CAVELIER ABOGADOS COLO 15277-841-003-4 ID-127238

FA

fP SUPER INTEND ENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

1IIIUIIIHIIUI1UII1IIHIIIIIIIIIfflIIO Industria Comercio No. 06-123236- -00004-0000

Fecha 2008-06-03 1748:20 Dep. 2020 NUECREACIONE
S U P E R I N I E N D E N C I A Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act 329 CTOINFORMACION Folios: 39

FORMULARIO UNICO DE CO ...,-.

0 SOLICITIJD DE:

D Correcciôn de Error Material ModificaciOn a una solicitud
Nombre: ABGENOMICS CORPORATION

Sociedad constituida existente bajo las [eyes de 0 Taiwan.

IDENTIFICACION

SOLICITANTE Dirección: 2F, No. 32, Ln. 358 Juihuang Rd.,
Neihu, 0 NIT El
Taipei 114,
Taiwan C.E. 0 Otro 0

Domicitlo: Taipei 114, NUmero:
Taiwan
TelØfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70
E-mail: cIientescamvp.com
IDENTIFICACION
Nombre: Emilio FERRERO

Direcciôn: Carrera 48 No. 72-35 C.C. NIT El
REPRESENTANTE TelØfono: 347 36 11 Fax: 2179211 G.E. 0 Otro El
0 APODERADO E-mail: caveIierccaveIier.com
Nümero: 438.019 TP 31-929

Nümero de expediente: 06.123.236

E) Descripción de la corrección 0 modificación solicitada:

Presento nuevos capltulo descriptivo reivindicatoflo compuesto por 39 reivindicaciones pido respetuosamente que sean tenidos en cuenta al momento de efectuar el examen de patentabi-

lidad de esta solicitud.

(i’) Comprobante de pago No. 08-42,107 Fecha: 27 de mayo de 2008
O Anexos

Comprobante de pago de la tasa par $103.000, por concepto de modificaciones.
El Poderes, si fuere el caso
El Documento que acredita la existencia representaciOn legal de [as partes, cuando sean personas juridicas.

NOMBRE: EMILIO FERRERO FIRMA:
C.C. 438.019 de Usaquen T.P.A. 31.929

LMA

ANTICJERPOS

APLICACIONES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reclama prioridad a la Solicitud Provisional US
Serie No. 60/569,892, presentada en mayo 10, 2004, los contenidos
de la cual son incorporados por referencia en su integridad.

ANTECEDENTES
10

CØlulas-T super agresivas a menudo llevan a respuestas inmunes no deseadas, las cuales, a su vez, causan varios desordenes, por ejemplo, enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplantes,
enfermedades alØrgicas, cÆnceres derivados de cØlulas T. En
15 consecuencia, el control de las cØlulas-T agresivas es critico en
el tratamiento de tales desordenes. La actividad de estas cØlulas puede ser contenida por inmunosupresiôn o por inducción de
tolerancia inmunológica. Una solución alternativa es la inducción
de apoptosis, al cual se cree estÆ involucrada en la remoción de
20 cØlulas no deseadas, incluyendo las cØlulas-T super agresivas.
Ver, por ejemplo, Kabelitz et al. (1993) Immunol Today 14, 338-
340; and Raff (1992) Nature 356, 397-399.

25

RESTJMEN

Esta invención se relaciona con anticuerpos y sus derivados que
inducen apoptosis al fijarse a Ligando-1 Glicoprotelna 1P-Selectina (PSGL-l) sobre cØlulas-T activadas.

- 30 En un aspecto, la invención muestra una cadena de inmunoglobulina
que tiene tres secuencias que (i) contienen, respectivamente,
RSSQSIVHNDGNTYFE, KVSNRFS, y FQGSYVPLT (SEQ ID NOS: 1-3); (ii)
contienen, respectivamente, SFGMH, YINGGSSTIFYANAVKG, y
YASYGGGAMIJY (SEQ ID NOS: 4-6); (iii) contienen, respectivamente,
35 PASSTVNSTYLH, GSSNLAS, y QQYSGYPLT (SEQ ID NOS: 7-9); (iv) contienen, respectivamente, AYYIH, VNPNTGGTSYNPKFKG, y SGSPYYRYDD
(SEQ ID NOS: 10-12); (v) contienen, respectivamente,
RSSQSIVNSNGNTYLE, KVSNRFS, y FQGSHVPWT (SEQ ID NOS: 13-15); o (vi)
contiene, respectivamente, TNAIVINWVRQAPGKGLE, TYYADSVKD, y
40 GGSYWYFDV (SEQ ID NOS: 16-18).

Cada uno de los seis grupos de secuencias antes descritos corresponden a las tres regiones determinantes complementarias de

0.-

cadena liviana y pesada (CDRs)de un anticuerpo que se fija a PSGL-
1, tales como esos de los tres ratones 15A7, 43B6 y 9F9 descritos en los ejemplos de abajo. Mostrados abajo estÆn las regiones
variable (V) de cadena liviana y pesada de estos tres anticuerpos
5 (SEQ ID Nos. 19-26, las CDRs estÆn subrayadas y destacadas.

SEQ ID NO: 19 (Region V de cadena liviana de ratOn 15A7):

1ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCAGCAGTGAT
10 1M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D

6 1ATTTTGATGACCCAAACTCCACTGTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCAATA
211 L M T T P L S L PV S L G QA S

15 12 1TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAATGATGGAAACACCTATTT’rGAATGGTAC
41S C R S S Q S V H N D G N T Y FE WY

18 1CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAACTCCTGATCTACAAAGTTTCCAATCGATTTTCT

61L Q K PG Q S P K L L Y K S R F S
20 24 1GGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACACATTTCACACTCAACATCAGC
81GV PD R F S GS G S G T H FT L IS

25

30

30 1AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTCATATGTTCCTCTC

101 V E A E D L GI Y Y C F Q S Y V P L

361 ACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAA
121TF G A G T K L E L K

SEQ ID NO: 20 (Regi6n V de cadena pesada de rat6n 15A7):

1ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCTTGTCCTTATTTTAAGGTGTCCAGTGTGAT

1M D SR L N L F L V L IL K G V Q CD

6 1GTGCAGCTGGTGGGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCGGCTCTCC

35 21 V Q L V E S G G G L V Q P G G S R K L S

121TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTTCGTCAGGCTCCA

41 C A A S G F T F S S F G M H W V R Q A P

40 181GAGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGCATACATTAATGGTGGCAGTAGTACCATCTTCTATGCA

t

3

61 E K G L E W V A Y I N G S S TI F Y A

24 1AACGCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAATACCCTGTTCCTG
81 A V K G F TI SR D NP K NT L FL
5
301 CAAATGACATTCTAAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGGAAGGTATGCTAGT
101 MT IL R SE D TA I Y Y C G R AS

36 1TACGGAGGGGGTGCTATGGACTATTGGGGTcAAGGAACCTCAGTcACCGTCTCCTCA
10 121Y G G G A M DYWGQGTSVTVSS

SEQ D NO: 21 (Region V de cadena liviana de ratOn 43B6):

1ATGGATTTTCTGGTGcAGATTTTCAGCTTCTTGCTAATCAGTGCCTCAGTTGcAATGTCC

15 1M C F LV Q I F S FL LISA S V AM S

6 1AGAGGAGAAAATGTGCTCACCcAGTCTCCAGCAATCATGTCTGcATCTCCAGGGGAAAAG
21R G EN V L T Q S P Al M S A S PG E K

20 12 1GTcACcATGACCTGcAGGGCcAGCTCAACTGTAATTCCACTTACTTGcACTGGTTCCAG

41 VT MT CR A S S T V N S TYLH W F Q

25

181cAGAAGTCAGGTGCCTCCCCCAAACTCTGGATTTATGGCTcATCCAACTTGGCTTCTGGA

61 Q K S G A S P K L W I Y G S S N L A S G

24 1GTCCCTGCTCGCTTdAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAcAATCAGcAGT 81VPA R F S G S G S G T S Y S L TI S S

30 1GTGGAGGCTGAAGATGCTGCcACTTATTACTGCCAGcAGTAcAGTGGTTACCcACTCACG

30 101V E A E D A A T Y Y C Q Q Y S G Y P L T

361 TTCGGTGCTGGGACCACGCTGGAGCTGAAA
121F G A G T T L E LK

35 SEQ ID NO: 22 (RegiOn V de cadena pesada deratOn43B6):

1ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTCACTAcAGGTGTCcACTCTGAG
1 M E W S W V F ’L F L L S V T T G V H S E
6 1GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTTAGTGAAGATATCC

40 21V Q L Q Q SG P D L V K P G A L V K I S

4 qL

12 1TGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGCCTACTACATTCACTGGGTGAAGCAGAGCCAT
41C K A S G Y S FT A Y Y I H W V K Q S H

5 18 1GGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTGTTATCCTAATACTGGTGGTACTAGCTACAAC
61 G K S LE W I G R V N P NT G G S Y N

10

241 CCGAAGTTcAGGGcAGGCCATATTAATGTAGATAAGTCATCCAGCAcAGCCTACATG
81 P K F K G K A I L N V D K S S S T A Y M

30 1GAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGGGATCC
101 L R S L T S E D S A V Y Y C A R SG S

361CCCTACTATAGGTACGACGACTGGGGCCAAGGACACTCTCACAGTCTCCTCA

rfN 15 121 P Y Y R Y D D W G Q G T T L T V S S

SEQ ID NO: 23 (Region V de cadena liviana de ratdn 9F9):

1ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCAGCAGTGAT
20 1 M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D

6 1GTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATC

21 V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I

25 12 1TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTAAATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTAC
41SC R S S S I V N S N G N T Y L E W Y

30

181CTGCAGPAACCAGGCCAGTCTCCAAGCTCCTGATCTACAA.GTTTCCAPCCGATTTTCT

61 L Q K P G S P K LL I Y K V S N R F S

24 1GGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACrCAAGATCAGC 81GV PD R F S G S G S G T D FT L K IS

30 1AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAQGTTCACATGTTCCGTGG
35 101 R V E A E D L G V Y Y C F 0 G S H V P W

361 ACGTTCGGTGGAGGCACCAGCTGGAAATCA7
121T F G G C T K L E I K

40 SEQ ID NO: 24 (RegiOn V de cadena pesada de ratOn 9F9):

5

1ATGTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTTCTTTGTTGTTTTTTATCAAGGTGTGCATTGTGAG

1M L L G L KW V FF VV F Y Q G V H CE

6 1GTGCAGCTTGTTGAGACTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGGTCATTGAAACTCTCA

