

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

ABOGADOS

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COME
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____



No. 06-097496- 00005-0000

Fecha: 2012-02-24 15:57:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 523 RESPUESTA Folios: 10

Re: PI.-F.HOFFMANN-LA ROCHE AG.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "ANTICUERPOS ANTI-P-SELECTINA".-Clase C07K 16/28.-Expediente número 06-097.496.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 15 de Diciembre de 2011.
2. Con el fin de responder a las objeciones expuestas por el Señor Examinador en su Concepto Técnico oficio Número 19436 bajo los acápites de Claridad, Reivindicaciones relativas a un Uso y Nivel Inventivo, atentamente me permito presentar los siguientes argumentos técnicos, así como las siguientes modificaciones en la solicitud de patente en cuestión, por medio de lo cual se superan completamente dichas objeciones.

3. MODIFICACIONES EN EL CAPÍTULO REIVINDICATORIO

Inicialmente me permito señalar que el solicitante de la invención en cuestión ha decidido realizar las siguientes modificaciones en el capítulo reivindicatorio:

- (a) En la reivindicación 1 se ha eliminado la posibilidad de que el anticuerpo reivindicado sea 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. Así mismo, se ha eliminado el término '*independientemente*'.
- (b) La reivindicación 2 ha sido eliminada, pero la frase '*el anticuerpo anti-P-selectina caracterizado porque el anticuerpo inhibe la adhesión de células HL60 tipo leucocito a P-selectina purificada con un valor de IC50 de 0,08 a 0,5 µg/ml*' ha sido trasladada a la reivindicación 1.
- (c) Se ha adicionado una nueva reivindicación, la cual fue enumerada como reivindicación 4 y está dirigida a proteger un anticuerpo de conformidad con lo establecido en la reivindicación 1 pero en donde se han definido las secuencias para los dominios variable y constante de cadena ligera y pesada de un anticuerpo específico.

Dicha nueva reivindicación encuentra pleno sustento en, por ejemplo, las reivindicaciones 3 y 4 actualmente presentadas.

- (d) Las reivindicaciones 5 a 12 actualmente presentadas han sido eliminadas, razón por la cual el nuevo capítulo reivindicatorio de la solicitud comprende 4 reivindicaciones.

Por último y de conformidad con lo mencionado previamente, me permito manifestar que las modificaciones realizadas en el capítulo reivindicatorio de la invención no amplían de manera alguna el alcance de la solicitud presentada originalmente, cumpliendo por lo tanto a cabalidad con las disposiciones de patentabilidad establecidas en el Artículo 34 de la Decisión 486 de 2000.

4. **CLARIDAD DEL CAPÍTULO REIVINDICATORIO**

Ahora bien, el señor Examinador ha objetado la claridad de la solicitud de patente en cuestión con base en los siguientes argumentos:

- ***"La reivindicación principal define un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina caracterizado porque no se fija C1q, porque la parte Fc es derivada de humano, por las mutaciones que presenta en algunos aminoácidos y las secuencias alternativas que pueden tener la cadena ligera y pesada del anticuerpo. A partir de la descripción es evidente que las únicas variantes del anticuerpo que cumplen con las características de no unirse a C1q son las variantes de HuMab 002 denominadas IgG4v1 (SEQ N° 28), IgG1v1 (SEQ N° 25), IgGv2 (SEQ N° 26) (ver Tabla 1, Folio 155 y Folio 173). Adicionalmente, a partir del reporte experimental anexo a la solicitud (Folios 273-276) también se encuentra sustento para el anticuerpo IgG4v1. De esta manera, la caracterización del anticuerpo tal como está en la reivindicación actual carece de sustento para las otras secuencias mencionadas"***

Atendiendo a lo anterior y de conformidad con lo mencionado previamente en el numeral 3 del presente escrito, me permito señalar que el solicitante ha decidido restringir el alcance de la reivindicación 1 a un anticuerpo que es del subgrupo humano IgG4 en el que S228 se reemplaza por P y L235 se reemplaza por E, eliminando por lo tanto la posibilidad de que el anticuerpo reivindicado sea del subgrupo humano IgG1 que contiene por lo menos una mutación en L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y/o P329, con lo cual se supera completamente la objeción realizada por el señor Examinador a éste respecto.

