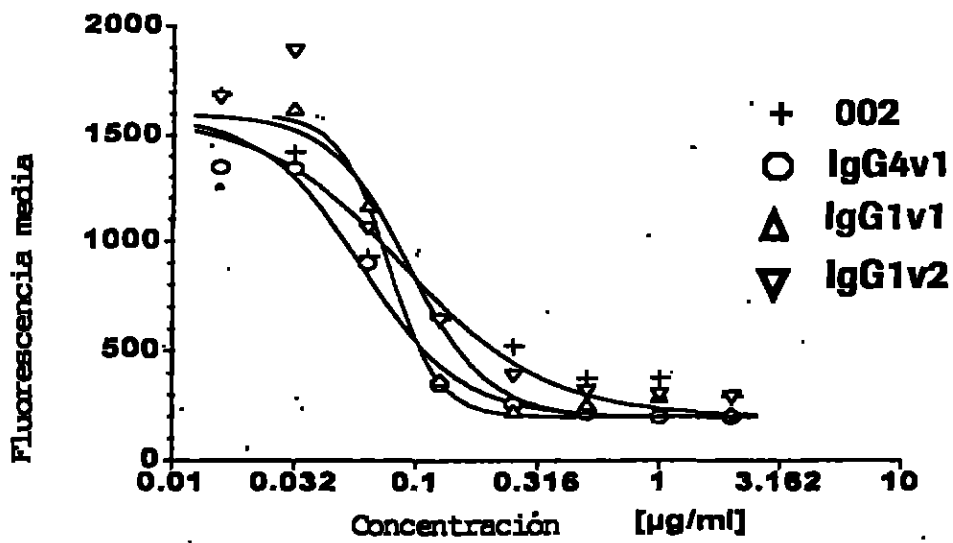


Fig.2

5

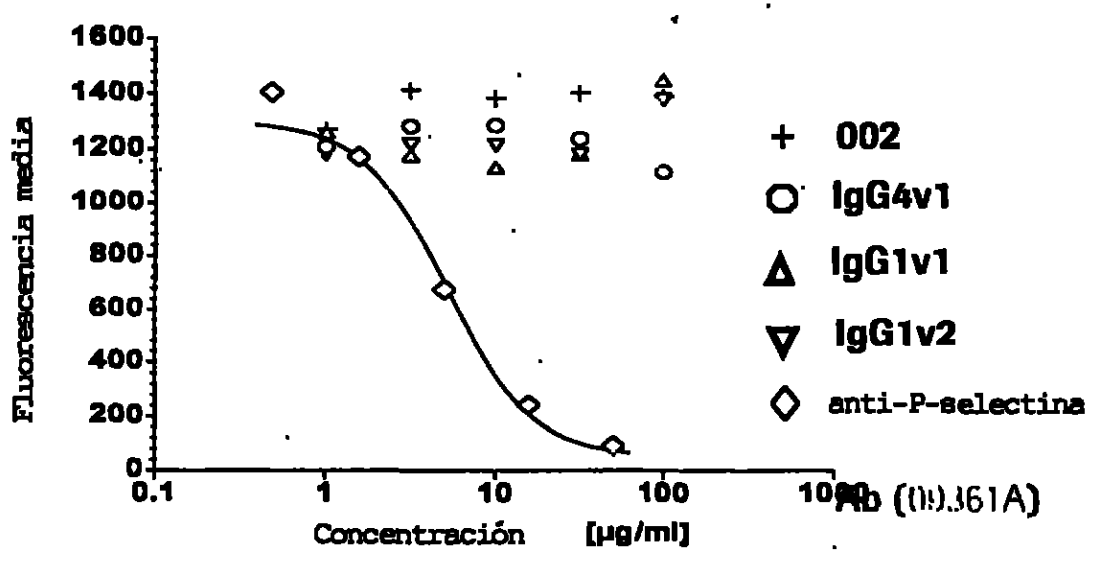


Fig. 3a

10

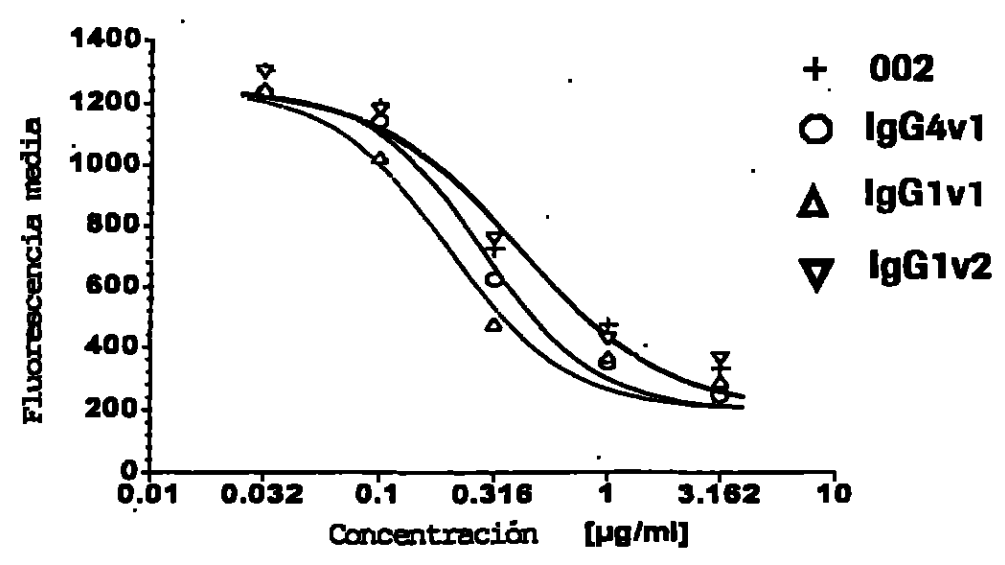
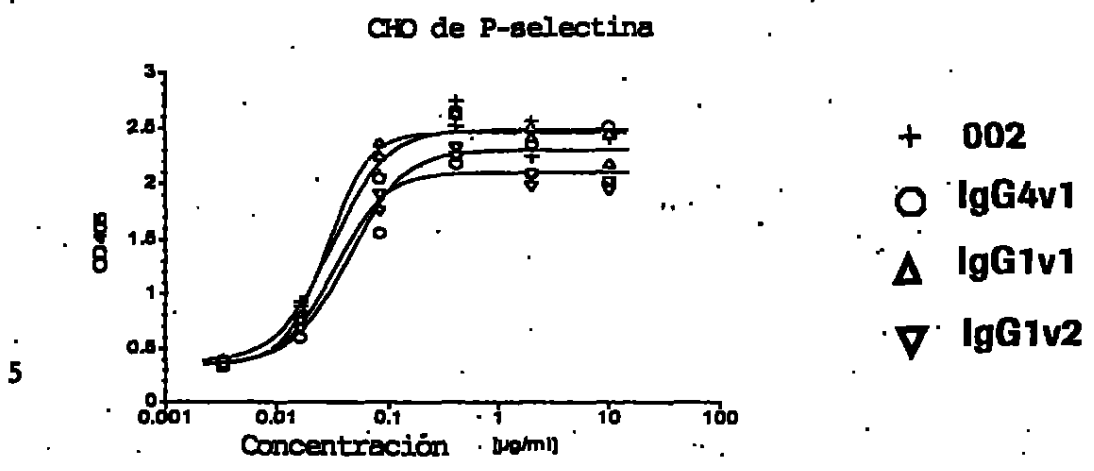


