



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06-123236

21 **EXPEDIENTE No.**

54 **TÍTULO**

ANTICUERPOS

51 **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71 **SOLICITANTE**

ABGENOMICS CORPORATION

DOMICILIO

TAIPEI 114, TAIWAN

74 **APODERADO**

EMILIO FERRERO WILLIAMSON

C.C. 438.019 de Usaquén

22 **BOGOTÁ, D. C.,**

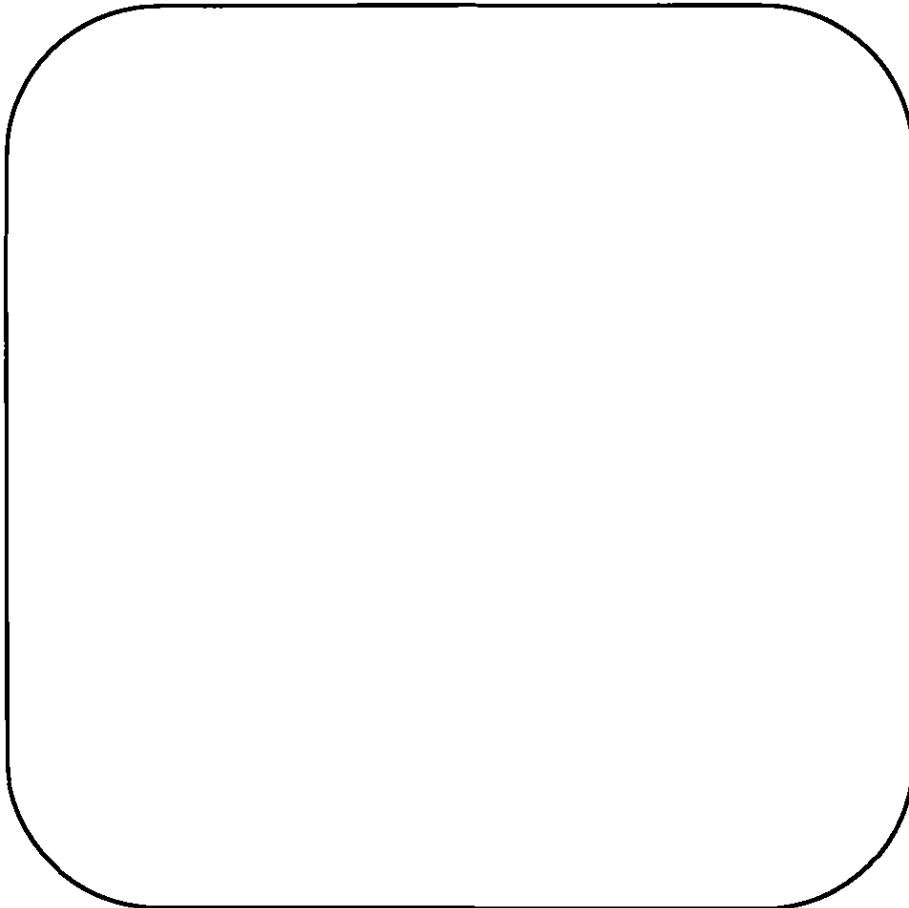
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463 000 oo
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredita la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☒ Otros VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE

EMILIO FERRERO

FIRMA

C C 438 019 de Usaquén T P 31 929

JDF

DOCUMENTOS ANEXOS

- 1 ☒ Publicación Internacional WO 2005/110475 A2
- 2 ☒ Extracto de publicación

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN
FASE INTERNACIONAL**

4

192

**ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 48 N° 72-36
BOGOTA, B - COLOMBIA**

Representación, Ratificación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, marcas nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation, Ratification and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses

REPRESENTACION, RATIFICACION Y PODER

REPRESENTATION, RATIFICATION AND POWER-OF-ATTORNEY

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

ARGENOMICS CORPORATION

domiciliado (s) en/of 2F, No.32 Ln 158, Juihuang Rd, Naitu

Total Tdwn 114 R.O.C.

por el presente ratificamos la Solicitud presentada en el expediente
No. 06.035.911

presentada por Emilio Ferrero
como agente oficioso ante La División de Nuevas Creaciones
en Bogotá, Colombia
el 17 de abril de 2006