- ***"Adicionalmente, en la reivindicación 1 la indicación de que la región ligera y pesada variables puede ser "independientemente seleccionada del grupo" no es clara, puesto que cada uno de los literales a)-k) definen las secuencias para ambos, el dominio variable de la cadena ligera y pesada"***

Atendiendo a lo anterior y de conformidad con lo mencionado previamente en el numeral 3 del presente escrito, me permito señalar que el solicitante ha decidido eliminar de la reivindicación 1 el término '*independientemente*', con lo cual se supera completamente la objeción realizada por el señor Examinador a éste respecto.

- ***"La molécula de ácido nucleico reclamada en la reivindicación 6 debe ser caracterizada a partir de la secuencia nucleótida completa del anticuerpo desarrollado, lo anterior para que se considere este ácido nucleico como un producto de la invención"***

En respuesta a lo anterior me permito señalar que el solicitante ha decidido eliminar la reivindicación 6 actualmente presentada, con lo cual se supera completamente la objeción realizada por el señor Examinador a éste respecto.

- ***"La célula hospedante que contiene el anticuerpo debe definirse como una línea celular tipo XXX, e indicar su número de depósito. Lo anterior, para delimitar la invención y diferenciarla de una célula natural que produce el anticuerpo o de un animal transgénico que lo produce"***

En respuesta a lo anterior me permito señalar que el solicitante ha decidido eliminar la reivindicación 8 actualmente presentada, con lo cual se supera completamente la objeción realizada por el señor Examinador a éste respecto.

- ***"La composición definida en la reivindicación 10 únicamente contiene el anticuerpo. Sin embargo, para que sea considerada una composición debe indicarse los portadores y excipientes que contiene y preferentemente las proporciones de los mismos. Esto último también aplica para la reivindicación 12"***

En respuesta a lo anterior me permito señalar que el solicitante ha decidido eliminar las reivindicaciones 10 y 12 actualmente presentadas, con lo cual se supera completamente la objeción realizada por el señor Examinador a éste respecto.

- ***"Las composiciones definidas en la reivindicación 11 son caracterizadas por el uso que se les va a dar. Para que se consideren materia patentable se deben caracterizar a partir de los diferentes elementos que contienen"***

En respuesta a lo anterior me permito señalar que el solicitante ha decidido eliminar la reivindicación 11 actualmente presentada, con lo cual se supera completamente la objeción realizada por el señor Examinador a éste respecto.

Finalmente, con base en todo lo anteriormente planteado me permito manifestar que el nuevo capítulo de la solicitud en cuestión cumple a cabalidad con las disposiciones de patentabilidad establecidas en el artículo 30 de la Decisión 486 de 2000, toda vez que es claro, conciso y encuentra pleno sustento en la descripción de la solicitud.

5. REIVINDICACIONES RELATIVAS A UN USO

Así mismo, el señor Examinador ha reiterado sus objeciones con respecto a la reivindicación 11 actualmente presentada aduciendo lo siguiente:

"La materia de la reivindicación 11 reclama el uso de las composiciones que contienen el anticuerpo definido en las cláusulas precedentes; según la norma comunitaria los usos no son materia susceptible de patente. De esta manera y de acuerdo a lo establecido en los artículos 14 y 21 de la Decisión 486 la materia de la reivindicación 11, tal como está redactada, no sería patentable"

En respuesta a lo anterior y de conformidad con lo mencionado previamente en el presente escrito, me permito reiterar que la reivindicación 11 actualmente presentada ha sido eliminada, con lo cual se supera completamente la objeción realizada por el señor Examinador a éste respecto.