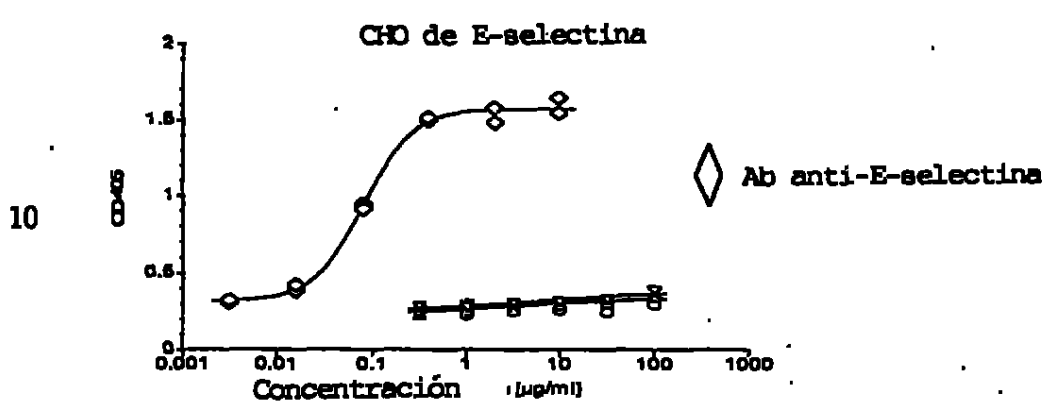
Fig. 3b

15



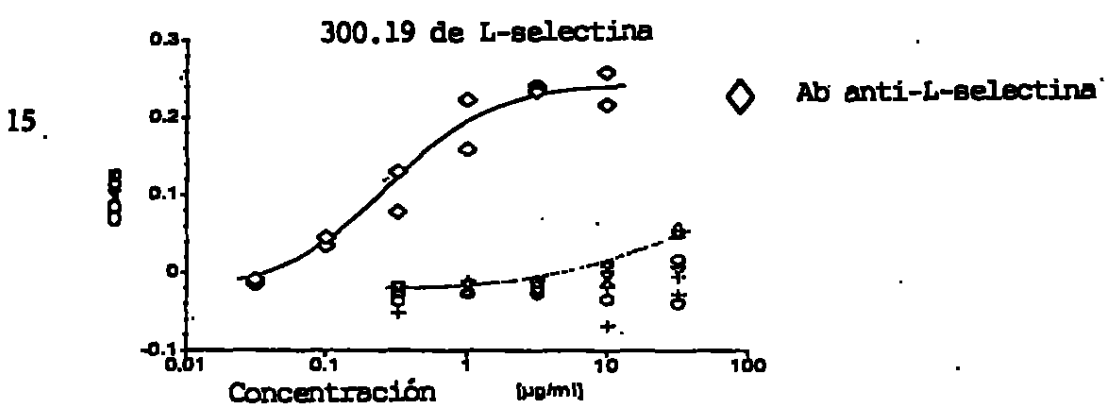
5

Fig. 4a



10

Fig. 4b



15

Fig. 4c

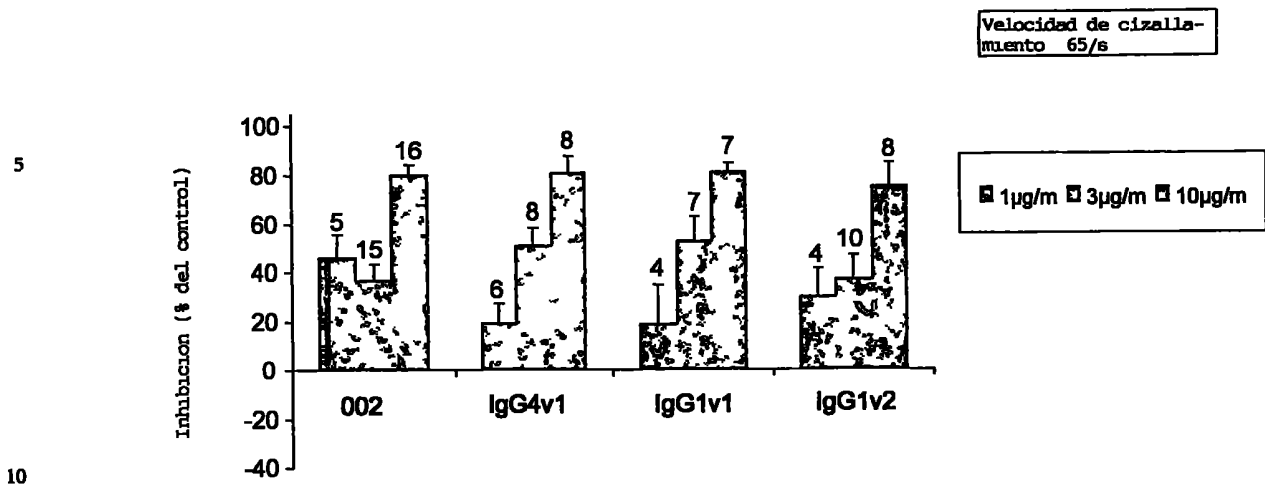
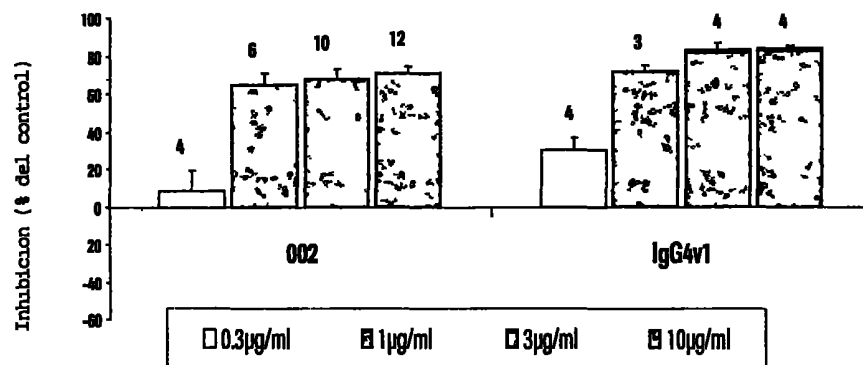