5 21 VQ L V E T G G G L V Q P K G S L K L S

121 TGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAATACCAATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCA

41C A A S G F T F N T N A M N W V R Q A P

10 18 1GGAAAGGGTTTAAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAA.AAGTAATAATTATGCAACATAT
61 KG L E W V A R IRS K S N N Y A T Y

241 TATGCCGATTCAGTGAAAGACAGGTTCACCATCTCCAGAGATGATACACAAAGCATGATC

81 Y A D S V K D R D D T Q S I
15 30 1TATCTGCAAATGAACAACTTGAAAACTGAGGACACAGGCATGTATTACTGTGTGAGAGGG

101 L Q MN N L K TED T GM Y Y C V

36 1GGAAGCTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
121G S Y Y F D V W G A G T TV TV S S
20

Como la especificidad antIgena fijadora de un anticuerpo es
determinada por sus cadenas livianas y pesadas CDRs, los CDR5
descritos arriba pueden ser usados para generar derivados de anticuerpos que retienen la especificidad antigeno-fijadora.
25 Ejempios de derivados de anticuerpos inciuyen anticuerpos
quimØricos, anticuerpos humanizados, y sus equivaientes
funcionales. Abajo se muestran la region V de cadena sencilia (SEQ
ID NO. 25) y la regiOn V de cadena pesada (SEQ ID NO: 26) del
anticuerpo humanizado 15 A 7, el cual incluye las SEQ ID Nos: 1-3
30 y SEQ ID Nos: 4-6, respectivamente:

35

SEQ ID NO: 25 (region V de cadena liviana de 15A7 humanizado): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSITVHNDGNTYFEWYQQKPGKAPKLLIYKVSNRFSGVPS RFSGSGSGTHFTLTI S SLQPEDFATYYCFQGSYVPL,T1FGQGTKVE1K

SEQ ID NO: 26 (regiOn V de cadena pesada de 15A7 humanizado): EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWAYINGGSSTIFYANAVKG
RFTI SRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYASYGGGAIVIDYWGQGTLVTVSS

Esta invención tambiØn muestra un Æcido nucleico aislado que
tiene una secuencia que codifica una de las cadenas de inmunoglobulina descritas arriba. El tØrmino "anticuerpo" o
"cadena de inmunoglobulina" se ref iere a un polipØptido aislado,
5 por ejemplo, un polipØptido que ha sido sustancialmente separado
de otras proteInas, lipidos, y Æcidos nucleicos con los cuales
estÆ naturalmente asociado. El polipØptido puede constituir al
menos 50, 70, o el 95 % en peso seco de la preparación purificada.
Un "Æcido nucleico aislado" se ref iere a un Æcido nucleico cuya
10 estructura no es idØntica a esa de cualq-uier Æcido nucleico de
ocurrencia natural o a esa de cualquier fragmento de un âcido
nucleico genômico de ocurrencia natural. El tØrmino en
consecuencia cubre, por ejemplo, (a) un DNA que tiene la secuencia
de parte de una molØcula de DNA genômica de ocurrencia natural
15 pero que no esta flanqueado por ambas secuencias codificadoras que
flanquean esa parte de la molØcula en el genoma del organismo en
la cual el ocurre naturalmente; (b) un Æcido nucleico incorporado
dentro de un vector o dentro de un DNA genômico de una procariota
o eucariota en una manera tal que la molØcula resultante no es
20 idØntica a cualquier vector o DNA genômico de ocurrencia natural o
DNA; (c) una molØcula separada tal como cDNA, un fragmento
genómico, un fragmento producido por reacción en cadena de polimerasa (PCR), o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia nucleótida reconibinada que es parte de un gen hIbrido,
25 por ejemplo, un gen que codifica una proteIna fusion. El Æcido
nucleico de esta invenciOn puede ser usado para expresar un polipØptido de la invenciOn. Para este propOsito, se puede ligar operativamente el âcido nucleico a secuencias regulatorias adecuadas para generar un vector de expresiOn.
30

Un vector se ref iere a una molØcula de Æcido nucleico capaz de
trasportar otro Æcido nucleico al cual Øste se le ha ligado, y
tambiØn capaz de replicaciOn autOnoma o de integraciOn dentro de
un DNA anfitriOn. Los ejemplos incluyen un plÆsmido, un cOsmido y
35 un vector viral. Un vector de esta invenciOn incluye un Æcido
nucleico en una forma adecuada para la expresiOn del Æcido nucleico en la cØlula anfitriOn. Preferiblemente, el vector
una mas secuencias regulatorias operativamente ligadas
a la secuencia de Æcido nucleico a ser expresada. Los ejemplos de
40 secuencias regulatorias incluyen promotores, incrementadores, y

7

otros elementos de control de expresiôn (por ejemplo seflales de poliadenilación). Las secuencias regulatorias tambiØn incluyen aquellas que dirigen expresión constitutiva de una secuencia nucleôtida, asI como secuencias regulatorias tejido-especificas
5 y/o inducibles. El diseflo de tal vector de expresiôn estÆ basado
en consideración que incluyen la escogencia de la cØlula anfitriona a ser trasformada y el nivel de expresiOn deseado. Un vector de expresiOn puede ser introducido dentro de una cØlula anfitriona para producir un polipØptido de esta invención. Esta
10 invención tambiØn incluye una cØlula anfitriona que contiene el
Æcido nucleico descrito antes. Una cØlula anfitriona se refiere a
una cØlula que contiene una secuencia codificante exógena o una secuencia no codificante. Una secuencia exôgena puede ser
introducida dentro de la cØlula por trasfección de fosfato de
15 calcio, trasfecciôn mediada por DEAE-Dextran, o electroporación.
CØlulas anfitrionas adecuadas incluyen cØlulas de bacterias (por ejemplo, E. Coli, Bacilus sultilis y Salmonella typhimurium),
cØlulas de levadura (por ejemplo, Saccharomyces cerevisiae y
Schizosaccharomyces pombe), cØlulas de plantas (por ejemplo,
20 Nicotiana tabacum y Gossypium hirsutum) y cØlulas de mamIferos
(por ejemplo, cØlulas de hibridoma de murino, cØlulas CHO, y fibroplastos 3T3)

Para producir una cadena de inmunoglobulina de esta invenciôn, se
25 puede colocar una cØlula anfitriona en cultivo bajo condiciones
que permitan la expresiôn de un polipØptido codificado por uno de
los Æcidos nucleico descrito antes, y aislar el polipØptido del cultivo. Alternativamente, un Æcido nucleico de esta invención
puede ser trascrito y traducido in vitro, por ejemplo, usando
30 secuencias reguladoras de promotor T7 y polimerasa T7.

Dentro del alcance de la invenciôn estÆ un anticuerpo. Es formado
por una primera cadena de inmunoglobulina y una segunda cadena de inmunoglobulina, el cual contiene, respectivamente, CDR5 de cadena
35 liviana y CDR5 de cadena pesada del anticuerpo de ratón 15A7,
43B6, o 9F9 mencionado antes. Preferiblemente, este anticuerpo esta formado por las cadenas livianas y pesadas de 15A7.

TambiØn dentro del alcance de esta invención estâ otro anticuerpo
40 que (i) se fija especificamente al Ligando-1 GliproteIna P-

I

8

Selectina sin interferir con la fijaciôn entre Ligando-1 GliproteIna P-Selectina y P-Selectina y, (ii), una vez fijado al Ligando-1 Gliprotelna P-Selectina sobre una cØlula-T activada, induce la muerte de las cØlulas-T. En una incorporación, este
5 anticuerpo se fija especificamente a Ligando-1 Gliprotelna P-

Selectina humano.

AdemÆs dentro del alcance de esta invenciôn estÆ otro anticuerpo
que se fija especificamente a residuos amino Æcido 115-126 del
10 Ligando-1 Gliprotelna P-Selectina humano maduro. Preferiblemente
el anticuerpo se fija especificamente a los residuos amino Æcido 117-123. Mas preferiblemente, se fija especificamente a los residuos amino Æcido 119-121., una secuencia de consenso entre todos los epitopos probados. En efecto, mutación de uno o mas de
15 estos tres residuos amino Æcidos elimina la fijación de anticuerpos. En un ejemplo, este anticuerpo, una vez ligado a Ligando-1 Gliprotelna P-Selectina sobre una cØlula-T activada, induce la muerte de las cØlulas T activadas.

20 En una incorporaci6n, uno de los dos anticuerpos mencionados
inmediatamente arriba esta formado por una cadena liviana y una
cadena pesada que contienen, respect ivamente, SEQ ID Nos: 1-3 y
SEQ ID Nos: 4-6 (por ejemplo, SEQ ID Nos: 19 y 20, 0 SEQ ID NOS:
25-26)
25

En un aspecto adicional, la invención muestra un mØtodo para
(Th inducir la muerte de cØlulas-T activadas. El mØtodo incluye poner
en contacto uno de los tres anticuerpos descritos arriba con una.
cØlula T activada, en la cual la fijación del anticuerpo a la
30 cØlula T activada induce la muerte de la cØlula.

La invención tarnbiØn muestra un mØtodo de modular una respuesta
inmune mediada por cØlulas-T en un individuo. El mØtodo incluye
(i) identificar un individuo que tenga o este en riesgo de tener
35 una condición relacionad a una respuesta inmune mediada por cØlulas-T excesiva y (ii) administrar al individuo una cantidad efectiva de uno de los tres anticuerpos descritos arriba. Una "respuesta inmune mediada por cØlulas-T excesiva" se refiere a
una respuesta causada por un nivel excesivo de cØlulas-T. Un nivel
40 excesivo se ref iere a (1) un nivel mÆs alto que el nivel normal, y

(2) un nivel mÆs alto que el deseado en un individuo, aunque no sea mÆs alto que el nivel normal. Ejemplos de la condiciôn incluyen una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune,
una enfermedad alØrgica, o cancer de cØlulas-T, asi como la
5 situaciôn en la cual el individuo haya recibido o este contemplando recibir un trasplante alogØnico o xenogØnico.

Los detalles de una o mÆs incorporaciones de la invenciôn son establecidos en la descripciOn que acompafia este a continuación.
10 Otros rasgos, objetivos, y ventajas de la invención serÆn aparentes de la descripción detallada.

DESCRIPCION DETALLADA

15 La invenciôn esta basada, al menos en parte, en un descubrimiento
inesperado por el cual a celulas-T activadas se les puede inducir apoptosis y ser agotadas mediante la fijación de anticuerpos o sus derivados a PSGL-1 sobre las cØlulas activadas. Los anticuerpos y derivados son ütiles para tratar condiciones asociadas con una
20 respuesta inmune mediada por cØlulas-T excesiva o indeseada o con
proliferación de cØlulas-T.