6. NIVEL INVENTIVO

Finalmente, el señor Examinador ha objetado el nivel inventivo de la solicitud con base en las enseñanzas de los siguientes documentos:

(D1) → WO 94/025067

(D2) → Idusogie E. et al.; Mapping of the C1q Binding Site on Rituxan, a chimeric Antibody with a human IgG1 Fc; *Journal Immunol*; 2000; vol. 164: 4178-4184

En este sentido, el señor Examinador argumenta básicamente que el documento más cercano del estado de la técnica es D1 debido a que dicha anterioridad divulga anticuerpos anti-P-selectina humanizados y menciona que tales anticuerpos permiten tratar enfermedades inflamatorias y trombóticas. De acuerdo con el señor Examinador, la diferencia entre D1 y la solicitud en cuestión es que el anticuerpo de la solicitud tiene la característica que no se fija sobre el factor de complemento C1q. Sin embargo, el señor Examinador afirma que la modificación necesaria para lograr que no haya unión al factor del complemento C1q había sido reportada previamente en el documento D2, toda vez que allí se divulga el sitio de unión de C1q tomando como ejemplo el anticuerpo quimérico Rituximab con un dominio constante IgG1 humano.

Con base en lo anterior, el señor Examinador concluye que es evidente que a partir del documento D1 se habría obtenido la formulación y el anticuerpo anti-P-selectina, mientras que con la modificación en la región de unión al complemento divulgada en D2 se habría podido obtener el anticuerpo tal como es desarrollado en la solicitud en estudio, careciendo por lo tanto de nivel inventivo.

Visto lo anterior y con el ánimo de demostrar ante ese Despacho que el nuevo capítulo reivindicatorio de la solicitud de patente presenta un inequívoco carácter inventivo frente a la combinación de las enseñanzas de los documentos D1 y D2, atentamente me permito presentar las siguientes consideraciones técnicas:

- **Con respecto al problema técnico planteado y al efecto sorprendente de los anticuerpos anti-P-selectina revelados en la presente invención:**

Inicialmente considero de gran importancia aclarar ante ese Despacho que el problema técnico abordado y resuelto por los inventores de la solicitud de patente en cuestión de ninguna manera puede definirse simplemente como el desarrollo de anticuerpos que enlazan a P-selectina pero que no enlazan al factor de complemento C1q, toda vez que de conformidad con lo mencionado en la descripción de la solicitud, el problema técnico resuelto consiste en la obtención de anticuerpos anti-P-selectina con propiedades mejoradas para el tratamiento de pacientes que padecen de trastornos inflamatorios y trombóticos, siendo la inhibición potente de la adhesión de células HL60 tipo leucocito a P-selectina purificada un indicador de la obtención de anticuerpos con tales propiedades mejoradas, tal y como se evidencia a partir del reporte experimental allegado a ese Despacho junto con mi memorial de 8 de Agosto de 2011 (copia del cual se adjunta nuevamente al presente escrito como Anexo b).

En efecto y tal como se describe en detalle en dicho reporte experimental, el solicitante de la invención en cuestión llevó a cabo una serie de experimentos comparativos tendientes a demostrar que el anticuerpo anti-P-selectina IgG4v1 de la presente invención *(el cual es representativo del anticuerpo HuMab 002 que presenta un dominio variable de cadena ligera definido mediante la secuencia de*

amino ácidos SEQ ID NO:3, y un dominio variable de cadena pesada definido mediante la secuencia de amino ácidos SEQ ID NO:4) inhibe la adhesión de células tipo leucocito a P-selectina con mucho mayor potencia que la mostrada por el anticuerpo PB1.3 (el cual es divulgado como se discutirá más adelante en el documento D1).

Así, por ejemplo, a partir de los datos divulgados en el reporte experimental previamente mencionado es claro que el solicitante obtuvo valores de IC₅₀ para la inhibición del enlace de células HL60 a P-selectina significativamente menores con el anticuerpo IgG4v1 de la presente invención en comparación con los valores logrados empleando el anticuerpo PB1.3, lo anterior a pesar de que dichos anticuerpos presentan una afinidad de enlace similar de acuerdo con los experimentos BIAcore llevados a cabo. Incluso, en uno de los experimentos llevados a cabo se encontró que el anticuerpo anti-P-selectina IgG4V1 es cerca de 2000 veces más potente que el anticuerpo PB1.3, hecho que demuestra de manera contundente que los anticuerpos revelados en la solicitud de patente en cuestión representan un importante avance en el estado de la técnica en cuestión.