Fig 5

Fig. 6a

5



5

10

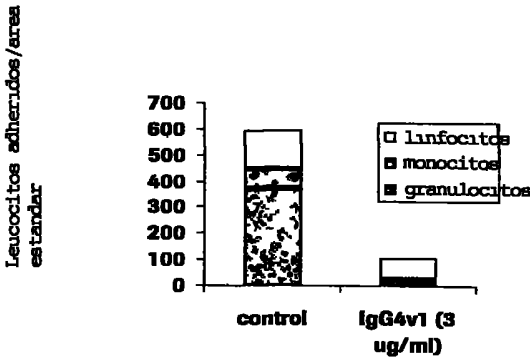


Fig 6b

TRADUCCION OFICIAL No. 2006-09-20-814
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Colombia

Caso 22354

Declaración

Yo, el suscrito Notario Público de Basilea/Suiza, por el presente declaro que la copia anexa llamada 'Cesión' es una copia fiel del documento original que me ha presentado

F. Hoffmann-La Roche AG

de Basilea/Suiza.

Basilea/Suiza, este día 11-09-2006 (día once de septiembre de dos mil seis)

Sello notarial.

Leg. Prot. 2006 No. 389

(firma: ilegible)

Notario Público

220

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por (ilegible)
3. actuando como (ilegible)
4. lleva el sello/estampilla de (ilegible)

CERTIFICADO

5. en Basilea
6. el 13 de septiembre de 2006
7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basilea
8. No. 8'304/14'064
9. Sello/Estampilla
Sello de la Cancillería de Estado,
Ciudad de Basilea
10. Firma: (ilegible)
Heidi Fischer

PRODUCTORA OFICIAL
CANTÓN DE BASELSTADT
CANTÓN DE BASELSTADT
CANTÓN DE BASELSTADT

223

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

QUI SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

479263
Anda Escobar
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPLEA
LAS FIRMAS DE LOS

2000 SEP 21 A 10:55

[Signature]
JEFE DE LEGALIZACIONES
ENCARGADO DE BOGOTA D.C.

221

Caso 22354

Traspaso

Yo/Nosotros, el suscrito(s)

Yvo Graus, científico, ciudadano holandés
Pienemanstraat 112, NL-6717 WG Ede, Holanda

Jacques Himber, biólogo, ciudadano francés
1 Chemin du Peternit, F-68500 Guebwiller, Francia

Miranda Jansen-Molenaar, científica, ciudadana holandesa
Vechtensteinlaan 56, NL-3601 CL Maarssen, Holanda

Dorothee Kling, biólogo, ciudadano alemán
Kirchmaettle 22/1, D-79400 Kandern-Tannenkirch, Alemania

Erhard Kopetzki, bioquímico, ciudadano alemán
Kastnerhofstrasse 21, D-82377 Penzberg, Alemania

Paul Parren, científico, ciudadano holandés
Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk, Holanda

Frank Rebers, científico, ciudadano holandés
Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT Utrecht, Holanda

Beat Stalner, bioquímico, ciudadano suizo

224

222

18 Im Brunnacker, CH-4112 Baettwill, Suiza

Anne Stern, bióloga, ciudadana alemana
Saalangerstrasse 33, D-82377 Penzberg, Alemania

Pamela Strein, doctora en medicina, ciudadana alemana
Oetlingerstrasse 187, CH-4057 Basilea, Suiza

Kay-Gunnar Stubenrauch, químico, ciudadano alemán
An der Freiheit 105, D-82377 Penzberg, Alemania

Jan van de Winkel, científico, ciudadano holandés
Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zelst, Holanda

Martine van Vugt, científica, ciudadana holandesa
Fluweelmos 6, NL-3994 KR Houten, Holanda

CEDENTE(S), por el presente declaro que soy/somos el inventor(es)
único/conjunto de la invención llamada:

Anticuerpos anti-p-selectina

para la cual la primera solicitud(es) se registró así:

<u>País</u>	<u>Fecha de registro</u>	<u>No. Serial</u>
Europa	13.04.2004	04008722.3

225

113

y que por una causa contractual adecuada, el recibo y suficiencia de lo cual se reconoce por el presente, yo/nosotros hemos vendido, cedido y transferido todos los derechos y título a y de dicha invención y de dicha solicitud(es) en todos los países del mundo al CESIONARIO:

F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124,
CH-4070 Basel (Suiza)

La presente cesión es para, pero no se limita a, los siguientes países:

Argentina, Australia, Austria, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, Colombia, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Israel, Italia, Japón, Kazajistán, Corea, Luxemburgo, México, Mónaco, Holanda, Nueva Zelanda, Noruega, Pakistán, República Popular China, Filipinas, Polonia, Portugal, Rusia, Arabia Saudita, Sur África, España, Suecia, Suiza, Taiwán, Turquía, Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte, Ucrania, Uruguay, EE.UU., Venezuela.

En virtud de esta cesión dicho CESIONARIO tiene pleno poder para solicitar y obtener en su propio nombre o en cualquier otro nombre y para sus propios fines y cuenta PATENTE DE INVENCION en todo el mundo, especialmente en los países anteriormente nombrados, y a reivindicar el derecho de prioridad de la primera solicitud(es) presentada en el país (países) anteriormente nombrado de acuerdo con las convenciones internacionales.