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23559 y DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35 Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el párrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, al primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero, y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando

hereby ratify the application No. 06.035.911

Filed without a Power of Attorney by Emilia Ferraro
before The Patent Office
in Roswell, Columbia
on April 12, 2006

and do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZAL PERDOMO, tpa. 831, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 u DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá Colombia, in due compliance with the terms of Paragraph 1st. of Article 543 of the Commercial Code, the first as principal and the others alternates, in the order of their appointment, as our representatives for industrial property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediments. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the shall state their intention not to act before a Notary Public or before a Colombian Public Official or a Colombian Consul abroad. If any of the appointed, the appropriate certifier shall, within 15 days of the appointment, were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment

PAULO MENEZ BARAJAS
NOT (10E)

ocurre la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, sumándose por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

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

of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternate in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (or) industrial property and against the unfair competition, for which purpose (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before authorities or persons, with or without jurisdiction, specially the administrative, administrative contentious and judicial, as well as the Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtaining of patents, utility models and industrial designs; the registration trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin, its renewal, assignment, change of name, domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or judicial cancellation, nullity infringement, granting of licenses, the action for writ of mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

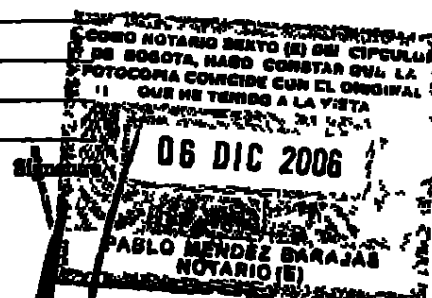
Dado y firmado hoy/Given and signed this

19 July 2006

en/In Taipei, Taiwan

por/by Shih-Yau Lin

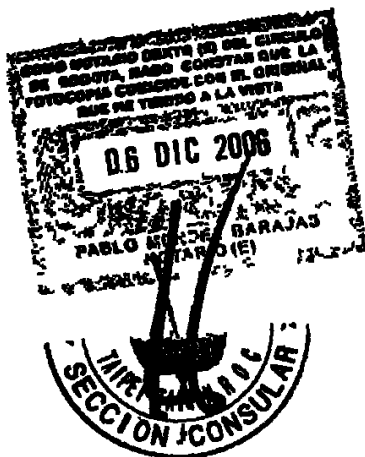
Firma



案號	5396	自	19 日
Cause No	5396	Date	19 July
本文件之署名或蓋章，於台灣台北地方法院所屬民間公證人趙序祥事務所完成。公證人 趙序祥			
Attested at the Chao Yuan Sun Notary Public Office of Taiwan Taipei District Court ROC that the signature(s)/seal(s) in this document is/are authentic.			
Notary Public			
Chao Yuan-Sun			
901 NO 346 NAN-KING E RD SEC 3 TAIPEI TAIWAN			

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
517960
CITA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPLEA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2006 NOV - 7 P 1 50
JEFE DE LEGALIZACIONES
BUSTO D. C.



EL SUSCRITO CONSUL GENERAL DE COLOMBIA
CERTIFICA
Que el Sr (a) ERNESTO LOZANO LOPEZ
Jefe de AUTENTICACION y
LEGALIZACION MINISTRO
DE RELACIONES EXTERIORES
27 de Octubre OCT de 2006
Firma y sello del Consular 118 Voto Pagado 24=



CESAR E. HERNANDEZ RIANO
Consul General de Colombia
Panamá Rep de Panamá



REPUBLICA DE PANAMA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES



Departamento Consular y
Legalizaciones

**CERTIFICADO DE
AUTENTICACION**

Recibo Oficial No. 353416

Arancel No. 60

Derechos B/. 10.00

No. **306873**

AMP-05



El Suscrito **MAYTE YEN**
NOMBRE DEL FUNCIONARIO CONSULAR
FIRMA AUTORIZADA, EMBAJADA DE PANAMA EN
TAIPEI, TAIWAN R.O.C.
TITULO Y LUGAR DE ACREDITACION



El infrascrito funcionario de
Legalizaciones del Ministerio de
Relaciones Exteriores debidamente autorizado
para este acto