- **Con respecto a la combinación de los documentos D1 y D2 como mecanismo para obtener los anticuerpos-anti-P-selectina revelados en la presente invención:**

Ahora bien, de conformidad con lo anterior me permito señalar que los resultados experimentales de acuerdo con los cuales el anticuerpo IgG4v1 (presente invención) permite lograr un mejor bloqueo de la actividad biológica de P-selectina con relación al bloqueo logrado mediante el anticuerpo PB1.3 (documento D1), pueden explicarse al tener en cuenta las diferencias existentes entre el anticuerpo de la presente invención (IgG4v1) y el anticuerpo divulgado en el documento D1 (PB1.3), especialmente aquella referente al hecho de que dichos anticuerpos enlazan a un epítipo diferente de P-selectina.

En efecto, de acuerdo con lo mencionado en la página 31 de la descripción de la solicitud de patente en cuestión (líneas 19 a 25):

"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 (accesión) ATCC HB11041 sobre la P-selectina."

(En este punto resulta de gran importancia resaltar que el documento D1 divulga determinados anticuerpos monoclonales anti-P-selectina humanizados que se caracterizan porque se fijan a P-selectina y porque resultan ser útiles en el tratamiento de la inflamación debido a que inhiben la adhesión de leucocitos a

plaquetas activas y/o a endotelio vascular activo. Uno de dichos anticuerpos divulgados en D1 es el anticuerpo de murino PB1.3, el cual es producido mediante una línea celular con número de acceso ATCC HB11041)

Lo anterior evidencia que el anticuerpo revelado en la presente invención se caracteriza de manera sorpresiva por tener la capacidad de enlazarse a un epítipo de P-selectina que es diferente a aquellos epítopos a los cuales se enlazan los anticuerpos anti-P-selectina conocidos en el arte previo, con lo cual se logra un aumento significativo en la potencia de bloqueo de la actividad biológica de P-selectina, y lo que indiscutiblemente representa una clara ventaja técnica y corresponde a un importante aporte al estado del arte.

Por último, atentamente me permito destacar que si bien a lo largo de la solicitud de patente en cuestión no se describe a qué epítipo de P-selectina enlaza el anticuerpo revelado en la presente invención, es claro que tales diferencias de enlace representan una explicación coherente para el aumento significativo en el bloqueo de la función biológica de la P-selectina mediante el anticuerpo de la presente invención frente al anticuerpo PB1.3 divulgado previamente en el documento D1.

De otro lado, con respecto a las enseñanzas del documento D2 me permito manifestar que dicha anterioridad simplemente describe el mapeo de los sitios de unión de C1q sobre Rituxan, el cual es un anticuerpo quimérico con un IgG1 Fc humano. En este sentido, en D2 se divulga que las mutaciones en las posiciones D270, K322, P329 y P331 reducen la capacidad del rituximab para enlazar a C1q.

Sin embargo, es evidente que el objetivo técnico de la solicitud de patente en cuestión (desarrollo de un anticuerpo caracterizado por poseer una mayor potencia inhibitoria de P-selectina con propiedades mejoradas para el tratamiento de pacientes que padecen de trastornos inflamatorios y trombóticos) es completamente diferente al propósito descrito por los autores del documento D2 (reducción de la capacidad de enlace al factor de complemento C1q).

En consecuencia, el hecho de que en el documento D2 se divulguen las mismas modificaciones Fc que han sido realizadas sobre los anticuerpos reivindicados en la presente invención para reducir la citotoxicidad, de ninguna manera constituye una razón técnica válida para desvirtuar el nivel inventivo de los anticuerpos revelados por el solicitante, toda vez que dichas modificaciones de ninguna manera son relevantes en el bloqueo de la adhesión de células tipo leucocito a P-selectina, esto es, la mejorada potencia inhibitoria de P-selectina mostrada por dichos novedosos anticuerpos de ninguna manera habría podido ser sugerida por la persona medianamente versada en la materia a partir de la combinación de las enseñanzas de los documentos D1 y D2 señalados por ese Despacho.