Concordantemente, la invención muestra polipØptidos que contienen CDRs de cadena liviana o pesada de inmunoglobulina de anticuerpos
25 anti-PSGL-1, asI como Æcido nucleicos que los codifican. Ambas las
cadenas de inmunoglobulina y los Æcidos nucleicos pueden ser usados para hacer los anticuerpos mencionados arriba y derivados.

Una cadena de inmunoglobulina de la invención puede ser obtenida
30 como un polipØptido sintØtico 0 un polipØptido recombinado. Para
preparar un polipØptido recombinado, un Æcido nucleico que lo codifica puede ser ligado a otro Æcido nucleico que codifica un socio de fusion, por ejemplo, Glutationa-S-Trasferasa (GST), marcador 6x-His epitopo, proteina M13 Gene 13, o una regiOn
35 constante de cadena pesada de inmunoglobulina. El Æcido nucleico
de fusiOn resultante puede ser introducido a una cØlula para la expresiOn de protelna. La proteIna de fusion puede ser aislada de
la cØlula anfitriona por mØtodos bien conocidos en el arte. La proteIna de fusion aislada puede ser tratada adicionalmente, por
40 ejemplo, por digestiOn enzimÆtica, para remover el socio de fusiOn
y obtener el pØptido recombinado de interØs. Alternativamente, una

10 th

cadena de inmunoglobulina puede ser obtenida de una cØlula
anfitriona adecuada mediante la activación de expresión endógena
de un Æcido nucleico que codifica la cadena.

5 La composiciôn amino Æcido de una cadena de inmunoglobulina de la
invención puede variar sin afectar la habilidad de formar un
anticuerpo capaz de fijarse a PSGL-l. Por ejemplo, tal variante
puede contener uno o mÆs sustituciones amino Æcidas conservadoras.
Una "sustituciôn amino Æcido conservadora" es una en la cual el
10 residuo amino Æcido es reemplazado con un residuo amino Æcido que
tiene una cadena lateral similar. Familias de residuos amino Æcidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas
en el arte. Estas familias incluyen amino Æcidos con cadenas laterales bÆsicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina),
15 cadenas laterales acIdicas (por ejemplo, Æcido aspÆrtico, Æciclo
glutÆmico), cadenas laterales polares descargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteina), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina,
20 triptofan), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromÆticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofan, histidina). As!, un residuo amino Æcido no esencial predicho en un polipØptido es preferiblemente reemplazado con otro residuo amino Æcido de la
25 misma familia de cadena lateral. Alternativamente, mutaciones
puede ser introducidas aleatoriamente a lo largo de todas las
partes del polipØptido de esta invenciôn, tal como por mutagØnesis
de saturación, y los mutante resultantes pueden ser seleccionados
por su habilidad de formar un anticuerpo capaz de fijarse a PSGL-1
30 para identificar las variantes de esta invención como se describe
adelante en los ejemplos. AsI, como un ejemplo, el tØrmino "una cadena de inmunoglobulina que contiene SEQ ID NO: 19" cubre cadenas de inmunoglobulina que contiene variantes de SEQ ID NO:

19.
35

Las cadenas de inmunoglobulina descritas arriba y las variantes
pueden ser usadas para un anticuerpo de esta invención y sus
derivados. Un "anticuerpo" incluye molØculas intactas asi como
fragmentos de ellas, tales como Fab, F(ab)2, Fv, scFv (anticuerpo
40 de cadena simple), y dAb(anticuerpo dominio; Ward et al. (1989)

11

Nature, 341, 544). Un derivado de un anticuerpo se refiere a una proteIna o complejo de proteIna que tiene una variante del polipØptido de esta invenciôn. Un anticuerpo o derivado de esta invención puede ser hecho mediante la co-expresión de polipØptidos
5 que contienen CDRs de cadena liviana y pesada correspondientes en
una cØlula anfitrión adecuada como se describe en los ejemplos de abajo. Alternativamente, ellos pueden ser hechos por mØtodos conocidos en el arte de elaborar anticuerpos monoclonales y
policlonales y fraginentos. Ver, por ejemplo, Harlow y Lane (1988)
10 Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory,
New York.

Para hacer un anticuerpo de esta invención, PSGL-1 o su fragmento
antigØnico pueden ser acoplados a una proteIna vehIculo, tal como

1 15 KLH, mezclados con un adyuvante, e inyectados dentro de un animal

anfitriôn. Los anticuerpos producidos en ese animal pueden ser
luego purificados por cromatografía de afinidad de pØptidos. Los animales anfitriones comünmente empleados incluyen conejos, ratones, cerdos de guinea y ratas. Los varios adyuvantes que
20 pueden ser usados para aumentar la respuesta inmunolôgica dependen
de la especie anfitriona e incluyen adyuvante de Freund (completo
e incompleto), geles minerales tales como hidr6xido de aluminio, sustancias activas superficialmente tales como lisolecitina, poliols plurónicos, polianiones, pØptidos, emulsiones de aceite,
25 keyhole limpet, hemocianina, y dinitrofenol. Los adyuvantes humanos ütiles incluyen BCG(bacilo Calmette-Guerin) y Corynebacterium parvum.

Los anticuerpos policlonales, poblaciones heterogØneas de
30 molØculas de anticuerpos, estÆn presentes estÆ presente en el
suero de los sujetos inmunizados. Los anticuerpos monoclonales, poblaciones homogØneas de anticuerpos para un antígeno en particular, pueden ser preparados usando tecnologIa de hibridoma
estÆndar (ver, por ejemplo, Kohler et al. (1975) Nature 256, 495;
35 Kohler et al. (1976) Eur J Immunol 6, 511; Kohler et al. (1976)
Eur J Immunol 6, 292; y Hammerling et al. (1981). Monoclonal
Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N. Y). En particular,
los anticuerpos monoclonales pueden ser obtenidos por cualquier tØcnica que permita la producción de molØculas de anticuerpos
40 mediante lIneas de cØlulas continuas en cultivo tal como se

12 ’Cu

describe la patente U.S No 4,376,110; La tØcnica del hibridoma de
CØlula-B humana (Kosbor et al. (1983) Immunol Today 4, 72; Cole et
al. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80, 2026, and la TØcnica de
Hibridoma-EEV (Cole et al. (1983) Monoclonal Antibodies and Cancer
5 Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Tales anticuerpos pueden
ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, 1gM,
IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de ellas. El hibridoma que produce los anticuerpos monoclonales de la invenciôn puede ser cultivado in vitro o in vivo. La habilidad para producir altas
10 concentraciones de anticuerpos monoclonales in vivo lo hace un
mØtodo particularmente ütil de producción.

Adicionalmente, tØcnicas desarrolladas para la produccion de "anticuerpos quimØricos" pueden ser usadas. Ver, por ejemplo,
15 Morrison et al. (1984) Proc Nati Acad Sci USA 81, 6851; Neuberger
et al. (1984) Nature 312, 604; and Takeda et al. (1984) Nature
314:452. Un anticuerpo quimØrico es una molØcula en la cual diferentes partes son derivadas de diferentes especies de
animales, tales como esas que tienen una region variable derivada
20 de un anticuerpo monoclonal murino y un regiOn constante de
inmunoglobulina humana. Alternativamente, las tØcnicas descritas para la producciOn de anticuerpos de cadena simple (Patente US Nos 4,946,778 y 4,704,692) pueden ser adaptadas para producir una biblioteca de fagos de anticuerpos Fv de cadena sencilla. Los
25 anticuerpos de cadena sencilla son formados uniendo los fragmentos
de cadena pesada y ligera de la regiOn Fv a travØs de un puente amino Æcido. MÆs aün, los fragmentos anticuerpos pueden ser generados por tØcnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos
incluyen, pero no se limitan a, fragmentos F(ab)2 que pueden ser
30 producidos por digestiOn de pepsina de una molØcula de anticuerpo,
y fragmentos Fab que pueden ser generados mediante la reducciOn
de los puentes disulfuro de fragmentos F(ab)2.

Los anticuerpos pueden tambiØn ser humanizados por mØtodos
35 conocidos en el arte. Por ejemplo, anticuerpos monoclonales con
una especificidad fijadora deseada pueden ser humanizados
comercialmente (Scotgene, Scotland: y Oxford Molecular, Palo Alto,
Calif). Anticuerpos humanizados completamente, tales como esos expresados en animales trasgØnicos estÆn tambiØn dentro del objeto

13

de la invención (ver, por ejemplo, Green et al. (1994) Nature
Genetics 7, 13; and U.S. Patent Nos. 5,545,806 and 5,569,825).

TambiØn dentro del objeto de la invenciôn esta un mØtodo de
5 inducir la muerte de cØlulas -T activadas, por ejemplo, mediante
el contacto de las cØlulas-T activadas con un anticuerpo de la
invenciôn in vitro, y mediante la administración a un individuo en
necesidad de Øl de una cantidad efectiva de anticuerpo. Los
individuos a ser tratados pueden ser identificados como los que
10 tienen o estÆn en riesgo de tener una condición relacionada con
una respuesta inmune mediada por cØlulas-T excesiva o indeseada,
por ejemplo, pacientes que sufren de enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplantes, enfermedades alØrgicas, o cÆnceres derivados de cØlulas-T. Este mØtodo puede ser realizado solo o en
15 conjunto con otras drogas y terapias.

El termino "tratamiento" se refiere a la administraciôn de una composición a un individuo con el propósito de cura, alivio,
liberación, remedio, prevención o aminoramiento de un desorden, el
20 sIntoma del desorden, el estado de enfermedad secundario al
desorden, o la predisposiciôn hacia el desorden. Una "cantidad
efectiva" es una cantidad de la composiciôn que es capaz de producir resultados mØdicamente deseables en un individuo tratado.