CERTIFICA:

Que la firma que antecede y que dice:

MAYTE YEN

es auténtica del funcionario que el día 4
de OCTUBRE año 2006

ejercía el cargo de FIRMA AUTORIZADA DE LA EMBAJADA
DE PANAMA EN TAIPEI, TAIWAN R.O.C

Panamá 26 de OCTUBRE año 2006

Autenticación Nº 161C-PC
110574C

Firma del funcionario *[Firma]*

Liq. Ernesto Lozano Lopez
JEFE DE AUTENTICACION Y LEGALIZACION
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

Este Ministerio no asume responsabilidad en cuanto al contenido
del documento.

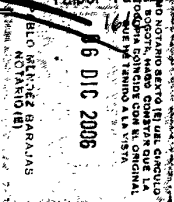
CERTIFICA:
que la firma que aparece en el documento adjunto que
dice: CHAO YUAN SUN
es auténtica y corresponde a la que acostumbra usar en los
documentos que autoriza en calidad de NOTARY PUBLIC
OFFICE OF TAIWAN TAIPEI DISTRICT COURT, R.O.C

Dado en la Ciudad de TAIPEI el día 04
del mes de OCTUBRE del año 2006

MAYTE YEN
Firma Autorizada

Embajada de Panama
Taipei, Taiwan R. O. C.

INTERESADO



7

7

CERTIFICATION OF AUTHORITY

1 I, SHIH-YAO LIN, President of ABGENOMICS CORPORATION do hereby certify that

1 1 SHIH-YAO LIN is the President of ABGENOMICS CORPORATION and that he/she is the authorized by ABGENOMICS CORPORATION to execute this Power of Attorney on its behalf

1 2 That ABGENOMICS CORPORATION is a corporation/company legally constituted and in existence in accordance with the laws of Taiwan

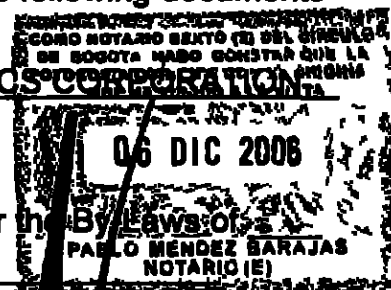
1 3 That the domicile of said corporation/company is 2F, No 32 Ln 358, Juikuang Rd, Neihu, Taipei, Taiwan 114, R O C

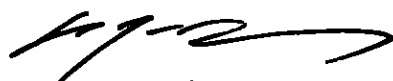
1 4 That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned corporation/company

2 For issuing this certification that I have seen the following documents

2 1 The Articles of Incorporation of ABGENOMICS CORPORATION dated May 26, 2006

2 2 The Resolution of the Board of Directors and/or the By-Laws of ABGENOMICS CORPORATION, dated _____



案號	7278	日期	SEP 18 2006
Case No		Date	
本文件之簽名或蓋章，於台灣台北地方法院所屬民間公證人趙原 事務所辦理。公證人 趙 原 孫			
Attested at the (Yun, Yuan-Sun Notary Public Office of Taiwan Taipei District Court ROC, that the signature(s)/seal(s) in this document is/are authentic			
Notary Public 			
Chau Yuan-Sun			
901 NO 346 NAN-KING E RD SEC 3 TAIPEI, TAIWAN			

Signed by 
Shih-Yao Lin

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
517958
Copia y firma aparte en el
documento de senpeña
las funciones indicadas

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
700 NOV - 7 P 1 50
Jefe de LEGALIZACIONES
BRIGATA D.C.



EL SUSCRITO CONSUL GENERAL DE COLOMBIA
CERTIFICA
(1) ERNESTO LOZANO LOPEZ
Fue autenticado en la
LEGACION MINISTERO
DE RELACIONES EXTERIORES
de la ciudad de Bogotá
el día 27 de octubre de 2006
Documento 117 Valor Pagado 24 =
(FIRMA Y SELLO CONSULAR)