Así las cosas, es claro que los anticuerpos revelados en el nuevo capítulo reivindicatorio de la solicitud de patente en cuestión, los cuales se caracterizan porque inhiben la adhesión de células HL60 tipo leucocito a P-selectina purificada con un valor IC50 de entre 0,08 y 0,5 µg/ml de ninguna manera habrían podido ser sugeridos de manera evidente por la persona medianamente versada en la materia a partir de las enseñanzas del arte previo.

Visto lo anterior, me permito manifestar ante ese Despacho que la solicitud de patente en cuestión presenta un inequívoco carácter inventivo frente a las enseñanzas de los documentos D1, D2 ó la combinación de los mismos, cumpliendo por lo tanto a cabalidad con las disposiciones de patentabilidad establecidas en el Artículo 18 de la Decisión 486 de 2000.

7. **CONCLUSIÓN**

De conformidad con los argumentos técnicos expuestos y con las modificaciones realizadas en el capítulo reivindicatorio de la solicitud de patente en cuestión, es claro que dicho documento cumple a cabalidad con las disposiciones de patentabilidad establecidas en el artículo 30 de la Decisión 486 de 2000, toda vez que es claro, conciso y presenta pleno sustento en la descripción de la solicitud.

Así mismo, en el presente memorial se han planteado una serie de argumentos técnicos que demuestran que la presente solicitud de patente está dirigida a proteger anticuerpos anti-P-selectina cuyas características técnicas son inventivas frente a la combinación de las enseñanzas de los documentos D1 y D2, toda vez que tales anterioridades no enseñan y tampoco sugieren que dichos novedosos anticuerpos presenten una mayor potencia inhibitoria de P-selectina con respecto a los anticuerpos conocidos en el estado de la técnica anterior.

Por lo tanto, teniendo en cuenta los argumentos técnicos presentados para demostrar el inequívoco carácter inventivo de la invención en cuestión, resulta completamente claro que se han superado las objeciones expuestas por el señor Examinador en su Concepto Técnico, y por lo tanto, dicha invención es merecedora del privilegio de patente solicitado.

8. Anexo al presente memorial me permito presentar:

(a) Copia del nuevo capítulo reivindicatorio, el cual está compuesto por cuatro (4) reivindicaciones y reemplaza al documento presentado actualmente; y,

(b) Traducción al español del reporte experimental realizado por el solicitante en relación con las pruebas llevadas a cabo para demostrar la mayor potencia inhibitoria de P-selectina mostrada por el anticuerpo IgG4v1 con respecto al anticuerpo PB1.3.

JOSÉ LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y argumentaciones presentadas y conceder el privilegio de patente solicitado.



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T. P. 53.215

NOTARIA 41 DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.
DEPARTAMENTO DE CUNTIMAMARCA
REPÚBLICA DE COLOMBIA

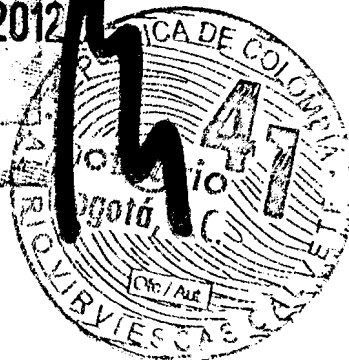
El Notario 41 del círculo de Bogotá, da fe de que compareció personalmente Alicia Lloreda Ricaurte identificada (a) con: CE 39.690.713 y tarjeta profesional de abogado No. 53215 del Consejo Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella (el) mismo en este escrito.

(Art. 84 C. P. Decreto. 2282/81 Mod. 3)


ALICIA LLOREDA RICAURTE

14 FEB. 2012

C.C. No. 39.690.713 de Usaquén




Jenny Nardy
Morales Beltrán
C.C. 1.015.593.013

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento C1q y tampoco a receptores FCγ, que contiene una parte Fc derivada de un origen humano y está caracterizado porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG4 en el que S228 se reemplaza por P y L235 se reemplaza por E, y porque comprende una región ligera y pesada variables seleccionadas del grupo que consiste de:

- a) el dominio variable de cadena pesada definido mediante la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y el dominio variable de cadena ligera definido mediante SEQ ID NO:1;
- b) el dominio variable de cadena pesada definido mediante la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4 y el dominio variable de cadena ligera definido mediante SEQ ID NO:3;
- c) el dominio variable de cadena pesada definido mediante la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6 y el dominio variable de cadena ligera definido mediante SEQ ID NO:5;
- d) el dominio variable de cadena pesada definido mediante la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8 y el dominio variable de cadena ligera definido mediante SEQ ID NO:7;
- e) el dominio variable de cadena pesada definido mediante la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10 y el dominio variable de cadena ligera definido mediante SEQ ID NO:9;
- f) el dominio variable de cadena pesada definido mediante la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:12 y el dominio variable de cadena ligera definido mediante SEQ ID NO:11;
- g) el dominio variable de cadena pesada definido mediante la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:14 y el dominio

variable de cadena ligera definido mediante SEQ ID NO:13;

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

donde dicho anticuerpo está caracterizado adicionalmente porque inhibe la adhesión de células HL60 tipo leucocito a P-selectina purificada con un valor de IC50 de 0,08 a 0,5 µg/ml.

2. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, el cual comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de cadena ligera que está definido mediante la secuencia de amino ácidos SEQ ID NO:3, y las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de cadena pesada que está definido mediante la SEQ ID NO: 4.

3. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde la región constante de cadena pesada humana comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO:28 y la región constante de cadena k-ligera es como está definida en SEQ ID NO:23.

4. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el dominio variable de cadena pesada está definido mediante la secuencia de amino ácidos SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de cadena ligera está definido mediante SEQ ID NO: 3, la región constante de cadena pesada humana está definida mediante la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO:28 y la región constante de cadena k-ligera es como está definida en SEQ ID NO:23.

Anexo B

b)

REPORTE EXPERIMENTAL**Experimentos de adhesión con los anticuerpos anti-P-selectina IgG4v1 y PB1.3 (D1)****Aspectos básicos del ensayo de adhesión:**

El ensayo analiza la adhesión de células HL60 tipo leucocitos a P-selectina inmovilizada sobre platos de microtitulación en la presencia o ausencia de un anticuerpo anti-P-selectina.

Método:

Los detalles del método se describen en la presente solicitud de patente, es decir, en el documento WO 2005/100402 sección [00174]. En resumen, se colocó P-selectina purificada sobre platos de microtitulación. Después de un paso de bloqueo los pozos fueron pre-incubados con diluciones incrementadas de los anticuerpos anti P-selectina IgG4v1 o PB1.3 (un anticuerpo monoclonal de ratón reivindicado en la patente CYTEL/AERES WO 94/25067 (D1), producidas mediante una línea celular que tiene el número de acceso ATCC HB11041). Se adicionaron células HL60, las cuales fueron marcadas con una tinta fluorescente y se permitió que se unieran a P-selectina durante 45 minutos. Luego de remover las células HL60 no enlazadas mediante lavado abundante, las células adherentes fueron lisadas. Los sobrenadantes fueron transferidos a platos para medir la fluorescencia respectiva.

Se desarrollaron tres experimentos en los cuales se evaluó el efecto inhibitorio de IgG4v1 y PB1.3 sobre la adhesión de células HL60 mediante una comparación cabeza a cabeza.

Resultados:

El promedio de los valores IC50 de IgG4v1 para la inhibición de la adhesión de células HL60 a P-selectina fue de 0,17 µg/mL (Tabla 1). El efecto inhibitorio de PB1.3 sobre la adhesión de células HL60 fue claramente mucho menor en comparación a IgG4v1. En los dos primeros experimentos (03-12-02, 04-01-28) PB1.3 inhibió hasta un 20 % de la adhesión de células HL60 a una concentración de 10 µg/mL, mientras que IgG4v1 inhibió el 100% de la adhesión de células HL60 a la misma concentración (Figuras 1 y 2). En esos dos experimentos, los valores IC50 de PB1.3 únicamente pueden ser estimados a estar por encima de las concentraciones máximas probadas, las cuales fueron 10 y 30 µg/mL, respectivamente. En el tercer experimento (04-02-12), en el cual PB1.3 se probó a concentraciones por encima de 100 µg/mL, el valor IC50 de PB1.3 fue de 411,03 µg/mL, mientras que el valor IC50 de IgG4v1 fue de 0,15 µg/mL (Tabla 1, figura 3). El último experimento demuestra que IgG4v1 es cerca de 2700 veces más potente que PB1.3 cuando se comparan los valores IC50 para la inhibición de la adhesión de células HL60.