25 Enfermedades de ejemplo para ser tratadas incluyen, diabetes melitos, artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis
reumatoide juvenil, osteoartritis y artritis soriatica), multiple
escierosis, encØfalomielitis, miastenia gravis, lupus eritematoso
sistØmico, tiroiditis autoinmune, dermatitis (incluyendo
30 dermatitis atOpica y dermatitis eczematosa), soriasis, sindrome de
Sjogren, enfermedad de Croim, ülcera aftosa, iritis, conjuntivitis, keratoconjuntivitis, diabetes tipo I, enfermedades
de inflamaciôn del intestino, colitis ulcerativa, asma, asma
alØrgica, lupus eritematoso cutÆneo, escleroma, vaginitis,
35 proctitis, erupciones de droga, reacciones reversas de lepra, eritema nodosum leprosum, uveItis autoinmune, encØfalomielitis
alØrgica, encefalopatla hemorrÆgica necrotizante aguda, perdida de
audiciOn sensorineural progresiva bilateral idiopÆtica, anemia aplÆstica, anemia de glóbulos rojos, trombocitopenia idiopÆtica,
40 policonditis, granulomatosis de Wegners, hepatitis activa crónica,

14 \oT

sindrome de Stevens -Johnson, sprue idiopÆtico, lichen planus,
enferrnedad de Grave, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria,
uveltis posterior, fibrosis de pulmón intersticial, enfer-medad de
injerto versus anfitrión, casos de trasplantes (incluyendo
5 trasplantes usando tejidos alogØnicos o xenogØnicos) tal como el
trasplante de mØdula, trasplante de hIgado, o el trasplantes de
cualquier ôrgano o tejido, alergias tal como alergia atópica, AIDS, y neoplasmas de cØlulas T tales como leucemias o linfomas.

10 En una aproximación in vivo, una composición terapØutica (por
ejemplo, una composición que contiene un anticuerpo de la
invención) es administrada a un individuo. Generalmente, el
anticuerpo es suspendido en un vehIculo farmacØuticamente aceptable (por ejemplo, soluciôn sauna fisiológica) y
15 administrado oralmente o por infusión intravenosa, o inyectado o
implantado subcutÆneamente, intramuscularmente, intratecalmente, intraperitonealmente, intrarectalmente, intravaginalmente, intranasalmente, intragastricamente, intratraquea 0 intrapulmonarmente.

La dosis requerida depende de la ruta de administraciôn escogida;
la naturaleza de la formulación; la naturaleza de 1a enfermedad
del individuo; el tamafio del individuo, peso, area superficial, edad, y sexo; otras drogas que estØn siendo administradas; y el
25 juicio del medico que lo atiende. Las dosis adecuadas estÆn en el
rango de 0.01-100.0 mg/kg. Variaciones en la dosis requerida deben
ser esperadas en vista de la variedad de compuestos disponibles y
las diferentes eficiencias de las varias rutas de administraciôn.
Por ejemplo, la administración oral se esperarla que requiera de
30 mÆs altas dosis que la administraciôn por inyecciôn intravenosa.
Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ser ajustadas usando rutinas empIricas estÆndar par-a optimización como
es bien entendido en el arte. La encapsulaciôn del compuesto en un vehiculo adecuado (por ejemplo, micro partIculas polimØricas o
35 dispositivos iraplantables) puede incrementar la eficiencia del
suministro, especialmente para el uso oral.

TambiØn dentro del objeto de la invenciôn esta una composición farmacØutica que contiene un vehIculo farmacØuticamente aceptable
40 y una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invenciôn. La

15 \(A

composición farmacØutica puede ser usada para tratar las enfermedades descritas arriba. El vehiculo farmacØuticamente aceptable incluye un solvente, un medio de dispersion, un recubrimiento, un agente anti -bacterial y anti-hongos, y un agente
5 isotónico y retardador de absorciOn.

La composiciOn farmacØutica de la invenciOn puede ser formulada en formas de dosificaciOn para diferentes vIas de administraciOn utilizando mØtodos convencionales. Por ejemplo, puede ser
10 formulada en una cÆpsula, un sello de gel, o una tableta para
administraciOn oral. Las cÆpsulas pueden contener cualquier material farmacØuticamente aceptable tales como gelatina 0 celulosa. Las tabletas pueden ser formuladas de acuerdo con procedimientos convencionales mediante la compresiOn de mezclas de
15 la composiciOn con un vehiculo sOlido y un lubricante. Ejemplos
de vehIculos sOlidos incluyen almidOn y bentonita azucarada. La composiciOn puede tarnbiØn ser administrada en la forma de una tableta de cubierta dura o una cÆpsula que contiene un aglutinante, por ejemplo, lactosa o manitol, una lienante
20 convencional, o un agente para facilitar la preparación de tabletas. La composiciOn farmacØutica puede ser administrada por
la via parenteral. Ejemplos de las dosificaciones de las formas
parenterales incluyen soluciones acuosas, soluciOn sauna isotOnica o 5% glucosa del agente activo, u otro excipiente
25 aceptable farmacØuticamente bien conocido. Ciclodextrinas, u otros
agentes solubilizantes bien conocidos a aquellos familiarizados
(" con el arte, pueden ser utilizados como excipientes farmacØuticos
para ilevar el agente terapØutico.

30 La eficacia de una composiciOn de esta invenciOn puede ser evaluada in vitro a in vivo. Ver, por ejemplo, los ejemplos de
abajo. Brevemente, la capacidad de la composiciOn puede ser
probada para establecer su habilidad para inducir la muerte de las cØlulas-T activadas in vitro. Para los estudios in vivo, la
35 composiciOn puede ser inyectada dentro de un animal (por ejemplo
un ratOn muestra) y sus efectos terapØuticos son luego establecidos. Basado en los resultados, un rango de dosificaciOn apropiado y una via de administraciOn puede ser determinada.

16
Ul

El ejemplo especifico de abajo debe ser considerado como meramente ilustrativo, y no limitante del resto del descubrimiento en ninguna forma. Sin mayor elaboraciôn adicional, se cree que una persona hÆbil en el arte puede, basado en las descripciones aquI
5 incluidas, utilizar la presente invención en su alcance pleno.
Todas las publicaciones mencionadas aqul son aqul incorporadas por referencia en su integridad.

10

EJEMPLO 1: Anticuerpos Monoclonales 15 A7, 43B6 Y 9F9 de Ratón

Generación de los anticuerpos anti-PSGL-1

TØcnicas estÆndar fueron usadas para generar anticuerpos monoclonales de ratôn que especificamente se fijan a PSGL-1 humano
15 (hCD 162). Mas especificamente, los ratones fueron inmunizados
con fracciones de mernbrana de cØlulas-T humanas PHA-activadas y sacrificados para generar lIneas de cØlulas de hibridoma. Los supernadantes de las lineas de cØlulas de hibridoma resultante fueron seleccionados por su fijación a cØlulas de CHO que
20 expresaban establemente hDC 162. Esas lIneas productoras de anticuerpos que se pegan a cØlulas de CHO que expresan hCD 162,
pero no a las cØlulas de CHO parentales fueron identificadas,
subclonadas, y analizadas adicionalmente como se describe abajo.
Entre las lIneas identificadas estaban m152 -15A7, 43B6 y 9F9.
25 Ellas produjeron anticuerpos IgGi 15A7, 43B6 y 9F9 respect ivamente. El ensayo de inmunoblotting mostrô que estos tres anticuerpos arrancaron de la lisata de cØlulas-T activadas una proteIna que podia ser detectada por el anticuerpo anti-hCD162
(kpl-1, PharMingen, San Diego, CA).

Los tres anticuerpos anteriormente descritos fueron probados por
su habilidad para inducir apoptosis de cØlulas-T activadas. Los supernadantes de los cultivos que contienen anticuerpos monoclonales secretados por las tres lIneas de cØlulas de
35 hibridomas fueron respectivamente incubados o con cØlulas-T humanas no activadas (DIa 0) o cØlulas-T humanas activadas in vitro (Dia 7) durante 6 horas. Las cØlulas fueron luego manchadas
con anexina V y sometidas a anÆlisis FACS. Las cØlulas CD -3
positivas fueron aforadas para asegurar el conteo de o las
40 cØlulas-T humanas activadas in vitro o las cØlulas-T humanas en
reposo. Las cØlulas apoptóticas fueron positivas al manchado de

17 \0

anexina V. La tabla 1 resume los porcentajes de cØlulas-T
apoptóticas entre todas las cØlulas-T barridas.

Tabla 1 Porcentale de CØlulas-T atoDtóticas
No
tratado

Anti-
myc

M128-
9F9

No
tratado

Anti-
mye

m152-
15 A7

rn166-
43B6
DIa 0 4.17 6,67 5.82 18.18 15.52 5.23 6.57
DIa 7 12.63 13.36 28.71 24.18 23.08 51.66 49.44
5

Estos resultados indican que los anticuerpos de ratôn m152 -15A7,
43B6 y 9F9 (1) son hCD-162 especIficos y (2) pueden fijar a cØlulas-T activadas e inducir apoptosis de las cØlulas-T activadas, pero no de las cØlulas-T humanas en reposo.
10

El ensayo de apoptosis fue tambiØn conducido sobre cØlulas mononucleares de sangre perifØrica humana PHA-activadas (PBMC). Se encontró que los anticuerpos solo inducen apoptosis en cØlulas T activadas, pero no en cØlulas T en reposo, cØlulas B, o en
15 neutrôfilos.

Es conocido que los anticuerpos agotadores de cØlulas-T, tal como anti-CD3, son capaces de inducir producción de factores solubles. Terapia utilizando estos anticuerpos usualmente resulta en un
20 sIndrome de citoquina daflino. Para probar si el anticuerpo anti-
PSGL-1 tambiØn causaba efectos secundarios asociados a la citoquina, PBMC humanos frescos aislados fueron cultivados con 15A7 por 24, 48, o 72 horas. Los niveles de citoquinas en los sobrenadantes fueron luego determinados. Cantidades considerables
25 de IL-2, TNF-a, e IFN-y fueron producidas en el PHA-activado PBCM
(control positivo), mientras que los niveles de estas citoquinas
en cØlulas tratadas con 15A7 no fueron detectables. Estos resultados soportan que el anti-PSGL-1 no tiene o tiene efectos pequeflos en cØlulas de sangre perifØrica en reposo, en ambos
30 aspectos inducción apoptótica y activaciôn de cØlulas.

Puesto que los anticuerpos descritos anteriormente inducen selectivamente apoptosis de cØlulas-T activadas sin causar efectos
adversos en las cØlulas T en reposo u otras cØlulas inmunes, la
35 administración de aquellos a un sujeto es poco probable que

18

IN

5

10

15

20

25

resulte en linfopenia o una inmunodeficiencia extensa como lo
hace el anti-CD3 o los inmunosupresores.

Mapeo de epItopos de los anticuerpos anti-CD162

Para mapear los epItopos fijadores de ratones 15A7, 43B6, y 9F9 en
CD162 humano, una serie de proteInas de fusion que cubren varias
regiones de CD162 humano fueron expresadas y purificadas. Las interacciones entre las protelnas de fusiOn y estos anticuerpos monoclonales fueron analizadas por el ensayo inmunosorbente de enzima-ligado Sandwich (ELISA).