CESAR E. HERNANDEZ RIANO
Cónsul General de Colombia
Panamá Rep de Panamá



Departamento Consular y Legalizaciones

CERTIFICADO DE AUTENTICACION

Recibo Oficial No 353416

Arancel No. 60

Derechos B/. 10.00

No. 306874

AMP-05



El Suscrito MAYTE YEN
NOMBRE DEL FUNCIONARIO CONSULAR
FIRMA AUTORIZADA, EMBAJADA DE PANAMA
TAIPEI, TAIWAN, R.O.C.
TITULO Y LUGAR DE ACREDITACION



El infrascrito funcionario de Legalizaciones del Ministerio de Relaciones Exteriores debidamente autorizado para este acto

CERTIFICA:
Que la firma que antecede y que dice:

CERTIFICA:

que la firma que aparece en el documento adjunto que dice: CHAO YUAN-SUN

es auténtica y corresponde a la que acostumbra usar en los documentos que autoriza en calidad de NOTARY PUBLIC
OFFICE OF TAIWAN TAIPEI DISTRICT COURT, R.O.C.

Dado en la Ciudad de TAIPEI el día 04

del mes de OCTUBRE del año 2006

MAYTE YEN
Firma Autorizada
Embajada de Panamá
Taipei, Taiwan R. O. C.
INTERESADO
06 DIC 2006
MINISTRO DE RELACIONES EXTERIORES
NOTARIO SEPTO EN SU OFICIO
NOTA: HAY QUE COMPROBAR QUE LA
FIRMA DEL FUNCIONARIO CONSULAR
COINCIDE CON LA ORIGINAL

MAYTE YEN

es auténtica del funcionario que el día 4

de OCTUBRE año 2006

ejercía el cargo de FIRMA AUTORIZADA DE LA EMBAJADA
DE PANAMA EN TAIPEI, TAIWAN, R.O.C

Panamá 25 de OCTUBRE año 2006

Autenticación Nº 15C-PC
110574C

Firma del funcionario

Lic. Ernesto Lozano Lopez
JEFE DE AUTENTICACION Y LEGALIZACION
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

Este Ministerio no asume responsabilidad en cuanto al contenido del documento.

161C

9

9

TRADUCCIÓN OFICIAL No 11 08/06b realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento mediante el cual **ABGENOMICS CORPORATION**, domiciliada en 2F, No 32 In 358, Juikuang Rd, Neihsu, Taipei, Taiwán, 114, Republica de China, ratifica la solicitud presentada en el expediente No 06 035 911 por el Dr Emilio Ferrero como agente oficioso ante la División de Nuevas Creaciones en Bogotá, Colombia el 12 de abril de 2006, y adicionalmente otorga derechos de representación y poder a los Doctores EMILIO FERRERO, tpa 31929, GONZALO PERDOMO, tpa 831, LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, tpa 23555 y DANIEL PFÑA, tpa 65620, domiciliados en la Carrera 4 No 72-35 Bogotá, Colombia

Dado y firmado el 19 de julio de 2006 en Taipei, Taiwán, por Shih-Yao Lin

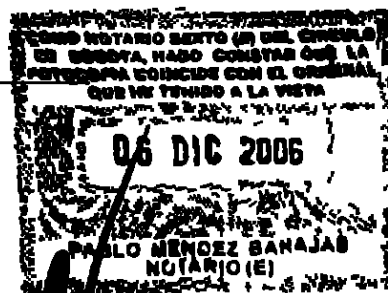
Firma Ilegible

Firma

Sello

Caso No 5396

Fecha JUL 19 2006



Se certifica en la Oficina de Notario Publico de Chao, Yuan-Sun Tribunal de Distrito de Taipei, Taiwan Republica de China, que la firma(s) / sello(s) en este documento es / son auténticas

Notario Publico

Firma Ilegible

Chao, Yuan-Sun

(ANEXO)

Se anexa Certificado de Autenticación No 353416 con Recibo Oficial 306873 de la Republica de Panamá por medio de la cual Mayte Yen, en su capacidad de Firma Autorizada de la Embajada de Panamá en Taipei