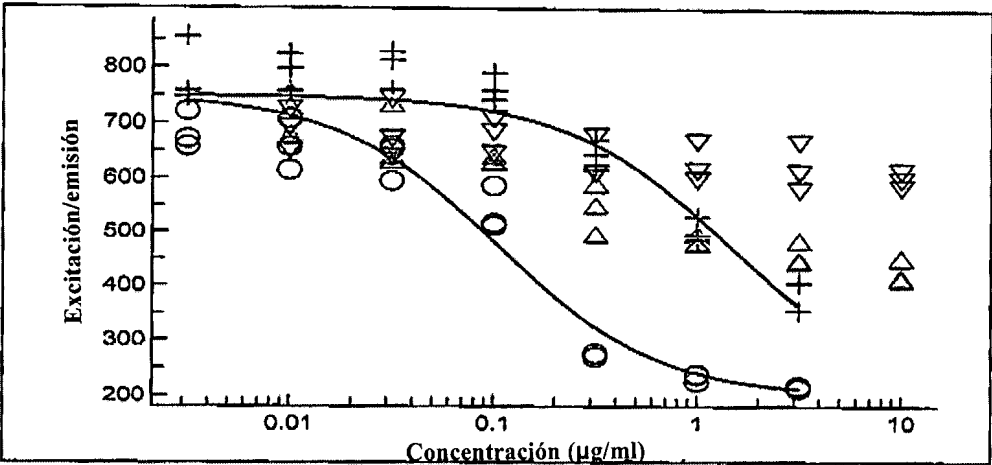
Tabla 1. Efecto inhibitorio de IgG4v1 y PB1.3 sobre la adhesión de células HL60 a P-selectina (Resumen de los tres experimentos)

Fecha del experimento	Valores IC50 de IgG4v1 µg/mL	Valores IC50 de PB1.3 µg/mL
02.12.2003	0,11	>10*
28.01.2004	0,25	>30**
12.02.2004	0,15	411,03
Promedio	0,17	

* La concentración más alta que se probó fue 10 µg/mL. Con base en la figura, el valor IC50 esperado estaría incluso por encima de 100 µg/mL.

** La concentración más alta que se probó fue 30 µg/mL. Con base en la figura, el valor IC50 esperado estaría incluso por encima de 100 µg/mL.

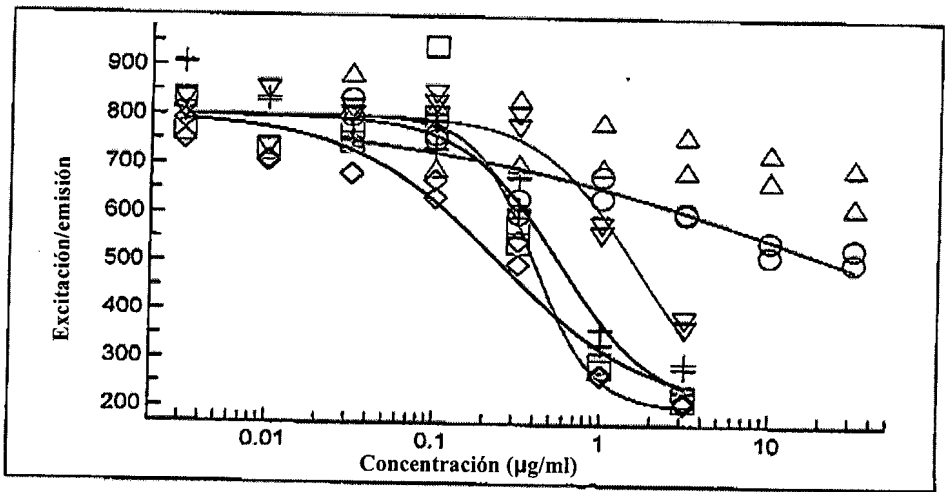
Figura 1. Efecto inhibitorio de IgG4v1 y PB1.3 sobre la adhesión de células HL60 a selectina-P en el experimento de 03-12-02



o = IgG4v1; ∇ = PB1.3

IgG4v1 inhibe la adhesión de células HL60 con un IG50 de 0,11 µg/mL. El valor IC50 de PB1.3 se estima a estar claramente por encima de 10 µg/mL (mayor concentración probada)