Brevemente, fraginentos que cubren varias regiones del gen humano
CD162 fueron expresados como proteInas de fusiOn con regiOn constante de cadena pesada de inmunoglobulina gamma 1 humana en E.
coli. cDNA codificando la regiOn constante de cadena pesada de
inmonoglobulina gamma 1 fue amplificado mediante PCR con primers que tienen un sitio BglII y un sitio BamHI. El producto PCR fue cortado con BglII y BamHI, y subclonado dentro de un vector pET-32a (Novagen) que ha sido digerido por las mismas encimas. Luego,
cDNA codificando varias regiones de hCD162 fue amplificado
mediante PCR con primers que tienen un sitio NdeI en el extremo 5y un sitio BglII en el extremo 3. Los productos PCR fueron cortados con las correspondientes encimas y enmarcado fusionadas a
la secuencia que codifica la regiOn constante de cadena pesada de inmunoglobulina gamma 1 humana en el vector pET-32a. Los primers utilizados en cada construcciOn son listados en la Tabla 2, y las secuencias de los primers son listadas en la Tabla 3.

30 Tabla 2. Noinbres de los primers en cada
I Para amplificar secuencias que codifican

Fragmentos de E

42-119
42-80
61-99
81-119
42-70
42-60
50-80
50-70
42-319

coil que expresan hCD162

Primer hacia Primer reverso adelante

14B1001 AB1005
AB1001 AB1008
AB1003 AB1009
Ab1004 AB1005
AB1001 AB1007
AB1001 AB1006
AB1002 AB1008
AB1002 Ab1007
AB1001 Ablolo

I

19 W,

In

Para amplificar secuencias que codifican Primer hacia Primer reverso

adelante

115-126 AB1022 AB1023
115-126EtoR AB1004 AB1025

Region V de cDNAs
Cadena liviana A91058 AB1059
Cadena pesada AB1058 AB1060

Fragmentos de mamIferos que expresan hCD162
1-119 AB1011 AB1013
1-319 AB1011 AB1012
110-319 AB1058 AB1059
94-148 AB1020 AB1021
119-222 AB1018 AB1019
174-269 AB1016 AB1017
214-317 AB1014 AB1015

Cadenas quimØricas
cadena liviana 15A7 AB1030 AB1031
cadena pesada 15A7 AB1032 AB1033
’cadena liviana 9F9 AB1026 AB1027
cadena pesada 9F9 AB1028 AB1029
cadena liviana 43B6 AB1034 AB1035
cadena pesada 43B6 Ab1036 AB1037

Cadenas humanizadas
cadena liviana 15A7 AB1048 AB1057
cadena liviana 15A7 lerpar AB1049 AB1050
cadena livianal5A7 2d0 par AB10451 AB1052
cadena liviana 15A7 3erpar AB1053 AB1054
cadena liviana 15A7 40 par AB1055 AB1056
cadena pesadal5A7 AB1038 AB1047
cadena pesada 15A7 lerpar AB1039 AB1040
cadena pesada 15A7 2do par AB1041 AB1042
cadena pesada 15A7 3 par AB1043 AB1044
cadena pesada 15A7 40 par AB1045 AB1046

Tabla 3. Secuencias de primers
Nombre Secuencia
Nombre Secuencia I
AB10 01 cccgggacCATATGcaggccaccgaatatgagtacc
AB10 02 tatgagCATATGgattatgatttcctgccagaaacgg
AB10 03 aaacggagCATATGgaaatgctgaggaacagcactgacacc
AB1 004 aacccctCATATGaccactgtggagcctgctgcaaggcg

911 "3

fl

AB1 005 gtggtcAGATCTtccatagctgctgaatccgtggacagg
AB]. 006 GTTCCTCAGATCTTCTGGAGGCTCCGTTTCTGGCAGG
AB 1007 AGGCCCAAGATCTGGAGTGGTGTCAGTGCTGTTCCTC
AB1 008 ggctccAGATCTgtagactcaggggttccaggccc
AB10 09 gtggtcAGATCTgtgactgcccctcctgcatccaggcc
AB1 010 GCCAGCAGATCTTGCTTCACAGAGATGTGGTCTGGGG

AB10 11 cgcggatccatgcctctgcaactcctcctgttgc
AB1 012 GCCAGCCTCGAGCTTCACAGAGATGTGGTCTGGGG

A131013 GGTCTGctcgagCATAGCTGCTGAATCCGTGGACAGGTTC
A131058 agacaggccaccgaagggaacctgtccacg
A131059 cgtggacaggttcccttcggtggcctgtct
A131014 ccgctcgagcgccaagattaggatggc
A131015 cgggatccactcaaaccacagccatgg
AblO 16 ccgctcgagtggtagtaggttccatgg
AblO 17 cgggatcaactcaacccacaggcctg
AblO 18 ctgtgcctcgagggctgtggtttgagtg
AblO 19 cgggatccatggagatacagaccactcaac
Ab102 0 cgggatccgatgcaggaggggcagtcac
Ab102 1 ggccgtcactcgagttgtctgtgcctc
Ab1 022 TatgGATTCAGCAGCTATGGAGATACAGACCACTCAACCAgcA
Ab102 3 GATCTgcTGGTTGAGTGGTCTGTATCTCCATAGCTGCTGAATCCA
Abl 024 TatgGATTCAGCAGCTATGCGGATACAGACCACTCAACCAgcA
Abi 025 GATCTgcTGGTTGAGTGGTCTGTATCCGCATAGCTGCTGAATCCA
AB1 026 CTAGTCTAGATGACCCAAACTCCACTCTCCC
AB1 027 CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTAGCATCAGCCCGTTTGATTTCC
AB102 8 TAACATtCtagATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGG
A.B1 029 GGATAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACCGTGG
AB1 030 CTAGTCTAGATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGG
AB 1031 CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTTTTCCAGCTTGGTCCCCCCTCC
AB 1032 CTAGTCTAGATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCC
AB 1033 CTAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACTGAGGttc C
AB]. 034 CTAGTCTAGATGGATTTTCTGGTGCAGATTTTCAGC
AB103 5 CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTAGCATCAGCCCGTTTCAGCTCC
AB1036 CTAGTCTAGATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTC
AB 1037 CTAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCAGCTTCCAGTGGATAGACTGATGG
AB 1038 TCTATCTAGATGAACTTCGGGTCCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAGTG
AB]. 039 CCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGG
AB1 040 CTGAAAGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAAGCTTCCTCCAGGCTGCACTAAGCCTCC
AB104 1 GCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTCGAG
AB1 042 GCATAGAAGATGGTACTACTGCCACCATTAATGTATGCGACCCACTCGAGTCCCTTCCCTGGAGCC
AB1 043 GTAGTACCATCTTCTATGCAAACGCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGATAATGCC
AB1044 CCTCAGCCCTCAGAGAATTCATTTGCAGGTACAGGGTGTTCTTGGCATTATCTCTGGAGATGG
AB 1045 GAATTCTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGATATGCTAGTTACGGAGG
AB1 046 CTGTGACCAGGGTGCCTTGGCCCCAATAGTCCATAGCACCCCCTCCGTAACTAGCATATC

21

AB1047 ACCCTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACTGTGACCAGGGTGCCTTGGCC
AB]. 048 TCTATCTAGATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGC
AB1 049 GCTGCTCTGGGTTCCAGGCTCCACTGGTGACATTCAGATGACCCAATCTCcGAGCTCTG
AB1050 GATCTGCAGGTGATAGTGACCCTATCCCCTACAGACGCAGACGAGCTCGGAGATTGG
AB1 051 CACTATCACCTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAATGATGGAAACACCTATTTTGAATG
AB 1052 GATGAGAAGCTTGGGTGCCTTTCCTGGTTTCTGTTGGTACCATTCAAATAGGTGTTTC
AB1 053 GCACCCAAGCTTCTCATCTATAAGTTTCCAATCGATTTTCTGGTGTCCCATCCAGGTTTAGTGGC
AB1054 GCAGAGAAGAGATGGTGAGGGTGAAGTGTGTCCCAGACCCACTGCCACTAAfi.CCTGGATGG
AB1055 CTCACCATCTCTTCTCTGCAGCCGGAGGATTTCGCAACCTATTACTGTTTTCAAG
AB1056 CCTTGGTGCCTTGACCGAACGTGAGAGGAACATATGAACCTTGAAAACAGTAATAGG
AB1057 ACCCTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTACGTTTGATTTCCACCTTGGTGCCTTGACCG
AB105 8 TATATCTAGAATTCCCCCCCCCCCCCCCCC
AB1059 TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGCATACAGTTGGTGC

AB10 60 ATAGAGCTCAA.GCTTCCAGTGGATAGAC (C/AlT) GATGGGG (C/G) TGT (C/T) GTTTTGGC

as construcciones de expresiones descritas anteriormente fueron transformadas en Escherichia coli variedad BL21 (DE3). Las cØlulas

L

transformadas fueron cosechadas despuØs de 6 horas de inducciôn de
5 IPTG (2 Mm) y resuspendidas en PBS. DespuØs las cØlulas fueron
sonicadas y centrifugadas a 14,000g por 10 minutos, los sobrenadantes resultantes fueron recogidos para purificación de
las protelnas de fusion. Mas especificamente, los sobrenadantes fueron primero incubados con cuentas de protelna G o proteIna A
10 por 3 horas a 4°C. Las cuentas fueron despuØs centrifugadas a
3,000g y lavadas con soiución de lavado amortiguadora I (0.05% Triton X-100, 50mM Tris-HC1, pH 8.5, 400 mM NaCl, 1mM Cad2 y 1 mg/ml OVA) y soluciOn de lavado amortiguadora II (0.05% Triton X-
100, 50mM Tris-HC1, pH 8.5 y 150 mM de NaCl) 5 veces con cada una.
15 Las proteinas fijadas fueron eluidas despuØs con una soluciOn
extractadora amortiguadora que contiene0.1M de glicina-HC1, pH 2.7
y neutralizada con 1 M Tris-HC1, pH 8.6. Todas las protelnas de fusiOn purificadas fueron cuantificadas por el ensayo de proteInas
Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Cat. No. 500-0006) y verificada por

20 SDS-PAGE.

Un sandwich ELISA fue ilevado a cabo para estudiar la interacciOn entre los fragmentos hCD162 y cada uno de 15A7, 9F9, y 43B6. Platos microtitier de 96 columnas fueron cubiertos con anticuerpo
25 IgG de cabra anti humano (Southern Biotechnology, Cat. No. 2040-
01) (2p.g/ml, 50.tl/columnas) de un dia para otro a 4°C. Los platos
fueron bloqueadas por incubaciôn con 0.25% de BSA en PBS (150

- 4

WA

p.1/columna) por 1 hora a 37°C. Los platos bloqueados fueron despuØs incubados con protelnas de fusion que contenIan varios fragmentos de CD162 humano (2 p.g/ml) durante 2 horas a temperatura ambiente. DespuØs de lavar 4 veces con PBS que contiene 0.05% de
5 Tween 20 (PBST), los platos fueron incubados con anticuerpos de
prueba (2 jig/ml) durante 1.5 horas a temperatura ambiente. DespuØs
de la incubaciOn, los platos fueron lavados 4 veces con PBST. 50p.1
de IgG de cabra anti-ratOn diluIdo 1 a 3000 conjugado con fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology, Cat. No. 1031-04)
10 fueron luego adicionados a cada columna y los platos fueron
incubados por 1 hora a 37°C. La reacciOn de encimas fue ilevada a cabo adicionando 50 p.1 de una soluciOn sustrato de fosfatasa alcalina (1 tableta de soluciOn sustrato de fosfatasa alcalina disuelta en 5 ml de soluciOn sustrato amortiguadora que contiene
15 0.012 M de Na2CO3, 0.16 M de NaHCO3 y 1 mM de MgCl2 a pH 8.6), y fue
determinada la absorbancia a 405 nm.