Se requiere legalización

224

**Firmado en Basilea, Suiza
el 25 de febrero de 2005**

(firma: ilegible)	Jacques Himber
(firma: ilegible)	Dorothee Kling
(firma: ilegible)	Beat Steiner
(firma: ilegible)	Pamela Strein

Legalización

**Por el presente certificamos que la firma de las personas anteriormente
nombradas**

**Jacques Himber, biólogo
Dorothee Kling, biólogo
Beat Steiner, bioquímico
Pamela Strein, doctora en medicina**

**empleados de F. Hoffmann-La Roche AG, a quien/es conocemos personalmente,
es auténtica.**

**Basilea, Suiza 30 MAR 2005
No. 5240**

(firma: ilegible)	Cancillería de Estado
Ruedi Eggs	Cludad de Basilea

227

26

Sello: Cancillería de Estado * Ciudad de Basilea *

Firmado en
el

_____	Erhard Kopetzki
_____	Anne Stern
_____	Kay-Gunnar Stubenrauch

Firmado en
el

_____	Yvo Graus
_____	Miranda Jansen-Molenaar
_____	Paul Parren
_____	Frank Rebers
_____	Jan van de Winkel
_____	Martine van Vugt

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 20 de septiembre de 2006, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINISTERIO DE JUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

226

Colombia

Case 22354

Declaration

I, the undersigned Notary public of Basle/Switzerland, herewith declare that the copy entitled Assignment is a true copy of the original document which has been presented to me by

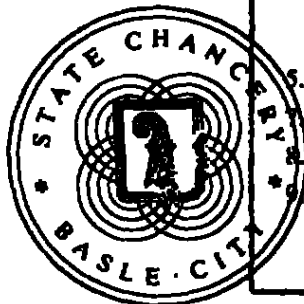
F. Hoffmann-La Roche AG

of Basle/Switzerland.

this 11-09-2006 (eleventh day of September two thousand and six)

Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel

Leg. Prot. 2006 No. 389



APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)

This official document

2. is signed by

3. In his/her function as

4. and certified by the seal of the

Certified 13 Sep. 2006

5. in Basel (Bâle)

6. on

by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

no. 209/14'064

Seal / stamp:

10. Signature:

Heidi Fischer

229

Assignment

I/WE, the undersigned

Yvo Graus, scientist, a Dutch citizen
Pienemanstraat 112, NL-6717 WG Ede, Netherlands

Jacques Himber, biologist, a French citizen
1 Chemin du Petermit, F-68500 Guebwiller, France

Miranda Jansen-Molenaar, scientist, a Dutch citizen
Vechtensteinlaan 56, NL-3601 CL Maarssen, Netherlands

Dorothee Kling, biologist, a German citizen
Kirchmaettle 22/1, D-79400 Kandern-Tannenkirch, Germany

Erhard Kopetzki, biochemist, a German citizen
Kastnerhofstrasse 21, D-82377 Penzberg, Germany

Paul Parren, scientist, a Dutch citizen
Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk, Netherlands

Frank Rebers, scientist, a Dutch citizen
Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT Utrecht, Netherlands

Beat Steiner, biochemist, a Swiss citizen
18 Im Brunacker, CH-4112 Baettwil, Switzerland

Anne Stern, biologist, a German citizen
Sealangerstrasse 33, D-82377 Penzberg, Germany

Pamela Strein, medical doctor, a German citizen
Oetlingerstrasse 187, CH-4057 Basel, Switzerland

Kay-Gunnar Stubenrauch, chemist, a German citizen
An der Freiheit 105, D-82377 Penzberg, Germany

Jan van de Winkel, scientist, a Dutch citizen
Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist, Netherlands

Martine van Vugt, scientist, a Dutch citizen
Fluweelmos 6, NL-3994 KR Houten, Netherlands

ASSIGNOR(S), herewith declare that I am/we are the sole/joint inventor(s) of the invention entitled:

Anti-P-selectin antibodies

for which the first application(s) was (were) filed as follows:

Country	Filing date	Serial No.
Europe	13.04.2004	04008722.3

and that for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, I/WE have sold, assigned and transferred all rights and title to and from the said invention and from the said application(s) in all countries of the world to the ASSIGNEE:

F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124,
CH-4070 Basel(Switzerland)

Legalization required

Signatures see reverse side

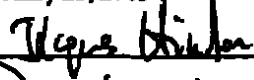
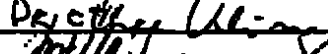
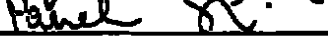
The present assignment is for, but is not limited to the following countries:

Argentina, Australia, Austria, Belgium, Brazil, Canada, Chile, Colombia, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Israel, Italy, Japan, Kazakhstan, Korea, Luxembourg, Mexico, Monaco, Netherlands, New Zealand, Norway, Pakistan, People's Republic of China, Philippines, Poland, Portugal, Russia, Saudi Arabia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, Turkey, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, Ukraine, Uruguay, U.S.A., Venezuela.

By virtue of this assignment the said ASSIGNEE is fully entitled to apply for and obtain in their own name or in any other name and for their own purposes and account LETTERS PATENT in the whole world, especially in the above-named countries, and to claim therefor the right of priority of the first filed application(s) in the above-named country (countries) in accordance with international conventions.

Signed at Basel, Switzerland

on February 25, 2005

	Jacques Himber
	Dorothee Kling
	Beat Steiner
	Pamela Strein

Legalization

We hereby certify that the signature of the above named

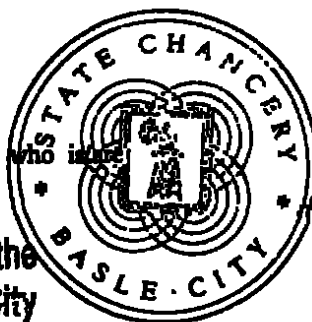
Jacques Himber, biologist
Dorothee Kling, biologist
Beat Steiner, biochemist
Pamela Strein, medical doctor

in the employ of F. Hoffmann-La Roche AG, who is personally known to us, is genuine.

Basel, Switzerland

No. **State Chancery of the**
30. März 2005 Canton of Basle-City

5240



Signed at

on

_____	Erhard Kopetzki
_____	Anne Stern
_____	Kay-Gunnar Stubenrauch

Signed at

on

_____	Yvo Graus
_____	Miranda Jansen-Molenaar
_____	Paul Parren
_____	Frank Rebers
_____	Jan van de Winkel
_____	Martine van Vugt

228

TRADUCCION OFICIAL No. 2006-09-20-615
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Colombia

Caso 22354

Declaración

Yo, el suscrito Notario Público de Basilea/Suiza, por el presente declaro que la copia anexa llamada 'Cesión' es una copia fiel del documento original que me ha presentado

F. Hoffmann-La Roche AG

de Basilea/Suiza.

Basilea/Suiza, este día 11-09-2006 (día once de septiembre de dos mil seis)

Sello notarial.

Leg. Prot. 2006 No. 388

(firma: ilegible)
Notario Público

231

229

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
- Este documento público
2. ha sido firmado por (ilegible)
3. actuando como (ilegible)
4. lleva el sello/estampilla de (ilegible)

CERTIFICADO

5. en Basilea
6. el 13 de septiembre de 2006
7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basilea
8. No. 8'303/14'065
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (ilegible)
- Sello de la Cancillería de Estado,
- Heidi Fischer
- Ciudad de Basilea

FEAUTUORA OFICIAL
N. 8177/00 DIRECCION
CEST
NITA ESCOBAR DE TAMAYO

232

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

4 792

2006 SEP 21 A 10:55

Anda Escobar
COPIA FIRMADA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPLEA
LAS FUENTES DE INFORMACION

JEFES DE LEGALIZACIONES
SECRETARÍA DE EUGOTIA D.C.