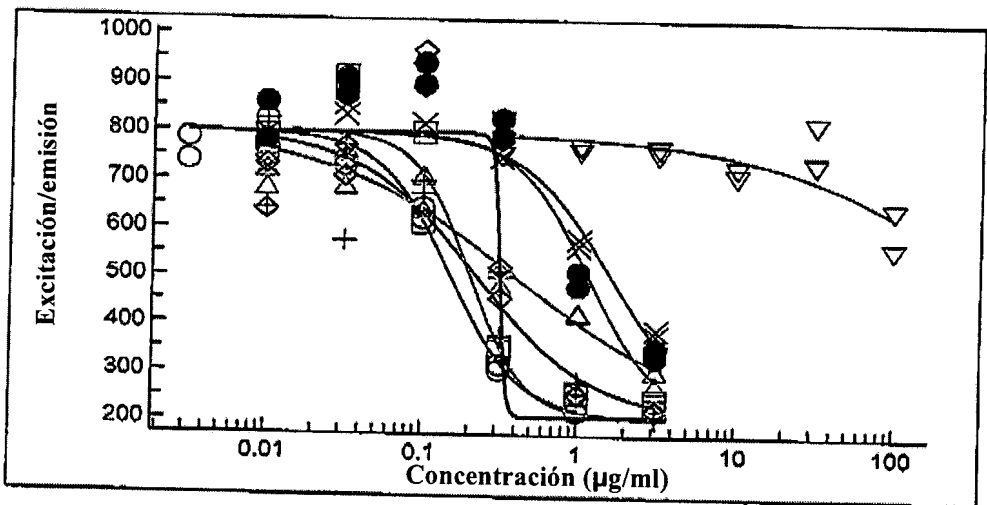
Figura 2. Efecto inhibitorio de IgG4v1 y PB1.3 sobre la adhesión de células HL60 a selectina-P en el experimento de 04-01-28



◊ = IgG4v1; Δ = PB1.3

IgG4v1 inhibe la adhesión de células HL60 con un IG50 de 0,25 µg/mL. El valor IC50 de PB1.3 se estima a estar claramente por encima de 30 µg/mL (mayor concentración probada)

Figura 3. Efecto inhibitorio de IgG4v1 y PB1.3 sobre la adhesión de células HL60 a selectina-P en el experimento de 04-02-12



o = IgG4v1; ∇ = PB1.3

IgG4v1 inhibe la adhesión de células HL60 con un IG50 de 0,15 µg/mL. El valor IC50 de PB1.3 es 411,03 µg/mL

Conclusiones:

El anticuerpo anti-P-selectina IgG4v1 completamente humano es más potente que el anticuerpo anti-P-selectina PB1.3 en la inhibición de la adhesión de células tipo leucocito a P-selectina. En uno de los experimentos, IgG4v1 es >2000 veces más potente que PB1.3 cuando se comparan los valores IC50 de la inhibición de adhesión de células de HL60. Este hallazgo se traduce en una mejor actividad anti-inflamatoria (un modo de acción) del anticuerpo IgG4v1 con respecto al anticuerpo PB1.3. Lo anterior sugiere que IgG4v1 inhibe la adhesión de leucocitos a las células endoteliales inflamadas y el enganche de leucocitos a los sitios de inflamación de manera más eficiente que el anticuerpo PB1.3.

A pesar de que IgG4v1 y PB1.3 tiene una afinidad de enlace más o menos similar (analizado en experimentos de BIACORE), IgG4v1 tiene una mayor actividad inhibitoria comparado con PB1.3.