Se encontró que 43B6 y 9F9 fueron capaces de interactuar con todas
las proteInas de fusion que contienen residuos 50 a 60 de CD162
20 humano maduro, indicando que los epItopos de 43B6 y 9F9 estaban
localizados entre los residuos 50-60. A diferencia de 43B6 y 9F9,
15A7 solo se fijO a las protelnas de fusiOn que cubren los residuos 42 a 319, pero no a las proteInas de fusiOn que cubren residuos 42-119, indicando que el epItopo de 15A7 estaba
25 localizado entre los residuos 119 a 319. La localizaciOn del
epItopo de 15A7 fue luego estrechada entre los residuos 115 a 126.
El cambio de un amino Æcido en la posiciOn 120 (Glu->Arg) disminuyO
la interacciOn entre 15A7 y la protelna de fusiOn, indicando que
el dominio de contacto primario del 15A7 sobre CD162 humano estÆ
30 localizado en o adyacente a la posiciOn 120, y el residuo Glu es
esencial para la interacción.

Protelnas de fusiOn que cubren varias regiones de CD162 humano fueron tamblØn expresadas en cØlulas de mamIferos y fueron
35 probadas para su interacciOn con 15A7. Los fragmentos que cubren
estas regiones fueron expresados como protelnas de fusiOn con regiOn constante de cadena pesada de inmunoglobulina gamma 1 humana en cØlulas de mamiferos. Primero, el cDNP. que codifica la regiOn constante de cadena pesada de inmonoglobulina gamma 1 fue

23 1?6

insertado dentro de un vector pCDNA3 (Invitrogen). Segundo, cDNAs
codificando varias regiones de hCD162 fueron amplificados mediante PCR con primers introduciendo un sitio BamI-ri en el extremo 5y un sitio XhoI en el extremo 3’. Estos productos PCR fueron cortados
5 con las correspondientes encimas y subclonados dentro de el vector
pcDNA3 que contiene la region constante de cadena pesada de
inmunoglobulina gamma 1 humana. El nombre y secuencia de cada
primer son listados en las Tablas 2 y 3 anteriores.

10 Los reciØn descritos vectores de expresiOn de mamIferos fueron
transfectados transientemente dentro de cØlulas COS -7 mediante
Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Cat. No. 11668-027) siguiendo la guia del fabricante. Las cØlulas transfectadas fueron cultivadas
en medio Ig ultra bajo (Invitrogen, Cat. No. 16250-078). Las
15 protelnas expresadas fueron purificadas y sometidas a Sandwich
ELISA en la misma manera descrita arriba.

Los resultados de ELISA muestran que solo las proteInas de fusiOn
que contienen residuos 94 a 148 pudieron interactuar interactuar
20 con 15A7. Estos resultados son consistentes con la idea de que el
epitopo de 15A7 estÆ localizado entre los residuos 115 a 126.

Todos los resultados anteriores indican que los epitopos de 9F9, 43B6, y 15A7 son proteino-dependientes, en lugar de ser
25 modificaciOn de carbohidratos-dependientes, puesto que todos los
tres anticuerpos se fijan proteInas de fusion expresadas
bacterialmente. Ellos tarnbiØn indican que, aunque 15A7, 9F9, y
43B6 muestran propiedades similares en tØrminos de especificidad fijadora y funciOn de inducciOn de apoptosis en cØlulas T
30 activadas, ellos funcionan a travØs de dominios diferentes del
CD162 humano y se comportan de manera diferente.

EJEMPLO 2: Anticuerpos QuimØricos 15A7, 43B6, y 9F9
ClonaciOn de regiones variables de cadena liviana y pesada de
35 anticuerpos anti-CD162

cDNA que codifican las regiones variables de cadenas livianas y
pesadas (VL y VH) de los anticuerpos 15A7, 43B6, y 9F9 fueron
amplificadas por un mØtodo de PCR anclado. Los primers 3
40 hibridizados a la regiOn C y los primers 5 hibridizados a la cola

24 k\y

G anexados al cDNA usando deoxi transferasa terminal. Los fraginentos de PCR fueron clonados dentro de un vector pCRII (Invitrogen). Varios clones independientes para cada cadena fueron secuenciados y comparados. Una secuencia representada por la
5 mayorIa de los clones independientes fue escogida. La secuencia
amino Æcido traducida fue luego analizada para confirmar que la secuencia escogida posee las caracterIsticas tIpicas de la regiôn
V de cadena liviana o cadena pesada de ratôn, y pertenece a un
subtipo especIfico. Las regiones complementarias determinantes
10 (CDRs) fueron entonces identificadas por la comparación de las
secuencias amino Æcido traducidas con secuencias de consenso de
cada subtipo. El nombre y secuencia para cada primer utilizado son
listados en las Tablas 2 y 3 anteriores. Las secuencias amino Æcidas deducidas de las regiones V de cadenas livianas y pesadas
15 de 15A7, 4336, y 9F9 (SEQ ID Nos: 19-24 se muestran en Resumen.

Anticuerpos QuimØricos

Para generar vectores para expresar anticuerpos quimØricos, cDNA
20 que codifican las regiones VL y yR de 15A7, 43B6, y 9F9 fueron
amplificados mediante PCR utilizando primers para incluir la
secuencia pØptida de seflal 5y la sefial donante de empalme 3.
Los primers tambiØn introdujeron sitios XbaI en ambos extremos de
los productos PCR, los cuales son luego cortados con la encima
25 XbaI y ligados dentro de vector PVK, pVgl, pVg2, 0 pVg4 XbaI
digerido. MÆs especIficamente, los cDNAs de region VL de 15A7,
4336, y 9F9 fueron subclonados dentro del plÆsmido pVk. Este plÆsmido contenla un promotor CMV, y una secuencia que codifica la
regiOn constante de cadena liviana humana. El cDNA de regiOn VH de
30 15A7, 43B6 Y 9F9 fueron subclonados dentro de los pÆsmidos pVgl,
pVg2, o pVg4. Cada uno de los tres plÆsmidos tenIan un promotor CMV. Ellos tambiØn contenlan, respectivamente, las regiones
constantes de cadena pesada humana de IgGi, IgG2, e IgG4.

35 Cada uno de los plÆsmidos descritos anteriormente que codifican
cadenas livianas fueron co-transfectados con plÆsmidos que
codifican cadenas pesadas dentro de cØlulas COS -7. Los
sobrenadantes de las cØlulas transfectadas fueron recogidos. Los quimericos en los sobrenadantes fueron analizados por
40 su habilidad para fijarse a CD162 humano y para inducir apoptosis
de cØlulas T activadas.

1

25 kA

Se encontró que todos los anticuerpos quimØricos hechos de 15A7, 4336, y 9F9 se fijaron a trasfectantes Sp2/0 que expresan establemente CD162 humano, pero no a las cØlulas parentales Sp2/0, indicando que ellos retienen la especificidad de fijarse al CD162
5 humano. AdemÆs, se encontró que los anticuerpos quimØricos indujeron apoptOsis en cØlulas T que hablan sido activadas por 7 dIas, indicando que ellos tambiØn retienen esta función de sus contrapartes de ratôn.

10 Anticuerpos humanizados

15A7 de ratôn fue utilizado para hacer anticuerpos humanizados a travØs de injertos de su CDR dentro de un marco humano. Para conservar la afinidad fijadora y especificidad, es esencial
15 conservar la conformaciôn de la region V cuando se injerta el CDR
dentro del marco humano. Para seleccionar un donante de marco apropiado, las secuencias amino Æcidas de las regiones V de cadenas liviana y pesada de 15A7 de ratOn fueron comparadas con
las de 50 anticuerpos de ratOn que hablan sido humanizados.
1i
Se encontrO qiie un anticuerpo de ratOn, m]JREG-55, tenIa una alta homologIa de secuencia con la region V de 15A7 de ratOn en ambas cadenas liviana y pesada. La mostrada a continuaciOn es un alineamiento de secuencia de 15A7 de ratOn contra este anticuerpo
25 mDREG-55 (los CDR estÆn resaltados)

Alineamiento de cadena liviana:

(Th mDREG- 55 DIVLTQSPASLSVSLGERASISCKP.SQSVDY-DGDSYt’WYQQKPGQPPKLLIYAASNLES
30 DI++TQ+P SL vsLG++Aslsc++sQs+ + DG++Y WY QKPGQ PKLLIY SN S
ml 5A7 DILMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQS IVIIIJDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS

mDREG- 55 GI PARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDATYYCQQSNEDPWTFGGGTKLEIK
G+P RFSGSGSGT FTLINI yE ED YYC Q + P TF GGTKL1E+K
35 ml 5A7 GVPDRFSGSGSGTHFTLNIERVEAEDLGIYYCFQGSYVPLTFGAGTKLELK

Alineamiento de cadena pesada:

mOREG- 55 EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFrFSTYANSWVRQTPEKRLEWVASISTGGST-YYPDSVKG

40 +V+LVESGGGLV+PGGS KLSCAASGFI’FS++ M WVRQ PEI(LEWVA 1+ G ST +Y ++VKG
m15A7 DVQLVESGGGLVQPGGS1U(LSCAPSGFTFSSFGMRWVRQAPEKGLEwVAYINGGSS’rIFyANAvicQ

mDREG- 55 RFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDThNYYCAR- -DY-DGYFDY WGQGTTLTVSS
RFISRDN i-N L+LQM+ LRSEDTA+YYC R Y G DYqGQGT++TVSS
45 ml 5A7 RFTISRDNPKNTLFLQMTILRSEDTAIYYCGRYASYGGGAI4DYWGQGTSVTVSS

DREG-55 de ratôn es un anticuerpo monoclonal IgGl contra L-
selectina. Las secuencias de las regiones VL y VH de 15A7 de ratón
fueron respectivamente 64.3% (solo marco: 73.8%) y 70% (solo marco: 81.6%) homologas a aquellas de DREG55 de ratón.
5

DREG-55 humanizado (HuDREG-55) habla sido construido utilizando secuencias marco de las regiones VL y VH de un anticuerpo Gal humano. En consecuencia, para humanizar 15A7 de ratón, la secuencia marco de cadenas liviana y pesada Gal humanas fueron
10 utilizadas para reemplazar las contra partes de 15A7 de ratón.