Traspaso

Yo/Nosotros, el suscrito(s)

Yvo Graus, científico, ciudadano holandés
Werdorperwaard 3, 3(illegible) PR, Odijk, Holanda

Jacques Himber, biólogo, ciudadano francés
1 Chemin du Petemit, F-68500 Guebwiller, Francia

Miranda Jansen-Molenaar, científica, ciudadana holandesa
Vechtensteinlaan 56, NL-3601 CL Maarssen, Holanda

Dorothee Kling, biólogo, ciudadano alemán
Kirchmaettle 22/1, D-79400 Kandern-Tannenkirch, Alemania

Erhard Kopetzki, bioquímico, ciudadano alemán
Kastnerhofstrasse 21, D-82377 Penzberg, Alemania

Paul Parren, científico, ciudadano holandés
Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk, Holanda

Frank Rebers, científico, ciudadano holandés
Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT Utrecht, Holanda

Beat Steiner, bioquímico, ciudadano suizo

18 Im Brunnacker, CH-4112 Baettwill, Suiza

Anne Stern, bióloga, ciudadana alemana
Saalangerstrasse 33, D-82377 Penzberg, Alemania

Pamela Streln, doctora en medicina, ciudadana alemana
Oetlingerstrasse 187, CH-4057 Basilea, Suiza

Kay-Gunnar Stubenrauch, químico, ciudadano alemán
An der Freiheit 105, D-82377 Penzberg, Alemania

Jan van de Winkel, científico, ciudadano holandés
Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist, Holanda

Martine van Vugt, científica, ciudadana holandesa
Fluweelmos 8, NL-3994 KR Houten, Holanda

CEDENTE(S), por el presente declaro que soy/somos el inventor(es)
único/conjunto de la invención llamada:

Anticuerpos anti-p-selectina

para la cual la primera solicitud(es) se registró así:

<u>País</u>	<u>Fecha de registro</u>	<u>No. Serial</u>
Europa	13.04.2004	04008722.3

232

y que por una causa contractual adecuada, el recibo y suficiencia de lo cual se reconoce por el presente, yo/nosotros hemos vendido, cedido y transferido todos los derechos y título a y de dicha invención y de dicha solicitud(es) en todos los países del mundo al CESIONARIO:

F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124,
CH-4070 Basel (Suiza)

La presente cesión es para, pero no se limita a, los siguientes países:

Argentina, Australia, Austria, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, Colombia, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Israel, Italia, Japón, Kazajistán, Corea, Luxemburgo, México, Mónaco, Holanda, Nueva Zelanda, Noruega, Pakistán, República Popular China, Filipinas, Polonia, Portugal, Rusia, Arabia Saudita, Sur Africa, España, Suecia, Suiza, Taiwán, Turquía, Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte, Ucrania, Uruguay, EE.UU., Venezuela.

En virtud de esta cesión dicho CESIONARIO tiene pleno poder para solicitar y obtener en su propio nombre o en cualquier otro nombre y para sus propios fines y cuenta PATENTE DE INVENCION en todo el mundo, especialmente en los países anteriormente nombrados, y a reivindicar el derecho de prioridad de la primera solicitud(es) presentada en el país (países) anteriormente nombrado de acuerdo con las convenciones internacionales.

Se requiere legalización

235

Firmado en Basilea, Suiza
el 25 de febrero de 2005

_____	Jacques Himber
_____	Dorothee Kling
_____	Beat Steiner
_____	Pamela Strein

Legalización

Por el presente certificamos que la firma de las personas anteriormente nombradas

Jacques Himber, biólogo
Dorothee Kling, biólogo
Beat Steiner, bioquímico
Pamela Strein, doctora en medicina

empleados de F. Hoffmann-La Roche AG, a quien/es conocemos personalmente, es auténtica.

Basilea, Suiza
No.

Firmado en
el

234

Erhard Kopetzki
Anne Stem
Kay-Gunnar Stubenrauch

Firmado en Utrecht
el 8 de marzo de 2005

(firma: ilegible)
(firma: ilegible)
(firma: ilegible)
(firma: ilegible)
(firma: ilegible)
(firma: ilegible)

Yvo Graus
Miranda Jansen-Molenaar
Paul Parnen
Frank Rebers
Jan van de Winkel
Martine van Vugt

237

235

Visto por mí, el señor Bart Herman Theodor Terhorst, Notario Público en Utrecht, Holanda, para la legalización de las firmas sobre el documento adjunto, de:

1. Señor Yvo M. F. Graus, nacido en Velsen, Holanda, el 1 de marzo de 1963, licencia de conducción número 3114127438; y
2. Señora Miranda Bernardina Johanna Jansen-Molenaar, nacida en Wisch, Holanda, el 2 de noviembre de 1970, licencia de conducción número 3158260424;
3. Señor Paul Willem Henri Ida Parren, nacido en Roermond, Holanda, el 30 de abril de 1963, pasaporte número NB 5216950;
4. Señor Frank E. M. Rebers, nacido en Sliedrecht, Holanda, el 15 de octubre de 1968, licencia de conducción número 3206168425;
5. Señor Johannes Gerardus Joseph van de Winkel, nacido en Venray, Holanda, el 1 de marzo de 1961, pasaporte número ND2487742; y
6. Señora Martine Jannigje van Vugt, nacida el Werkendam, Holanda, el 3 de marzo de 1970, pasaporte número M10760556.

Firmado en Utrecht, Holanda
el 8 de marzo de 2005

Sellos.

(firma: ilegible)

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 20 de septiembre de 2006, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
Res. 2177/89 MINISTERIO DE JUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

Colombia

Case 22354

Declaration

I, the undersigned Notary public of Basle/Switzerland, herewith declare that the copy entitled Assignment is a true copy of the original document which has been presented to me by

F. Hoffmann-La Roche AG

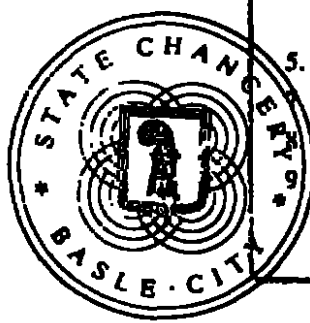
of Basle/Switzerland.