Las regiones variables liviana y pesada de 15A7 humanizado fueron cada una armadas por 4 pares de oligonucleôtidos sintØticos (- 80 bases de longitud). Los oligonucleOtidos de cada para fueron
15 traslapados por alrededor de 20 nucleótidos. Las secuencias nucleótidos fueron seleccionadas y sintetizadas para codificar las secuencias de proteInas de las regiones variables humanizadas incluyendo pØptidos seuial. El ensamblaje y amplificación de los
genes fue lievado a cabo en cuatro pasos: (1) los cuatro pares de
20 oligonucleôtidos complementarios fueron hibridados y extendidos
con fragmento Klenow en 4 reacciones separadas; (2) los 4
fragmentos dsDNA resultantes fueron mezclados por pares, desnaturalizados, rehibridados y extendidos en dos reacciones separadas; (3) los dos fragmentos dsDNA resultantes fueron
25 mezclados, desnaturalizados, rehibridados, y extendidos para crear
la dsDNA longitud total final; y (4) el DNA resultante fue amplificado mediante PCR con primers para introducir un sitio ThaI
en anthos extremos. El fragmento PCR fue luego cortado con ThaI e insertado dentro de los respectivos vectores vVk y pVg4 XbaI
30 digeridos. Luego, en las posiciones donde las interacciones entre
CDR y el marco fueron consideradas importantes, los residuos de
Gal fueron cambiados nuevamente a aquellos del 15A7 de ratón (es decir 162V y D74H). Listados a continuaci6n estÆn los alineamientos 15A7 de ratón y 15A7 humanizado (Hu15A7) contra
35 mDREG-55, en los cuales V62 y H74 estÆn subrayados.

Alineamiento de cadena liviana
hDREG- 55 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDY-DGDSYMNWYQQKPGKPPKL,LIYAASNLES
40 ml 5A7 DILMTQTPL1SLPVSLGDQAS ISCRSSQSIVHNDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
Hul 5A7 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVDGNTYFEWYQQKPGKAPKLLIyKVSNRFS

27

hDREG- 55 GI PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDpw’rFGQGTKvEIK
ml 5A7 GVPDRFSGSGSGTHFTLNISRVEAEDLGIYYCFQGSYVPLTFGAGTIcrJELK
Hul 5 A7 GVPSRFSGSGSGTHFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSYVPLTFGQGTI(VEIK

5 Alineamiento de cadena pesada
hDREG- 55 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCMSGFTFSTYAMSWVRAQPGKGLEWVAS ISTGGST- YYPDSVKG
m15A7 DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSFGT1HWVRQAPEKGLEWVAYINGGSTI FYPNAVKG
Hul 5A7 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGNHWVRQAPGKGLEWVAYINGGSTI FYANAVKG
10
hDREG- 55 RFTI SRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR- -DY-DGYFDYWGQGTLVTVSS
ml 5A7 RFTISRDNPKTLFLQMTILRSEDTAIYYCGRYASYGGG2MDYWGQGTSVTVSS
Hul 5A7 RFTI SRDNAKMTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYASYGGGAMDYWGQGTLVTVSS

15 Los plÆsmidos obtenidos de esta manera codifican cadenas livianas
y pesadas de 15A7 humanizado. Estos plÆsmidos fueron entonces co-
transfectados dentro de cØlulas COS -7. Los sobrenadantes agotados
de las cØlulas cultivadas fueron luego recogidos. 15A7 humanizado
en los sobrenadantes fue probado por su capacidad para fijarse a
20 transfectantes CHO que establemente expresan hCD162 y para
inducir apoptosis en cØlulas T activadas durante 7 dIas. Los resultados muestran que ellos retienen estas capacidades.

Preparación de Anticuerpos QuimØricos y Humanizados

25

CØlulas que producen anticuerpos humanizados y quimØricos fueron producidas. MÆs especIficamente, cØlulas Sp2/0 (Sp2/0-Ag14; ATCC
CRL 1581) fueron establemente transfectadas con los plÆsmidos apropiados por electroporaciôn utilizando un equipo Gene Pulser

fl 30 (Bio-Rad Laboratories) a 360 V y 25 LF de capacitancia de acuerdo
a las instrucciones del fabricante. Antes de la transfección, los plÆsmidàs fueron linearizados por digestión con enzima Bamhl.
Todas las transfecciones fueron efectuadas utilizando 107 cØlulas
en PBS y 20 p.g cada uno de DNA plÆsmido. Las cØlulas de cada
35 transfecciôn fueron colocadas en dos platos de cultivo de 96
columnas. DespuØs de 48 horas, fueron aplicados un medio selectivo
(DMEM 10% FBS/hipoxantina/timidina medio suplementario) y 1 ig/m1
de Æcido micofenólico. Las cØlulas productoras de anticuerpos fueron seleccionadas y aisladas examinando la presencia de
40 anticuerpo en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA.

Las cØlulas aisladas fueron cultivadas en medio libre de suero o
Ig bajo, y el sobrenadante cultivado fue recogido. Los anticuerpos

28 (1L\

fueron purificados por el paso sabre una coluntna de protelna A-Sefarosa CL -4B de estafilococo. DespuØs de lavar 5 veces con cada
soluciôn de lavado amortiguadora I (0.05% Triton X-100, 50mM Tris-
HC1, pH 8.5, 400 mM NaCl, 1mM Cad2 y 1 Mg/Ml OVA) y solución de
5 lavado amortiguadora II (0.05% Triton X-100, 50mM Tris-HC1, pH 8.5
y 150 mM de NaCl), los anticuerpos fijados fueron eluidos can una soluciôn amortiguadora de elusiôn que contiene 0.1 M de glicina-
MCi, pH 2.7, y neutralizada con 1 M Tris-HC1, pH 8.6.

10 Mediciones de Afinidad

Las afinidades de fijación de los anticuerpos de ratØn, quimØrico
y 15A7 humanizado descritos anteriormente fueron determinadas par fijación competitiva.
15

15A7 de ratón fue biotinilado par un sistema EZ-Link Sulfo-NHS-Biotina (Pierce Biotechnology, Cat. No. 21217). Brevemente, 0.5 mg
(3.3 x lO nmoies) de 15A7 de ratón fueron disueltos en 187 Al de
PBS y mezclados con 6.8x105 nmoles de Sulfo-NHS-Biotina. La mezcla
20 fue luego incubada sabre hielo por 2 horas antes de que las
biotinas libres fueran removidas par diÆiisis contra PBS a 4°C de
un dia para otro. El 15A7 de ratôn marcado con biotina asI abtenida fue almacenado a 4°C hasta su utilización.

25 Transfectantes Sp2/0 que expresan estabiemente CD162 humana fueron
utilizados coma fuente de antIgeno CD162 humano. 15A7 de ratôn marcado con biotina fue utilizado como trazador. Cantidades crecientes de anticuerpos competidores We ratón, quimØrico, o
15A7 humanizada) fueron mezclados con 35 ng de ratón 15A7 marcado
30 con biotina e incubado con 1x105 cØlulas Sp2/0 que expresan CD162
par 1.5 horas a 4°C con agitación canstante. DespuØs de lavado, el
anticuerpa secundario, Streptavidin-PE (Becton Dickinson Immunocytometry System Inc. Cat. No. 349023) fue adicianada a la mezcla. DespuØs de incubación por 45 minutos a 4°C, las cØlulas
35 fueron lavadas nuevamente, resuspendidas en 300 p.1 de PBS -l% de
FBS, y sujeto a anÆlisis FACS.

Se encantrô que la mitad maxima de concentración competidora de ratOn 15A7 fue 3.72 pg/mi mientras que las de los 15A7 quimØricas
40 y humanizados fueron 5.71 jig/ml y 4.51 jig/ml, respect ivamente.
Estas resultados indican que las afinidades de 15A7 de ratón,

29

5

quimØrico y humanizado son comparables. En otras palabras, la afinidad fijadora (Ka) para 15A7 de ratón es 4.03 X 107 M1 mientras
que para los 15A7 quimØricos y humanizados son 2.62 X107M’ y

3.33 X 107 M respectivamente.

AnÆlisis de Competición

Los anÆlisis de competición fueron conducidos para estudiar la interacción entre los tres anticuerpos de ratón arriba descritos,
10 PSGL-1, y P-Seiectina.

P-seiectina es un uganda principal de alta afinidad por PSGL-i en
la mayorIa de leucocitos. Para investigar si los tres anticuerpos previenen la fijación de P-selectina a PSGL-1, la fijaciôn de P-
15 selectina humana purificada a cØiulas-T activadas fue medida en
fl la presencia de los tres anticuerpos. KP-1, conocido por bloquear
la interacción de P-selectina y PSGL-1, fue usado como un control
positivo.

20 PBMC humanos fueron activados con PHA al 1% durante 2 dIas y
mantenidos en medio que contiene IL-2 durante 3 dIas. Las cØlulas
fueron incubadas con 9F9, 15A7, 43B6, KPL-l(un PSGL-1 antagonista) tritrados, o un anticuerpo de control (9E10) durante 30 minutos,
seguido de la adiciôn de P-selectina humana recombinada (1.25
25 pg/mi). La fijación de P-seiectina a las cØluias-T activadas fue
medida mediante anti-P-selectina-FITC analizada sobre FACS.

(Th Consistente con reportes previos, KPL-]. casi elimina completamente
la fijación de P-selectina a cØiulas-T activadas a una baja
30 concentraciôn (0.31 pg/mi). 43B6 bioqueo la fijación de P-selectina a las cØlulas T-activadas casi tan efectivamente coma lo
hizo KPL-1, mientras una mas alta concentraciôn de 9F9 fue
requerida para lograr el mismo efecto. En efecto, 0.08 pg/mi de
KPL o 43B6 fue necesario para abolir 50% de la fijaciôn. En
35 contraste, 5 pg/mi de 9F9 fue requerido. Mas aün, 15A7 no tuvo
ning-dn efecto inhibitorio sobre la fijaciôn de P-selectina aün a
20 pg/mi. Sorprendentemente, Øste aumento la fijación de P-
seiectina a PSGL-1. Estos resultados indican que 15A7 y P-
selectina se fijan a diferentes motivos de PSGL-i sobre la
40 cØiuia-T activada.

30

5

10

El hecho de que 15A7 no compitiera con la P-selectina por PSGL-1 indica que una administración in vivo de 15A7 no debe afectar la inmunidad innata por interferencia al reclutamiento dependiente
de P-selectina de leucocitos.

Se ha reportado que PSGL-1 es expresado en bajos niveles en las plaquetas. Los efectos de los anticuerpos 15A7 sobre las plaquetas fueron examinados. Se encontrô que los anticuerpos no aumentaron o inhibieron la agregación de plaquetas humanas.

EJEMPLO 3: Anticuerpo Monoclonal de Hamster TAB4 contra PSGL-1 de ratón.

Un anticuerpo monoclonal contra PSGL-1 de ratón, TAB4, fue
15 preparado de manera similar al mØtodo descrito en el ejemplo 1. El
indujo apoptosis de cØlulas-T in vitro y agotó las cØlulas-T in
vivo. Para determinar si Øl interfiriô con la fijación entre PSGL-
1 de ratón y P-selectina de ratôn, anÆlisis de competición fueron
realizados en una forma similar a la descrita en el Ejemplo 2. Se
20 encontró que TAB4 no inhibió la fijaciôn de P-selectina de ratón a
PSGL-1 de ratón ain en concentraciones tan altas como 20 ig/m1.

EJEMPLO 4: Anticuerpos Monoclonales de Ratón 4B7, 5C4, 12E7, 14B3,
17E5 y 18D12
25

Anticuerpos monoclonales adicionales contra PSGL-1 humano, 437,
5C4, 12E7, 14B3, 17E5 y 18D12 fueron caracterizados. Una vez fijados a cØlulas-T activadas, todos ellos indujeron muerte de las cØlulas-T activadas. AnÆlisis de competición fueron realizados en
30 la manera descrita en el Ejemplo 2 para determinar si ellos
bloquean la interacción entre PSGL-1 y P-selectina. Se encontró
que estos anticuerpos tienen pOCo, Si algün, efecto inhibitorlo
sobre la fijación de P-selectina humana a PSGL-1 humano, aft a las
mas altas concentraciones probadas (5 pg/ml)

OTRAS INCORPORACIONES

Todos los rasgos descubiertos en esta especificación pueden ser combinados en cualquier combinación. Cada rasgo expuesto en eSta
40 especificaciôn puede ser reemplazado por un rasgo alternativo que
sirva el mismo, equivalente o similar propósito. As!, a menos que
se exprese de otra manera, cada rasgo expuesto es solo un ejemplo
de series genØricas de rasgos equivalentes a similares.

32 VD

REIVINDICACIONES

1. Una cadena de inmunoglobulina que incluye, respect ivamente, SEQ
ID NOS: 1-3, SEQ ID NOS: 4-6, SEQ ID NOS: 7-9, SEQ ID NOS: 10-12,
5 SEQ ID NOS: 13-15 0 SEQ ID NOS: 16-18.

10

2. La cadena de inmunoglobulina de la reivindicación 1, donde la cadena de inmunoglobulina incluye SEQ ID NOS: 1-3 0 SEQ ID Nos: 4-

6.

3. La cadena de inmunoglobulina de la reivindicaciôn 1, donde la cadena de inmunoglobulina incluye SEQ ID NOS: 19, 20, 21, 22, 23,
24, 25 o 26.

15 4. La cadena de inmunoglobulina de la reivindicaciôn 3, donde la
cadena de inmunoglobulina incluye SEQ ID NO: 25 0 26.

S. Un anticuerpo aislado, que incluye una primera cadena de inmunoglobulina de la reivindicación 1, y una segunda cadena de
20 inmunoglobulina tambiØn de la cadena 1, donde la primera cadena,
la cual es de cadena liviana, y la segunda cadena, la cual es de
cadena pesada, contienen, respectivamente SEQ ID NOS: 1-3 y SEQ
ID NOS: 4-6; SEQ ID NOS: 7-9 y SEQ ID NOS: 10-12; 0 SEQ ID NOS:
13-15 y SEQ ID NOS: 16-18.

25

6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, donde la
fl) cadena liviana y la cadena pesada contienen, respect ivamente, SEQ
ID NOS: 1-3 y SEQ ID NOS: 4-6.

30 7. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicaciôn 5, donde la
cadena liviana y la cadena pesada contienen, respect ivamente, SEQ
ID NOS: 19 y 20, 21 y 22, 23 y 24, 0 25 y 26

8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicaci6n 5, donde la
35 cadena liviana y la cadena pesada contienen, respect ivamente, SEQ
ID NOS: 25 y 26.

9. Un anticuerpo aislado que se fija especIficamente al Ligando -
1 GlicoproteIna P-Selectina sin interferir con la fijaciôn entre
40 el Ligando -1 GlicoproteIna P-Selectina y la P-Selectina, donde el

33 Ob

anticuerpo, una vez se fija al Ligando 1 GlicoproteIna P-
Selectina sobre una cØlula-T activada, induce la muerte de la cØlula-T activada.

5 10. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicaci6n 9, donde el
anticuerpo incluye una cadena liviana y una cadena pesada que contienen, respectivamente, SEQ ID NOs: 1-3 y SEQ ID NOs: 4-6.

11. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, donde la
10 cadena liviana y la cadena pesada contienen, respectivamente, SEQ
ID NOs: 1-3 y SEQ ID NOs: 4-6.

12. Un anticuerpo aislado que fija especificamente a los residuos amino Æcidos 115-126 del Ligando 1 GlicoproteIna P-Selectina
15 humano.

20

13. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, donde el anticuerpo fija especificamente a los residuos amino Æcidos 117-

123.

14. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 13, donde el anticuerpo fija especificamente a los residuos amino Æcidos 119-

121.

25 15. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicaciOn 12, donde el
anticuerpo incluye una cadena liviana y una cadena pesada que
() contienen, respectivamente, SEQ ID NOs: 1-3 y SEQ ID NOs: 4-6.

16. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, donde el
30 anticuerpo, una vez se fija a]. Ligando -1 GlicoproteIna P-Selectina sobre una cØlula-T activada, induce la muerte de la cØlula-T activada.

17. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 16, donde la
35 cadena liviana y la cadena pesada contienen, respectivamente, SEQ
ID NOs: 1-3 y SEQ ID NOs: 4-6.

18. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicaciôn 8 para uso en
la preparación de u.n medicamento para inducir la muerte de una
40 cØlula T activada.

5

19. Un anticuerpo de la reivindicaciôn 9 para uso en la preparación de un medicamento para inducir la muerte de la cØlula-

T activada.

20. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12 para uso en
la preparación de un medicamento para inducir la muerte de la

cØlula-T act ivada.

10 21. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicaciôn 8 para uso en
la preparaciôn de un medicamento para modular la respuesta inmune mediada por cØlulas-T en un individuo, que tiene o estÆ en riesgo
de tener una condici6n relacionada a una respuesta inmune mediada
por cØlulas-T excesiva.

15

22. El mØtodo de acuerdo con la reivindicaciôn 21, donde la condición es una enfermedad inflamatoria, una enfermedad
autoinmune, una enfermedad alØrgica, o un cancer de cØlulas-T.

20 23. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicaci6n 22, donde el
individuo ha recibido o esta contemplando recibir un trasplante
alogØnico 0 xenogØnico.

24. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9 para uso en
25 la preparaciôn de un medicamento para modular la respuesta inmune
mediada por cØlulas-T en un individuo, que tiene o estÆ en riesgo
de tener una condición relacionada a una respuesta inmune mediada
por cØlulas-T excesiva.

30 25. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 24, donde la
condición es una enfermedad inflamatoria, una enfermedad
autoinmune, una enfermedad alØrgica, o un cancer de cØlulas-T.

26. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicaciOn 25, donde el
35 individuo ha recibido o esta contemplando recibir un trasplante
alogØnico 0 xenogØnico.

27. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicaciôn 9 para uso en
la preparación de un medicamento para modular la respuesta inmune
40 mediada por cØlulas-T en un individuo, que tiene o estÆ en riesgo

35

de tener una condición relacionada a una respuesta inmune mediada
por cØlulas-T excesiva.

28. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 27, donde la
5 condición es una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, una enfermedad alergica, o un cancer de cØlulas-T.

29. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 28, donde el
individuo ha recibido o esta contemplando recibir un trasplante
10 alogØnico o xenogØnico.

30. Un Æcido nucleico
codifica la cadena
reivindicación 1.

31. Un Æcido nucleico
codifica la cadena
reivindicación 3.

aislado que incluye una secuencia que
inmurioglobulina de acuerdo con la

aislado que incluye una secuencia que
inmunoglobulina de acuerdo con la

20 32. Un vector que incluye el Æcido nucleico de acuerdo con la
reivindicación 30.

33. Un vector que incluye el Æcido nucleico de acuerdo con la reivindicaciôn 31.
25

34. Una cØlula anfitriona que incluye un Æcido nucleico que
() codifica SEQ ID NOS: 1-3, SEQ ID NOS: 4-6, SEQ ID NOS: 7-9, SEQ ID
NOS: 10-12, SEQ ID NOS: 13-15 0 SEQ ID NOS: 16-18.

30 35. La cØ].ula anfitriona de acuerdo con la reivindicaci6n 34,
donde la cØlula es una cØlula de bacteria, una cØlula de levadura,
una cØlula de planta, una cØlula de insecto, o una cØlula de mamifero.

35 36. La cØlula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 35,
donde la cØlula de un mamifero es una cØlula de hibridoma.

37. Una cØlula anfitriona que incluye un Æcido nucleico que codifica SEQ ID NOS: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26
40