Basle/Switzerland this 11-09-2006 (eleventh day of September two thousand and six)

Dr. P. Kuster
Hele

Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel

~~Let. Prot. 2006 No. 388~~



APOSTILLE	
(Hague Convention of October 5th, 1961)	
1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)	
This official document	
2. is signed by <i>P. Kuster</i>	
3. in his/her function as <i>Notar</i>	
4. and certified by the seal of the <i>Basel</i>	
Certified 13. Sep. 2006	
5. In Basel (Basle)	6. on
by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt	
no. <i>F. 2011-1406</i>	
9. Seal / stamp:	10. Signature <i>Fischer</i>
	Heldi Fischer

Assignment

I/WE, the undersigned

Yvo Graus, scientist, a Dutch citizen
~~Pioniersstraat 44, NL-3720 XG Dordrecht, Netherlands~~

Werdorperwaard 3, 3904 PR Odijk,
 The Netherlands

Jacques Hirber, biologist, a French citizen
 1 Chemin du Peternit, F-68500 Guebwiller, France

Miranda Jansen-Molenaar, scientist, a Dutch citizen
 Vechtensteinlaan 56, NL-3601 CL Maarssen, Netherlands

Dorothee Kling, biologist, a German citizen
 Kirchmaettle 22/1, D-79400 Kandern-Tannenkirch, Germany

Erhard Kopetzki, biochemist, a German citizen
 Kastnerhofstrasse 21, D-82377 Penzberg, Germany

Paul Parren, scientist, a Dutch citizen
 Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk, Netherlands

Frank Rebers, scientist, a Dutch citizen
 Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT Utrecht, Netherlands

Beat Steiner, biochemist, a Swiss citizen
 18 Im Brunnacker, CH-4112 Baettwil, Switzerland

Anne Stern, biologist, a German citizen
 Seelangerstrasse 33, D-82377 Penzberg, Germany

Pamela Strein, medical doctor, a German citizen
 Oetlingerstrasse 187, CH-4057 Basel, Switzerland

Kay-Gunnar Stubenrauch, chemist, a German citizen
 An der Freiheit 105, D-82377 Penzberg, Germany

Jan van de Winkel, scientist, a Dutch citizen
 Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist, Netherlands

Martine van Vugt, scientist, a Dutch citizen
 Fluweelmos 6, NL-3994 KR Houten, Netherlands

ASSIGNOR(S), herewith declare that I am/we are the sole/joint inventor(s) of the invention entitled:

Anti-P-selectin antibodies

for which the first application(s) was (were) filed as follows:

Country	Filing date	Serial No.
Europe	13.04.2004	04008722.3

and that for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, I/WE have sold, assigned and transferred all rights and title to and from the said invention and from the said application(s) in all countries of the world to the ASSIGNEE:

F. Hoffmann-La Roche AG
 Grenzacherstrasse 124,
 CH-4070 Basel(Switzerland)

Legalization required

Signatures see reverse side

238

The present assignment is for, but is not limited to the following countries:

Argentina, Australia, Austria, Belgium, Brazil, Canada, Chile, Colombia, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Israel, Italy, Japan, Kazakhstan, Korea, Luxembourg, Mexico, Monaco, Netherlands, New Zealand, Norway, Pakistan, People's Republic of China, Philippines, Poland, Portugal, Russia, Saudi Arabia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, Turkey, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, Ukraine, Uruguay, U.S.A., Venezuela.

By virtue of this assignment the said ASSIGNEE is fully entitled to apply for and obtain in their own name or in any other name and for their own purposes and account LETTERS PATENT in the whole world, especially in the above-named countries, and to claim therefor the right of priority of the first filed application(s) in the above-named country (countries) in accordance with international conventions.

Signed at Basel, Switzerland

on February 25, 2005

Jacques Himber

Dorothee Kling

Beat Steiner

Pamela Strein

Legalization

We hereby certify that the signature of the above named

Jacques Himber, biologist
Dorothee Kling, biologist
Beat Steiner, biochemist
Pamela Strein, medical doctor

in the employ of F. Hoffmann-La Roche AG, who is/are personally known to us, is genuine.

Basle, Switzerland

No.

Signed at

on

Erhard Kopetzki

Anne Stern

Kay-Gunnar Stubenrauch

Signed at

on

Utrecht
March 6, 2005

Yvo Graus

Miranda Jansen-Molenaar

Paul Parren

Frank Rebers

Jan van de Winkel

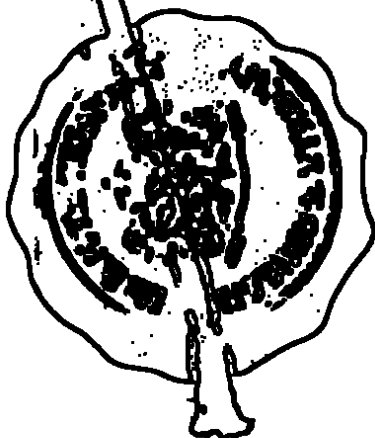
Martine van Vugt



Seen by me, Mr. Bart Herman Theodor Terhorst, Civil Law Notary in Utrecht, The Netherlands, for the legalization of the signatures on the attached document, of:

1. Mr. Ivo M. F. Graus, born in Velsen, The Netherlands, on March, 1, 1963, driving license number 3114127438; and
2. Ms. Miranda Bernardina Johanna Jansen-Molenaar, born in Wisch, The Netherlands, on November 2, 1970, driving license number 3158260424;
3. Mr. Paul Willem Henri Ida Parren, born in Roermond, The Netherlands, on April 30, 1963, passport number NB5216950.
4. Mr. Frank E. M. Rebers, born in Sliedrecht, The Netherlands, on October 15th, 1968, driving license number 3206168425;
5. Mr. Johannes Gerardus Joseph van de Winkel, born in Venray, The Netherlands, on March 1, 1961, passport number ND2487742; and
6. Ms. Martine Jannigje van Vugt, born in Werkendam, The Netherlands, on March 3, 1970, passport number M10760556.

Signed in Utrecht, The Netherlands
On March 8, 2005



TRADUCCION OFICIAL No. 2006-09-20-616
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Colombia

Caso 22354

Declaración

Yo, el suscrito Notario Público de Basilea/Suiza, por el presente declaro que la copia anexa llamada 'Cesión' es una copia fiel del documento original que me ha presentado

F. Hoffmann-La Roche AG

de Basilea/Suiza.

Basilea/Suiza, este día 11-09-2006 (día once de septiembre de dos mil seis)

Sello notarial.

Leg. Prot. 2006 No. 387

(firma: ilegible)

Notario Público

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por (ilegible)
3. actuando como (ilegible)
4. lleva el sello/estampilla de (ilegible)

CERTIFICADO

5. en Basilea
6. el 13 de septiembre de 2006
7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basilea
8. No. 8'302/14'066
9. Sello/Estampilla
Sello de la Cancillería de Estado,
Ciudad de Basilea
10. Firma: (ilegible)
Heidi Fischer

REGISTRO OFICIAL
SECRETARÍA DE JUSTICIA
SECRETARÍA DE JUSTICIA

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

47924:
Arto Escobar
COTA FOLIO APARECE EN EL
DOCUMENTO MESAPEWA
LAS FUNCIONES INTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 SEP 21 A 10:54

Uru
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BUENOS AIRES

Traspaso

Yo/Nosotros, el suscrito(s)

Yvo Graus, científico, ciudadano holandés
Plenemanstraat 112, NL-6717 WG Ede, Holanda

Jacques Himber, biólogo, ciudadano francés
1 Chemin du Petemit, F-68500 Guebwiller, Francia

Miranda Jansen-Molenaar, científica, ciudadana holandesa
Vechtensteinlaan 56, NL-3601 CL Maarssen, Holanda

Dorothee Kling, biólogo, ciudadano alemán
Kirchmaettle 22/1, D-79400 Kandern-Tannenkirch, Alemania

Erhard Kopetzki, bioquímico, ciudadano alemán
Kastnerhofstrasse 21, D-82377 Penzberg, Alemania

Paul Parren, científico, ciudadano holandés
Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk, Holanda

Frank Rebers, científico, ciudadano holandés
Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT Utrecht, Holanda

Beat Stelner, bioquímico, ciudadano suizo

18 Im Brunnacker, CH-4112 Baettwil, Suiza

Anne Stern, bióloga, ciudadana alemana
Saalangerstrasse 33, D-82377 Penzberg, Alemania

Pamela Strein, doctora en medicina, ciudadana alemana
Oetlingerstrasse 187, CH-4057 Basilea, Suiza

Kay-Gunnar Stubenrauch, químico, ciudadano alemán
An der Freiheit 105, D-82377 Penzberg, Alemania

Jan van de Winkel, científico, ciudadano holandés
Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist, Holanda

Martine van Vugt, científica, ciudadana holandesa
Fluweelmos 6, NL-3994 KR Houten, Holanda

CEDENTE(S), por el presente declaro que soy/somos el inventor(es)
único/conjunto de la invención llamada:

Anticuerpos anti-p-selectina

para la cual la primera solicitud(es) se registró así:

<u>País</u>	<u>Fecha de registro</u>	<u>No. Serial</u>
Europa	13.04.2004	04008722.3

y que por una causa contractual adecuada, el recibo y suficiencia de lo cual se reconoce por el presente, yo/nosotros hemos vendido, cedido y transferido todos los derechos y título a y de dicha invención y de dicha solicitud(es) en todos los países del mundo al CESIONARIO:

F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124,
CH-4070 Basel (Suiza)

La presente cesión es para, pero no se limita a, los siguientes países:

Argentina, Australia, Austria, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, Colombia, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Israel, Italia, Japón, Kazajistán, Corea, Luxemburgo, México, Mónaco, Holanda, Nueva Zelanda, Noruega, Pakistán, República Popular China, Filipinas, Polonia, Portugal, Rusia, Arabia Saudita, Sur Africa, España, Suecia, Suiza, Taiwán, Turquía, Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte, Ucrania, Uruguay, EE.UU., Venezuela.

En virtud de esta cesión dicho CESIONARIO tiene pleno poder para solicitar y obtener en su propio nombre o en cualquier otro nombre y para sus propios fines y cuenta PATENTE DE INVENCION en todo el mundo, especialmente en los países anteriormente nombrados, y a reivindicar el derecho de prioridad de la primera solicitud(es) presentada en el país (países) anteriormente nombrado de acuerdo con las convenciones internacionales.

Se requiere legalización

245

Firmado en Basilea, Suiza
el 25 de febrero de 2005

_____	Jacques Himber
_____	Dorothee Kling
_____	Beat Steiner
_____	Pamela Strein

Legalización

Por el presente certificamos que la firma de las personas anteriormente nombradas

Jacques Himber, biólogo
Dorothee Kling, biólogo
Beat Steiner, bioquímico
Pamela Strein, doctora en medicina

empleados de F. Hoffmann-La Roche AG, a quien/es conocemos personalmente, es auténtica.

Basilea, Suiza
No.

Firmado en Penzberg
el 15.03.2005, 22.03.2005 y 31.03.2005

246

(firma: ilegible)
(firma: ilegible)
(firma: ilegible)

Erhard Kopetzki
Anne Stern
Kay-Gunnar Stubenrauch

Firmado en
el

Yvo Graus
Miranda Jansen-Molenaar
Paul Parren
Frank Rebers
Jan van de Winkel
Martine van Vugt

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 20 de septiembre de 2006, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
MINISTERIO DE JUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
BOGOTÁ, D.C. 2006

Colombia

Case 22354

Declaration

I, the undersigned Notary public of Basle/Switzerland, herewith declare that the copy entitled Assignment is a true copy of the original document which has been presented to me by

F. Hoffmann-La Roche AG

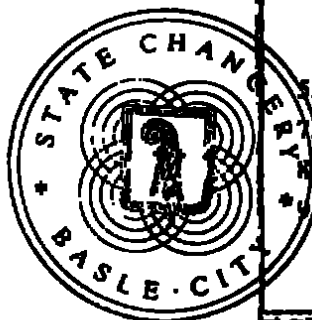
Basel/Switzer

Date 11-09-2006 (eleventh day of September two thousand and six)

Dr. P. Kuster
Notar

Dr. Peter Kuster
 Advokat und Notar
 Peterskirchplatz 12
 Postfach
 CH-4001 Basel

Lot No. 387



APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz/Suisse)

This official document

2. is signed by

3. in his/her function as

4. and certified by the seal of the

Certified

13 Sep. 2006

5. in Basel (Bâle)

6. on

7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8. no.

P 5021/14 066

9. Seal/stamp:

10. Signature:

Heidi Fischer

Assignment

I/WE, the undersigned

Yvo Graus, scientist, a Dutch citizen
Pienemanstraat 112, NL-6717 WG Ede, Netherlands

Jacques Himber, biologist, a French citizen
1 Chemin du Peternit, F-68500 Guebwiller, France

Miranda Jansen-Molenaar, scientist, a Dutch citizen
Vechtensteinlaan 56, NL-3601 CL Maarssen, Netherlands

Dorothee Kling, biologist, a German citizen
Kirchmaetle 22/1, D-79400 Kandern-Tannenkirch, Germany

Erhard Kopetzki, biochemist, a German citizen
Kastnerhofstrasse 21, D-82377 Penzberg, Germany

Paul Parren, scientist, a Dutch citizen
Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk, Netherlands

Frank Rebers, scientist, a Dutch citizen
Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT Utrecht, Netherlands

Beat Steiner, biochemist, a Swiss citizen
18 Im Brunnacker, CH-4112 Baettwil, Switzerland

Anne Stern, biologist, a German citizen
Saalangerstrasse 33, D-82377 Penzberg, Germany

Pamela Strein, medical doctor, a German citizen
Oetfingerstrasse 187, CH-4057 Basel, Switzerland

Kay-Gunnar Stubenranch, chemist, a German citizen
An der Freiheit 105, D-82377 Penzberg, Germany

Jan van de Winkel, scientist, a Dutch citizen
Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist, Netherlands

Martine van Vugt, scientist, a Dutch citizen
Fluweelmos 6, NL-3994 KR Houten, Netherlands

ASSIGNOR(S), herewith declare that I am/we are the sole/joint inventor(s) of the invention entitled:

Anti-P-selectin antibodies

for which the first application(s) was (were) filed as follows:

Country	Filing date	Serial No.
Europe	13.04.2004	04008722.3

and that for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, I/WE have sold, assigned and transferred all rights and title to and from the said invention and from the said application(s) in all countries of the world to the ASSIGNEE:

F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124,
CH-4070 Basel(Switzerland)

. Legalization required

Signatures see reverse side

The present assignment is for, but is not limited to the following countries:

Argentina, Australia, Austria, Belgium, Brazil, Canada, Chile, Colombia, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Israel, Italy, Japan, Kazakhstan, Korea, Luxembourg, Mexico, Monaco, Netherlands, New Zealand, Norway, Pakistan, People's Republic of China, Philippines, Poland, Portugal, Russia, Saudi Arabia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, Turkey, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, Ukraine, Uruguay, U.S.A., Venezuela.

By virtue of this assignment the said ASSIGNEE is fully entitled to apply for and obtain in their own name or in any other name and for their own purposes and account LETTERS PATENT in the whole world, especially in the above-named countries, and to claim therefor the right of priority of the first filed application(s) in the above-named country (countries) in accordance with international conventions.

Signed at Basel, Switzerland

on February 25, 2005

_____	Jacques Himber
_____	Dorothee Kling
_____	Beat Steiner
_____	Pamela Strein

Legalization

We hereby certify that the signature of the above named

Jacques Himber, biologist
Dorothee Kling, biologist
Beat Steiner, biochemist
Pamela Strein, medical doctor

in the employ of F. Hoffmann-La Roche AG, who is/are personally known to us, is genuine.

Basel, Switzerland

No.

Signed at Penzberg

on 15.03.2005, 22.03.2005 and 31.03.2005

<u>Erhard Kopetzki</u>	Erhard Kopetzki
<u>Anne Stern</u>	Anne Stern
<u>Kay-Gunnar Stubenrauch</u>	Kay-Gunnar Stubenrauch

Signed at

on

_____	Yvo Graus
_____	Miranda Jansen-Molenaar
_____	Paul Parren
_____	Frank Rebers
_____	Jan van de Winkel
_____	Martine van Vugt

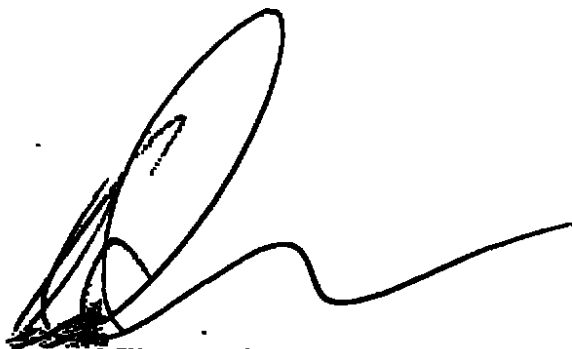
URNr. K 502 / 2005

vom 15. März 2005 / be

Ich beglaubige die vorstehende, vor mir vollzogene Unterschrift von

Herrn Erhard Kopetzki, geboren am 25. Oktober 1954, Biochemiker,
Kastnerhofstr. 21, 82377 Penzberg, nach Angabe in Gütergemeinschaft verheiratet,
ausgewiesen durch amtlichen Lichtbildausweis.

Penzberg, 15. März 2005

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized loop followed by a long, horizontal, wavy line extending to the right.

Nikolaus Klöcker,
Notar in Weilheim i. OB.

URN: D 407 / 2005

vom 22. März 2005 / li

Ich beglaubige die vorstehende, vor mir vollzogene Unterschrift von

Frau Anna Stern, geboren am 5. Februar 1957, Biologin, Saalangerstraße 33 ,
82377 Penzberg, ausgewiesen durch amtlichen Lichtbildausweis.

Penzberg, 22. März 2005



Dr. Wolfgang Drasch LL.M.,
Notar in Weilheim i. OB.

252

URNr. D 497 / 2005

vom 31. März 2005 / H

Ich beglaubige die vorstehende, vor mir vollzogene Unterschrift von

Herrn Kay-Gunnar Stubenrauch, geboren am 21. August 1971, Biochemiker,

An der Freiheit 105, 82377 Penzberg, ausgewiesen durch amtlichen Lichtbildausweis.

Penzberg, 31. März 2005



Dr. Wolfgang Drasch LL.M.,
Notar in Weilheim i. OB.

255

253

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION [X]

MODELO DE UTILIDAD []

- ♦ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X] 1
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X] 1
- ♦ Descripción de la invención [X] 77
- ♦ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas [X] 2

COMPLETA [X]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ♦ Indicación de que se solicita el registro de 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 []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ♦ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ♦ Representación gráfica del esquema trazado []
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha 27 SET 2008

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

254

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 257

2020
Bogotá D.C.,

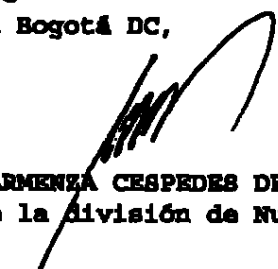
Dóctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
F HOFFMANN LA ROCHE AG

REFERENCIA	Radicación No.	6 97496
	Solicitud internacional	EP2005/003581
	Fecha inicio fase nacional	13/11/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	2104
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

05 DIC. 2006


ALIX CARMONA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

aalvarado