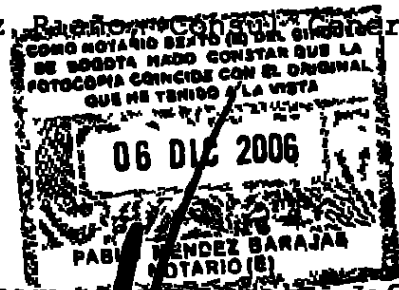
80

Taiwán, Republica de China, certifica la firma anterior de CHAO YUAN-SUN como Notario Publico de la Oficina del Tribunal de Distrito de Taipei, Taiwán, Republica de China Dado en Taipei el 4 de octubre de 2006

Se anexa la legalizacion por parte del Ministerio de Relaciones Exteriores de Panamá bajo la Autenticación No 161C-PC/110574C de la firma anterior de Mayte Yen como firma autorizada de la Embajada de Panamá en Taipei, Taiwán, Republica de China Dada y firmada el 26 de octubre de 2006 por el Lic Ernesto Lozano Lopez, funcionario de Legalizaciones

Se anexa la certificación No 118 del 27 de octubre de 2006 del Consul General de Colombia en Panamá, en donde se certifica la firma anterior de Ernesto Lozano Lopez como Jefe de Autenticación y Legalización del Ministerio de Relaciones Exteriores de la Republica de Panamá Firmada por César E Hernandez, ~~Presidente del~~ Consul General de Colombia en Panamá

Pagados los Impuestos



Legalizacion de la firma anterior por parte del Jefe de Legalizaciones del Ministerio de Relaciones Exteriores de Bogota bajo el numero **517960** con fecha del 7 de noviembre de 2006

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z

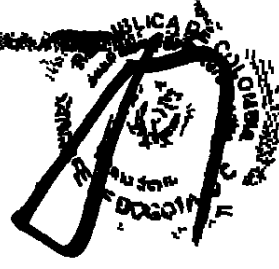
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL INGLÉS - INGLÉS ESPAÑOL
PES 0001 DE FNEPO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

CERTIFICADO DE AUTORIDAD

1 Yo, SHIH-YAO LIN, Presidente de ABGENOMICS CORPORATION, por el presente certifico que

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTA
 BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S)
Vicente Velazquez
Vicente Velazquez
 COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
 EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
 SANTIAGO DE BOGOTA 09 NOV 2006

NO SE ASUME
 RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
 2006 NOV 9 P 110
 Jefe de LEGALIZACIONES
 BOGOTA D.C.



MINISTERIO DE
 RELACIONES
 519550
Diego Garza
 CUYA FIRMA FUE REGISTRADA EN EL
 COLUMBIO DE SANTO DOMINGO DE LOS RIOS
 LAS FUNCIONES DE NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTA BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S)
 QUE SE ENVIAN
 09 DIC 2006
 NOTARIO (E)

1 1 SHIH-YAO LIN es el Presidente de ABGENOMICS CORPORATION y que él/ella está autorizado por ABGENOMICS CORPORATION para suscribir este poder a su nombre

1 2 Que ABGENOMICS CORPORATION es una sociedad/compañía legalmente constituida y en existencia de conformidad con las leyes de Taiwán

1 3 Que el domicilio de dicha sociedad/compañía es 2F, No 22, Ln 358, Juikuang Rd, Neihu, Taipei, Taiwán, 114, Republica de China

1 4 Que el fin o los fines para los cuales se otorga este poder están comprendidos dentro del objeto social establecidos en los estatutos de la mencionada sociedad/compañía

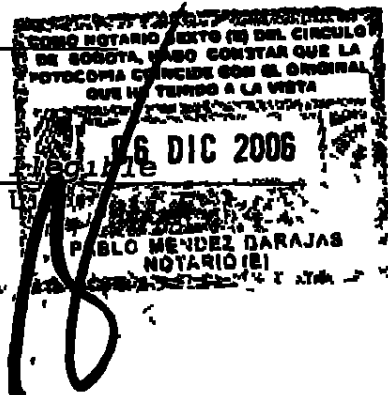
2 Para expedir esta certificación he visto los siguientes documentos

2 1 Los Artículos de Constitución de ABGENOMICS CORPORATION, con fecha del 26 de mayo de 2006

2 2 La Resolución de la Junta Directiva y/o los Estatutos de _____ con fecha del _____

Firma por

Firma Ilegible
Shih-Yao LIN



Sello

Caso No 7278

Fecha SEP 18, 2006

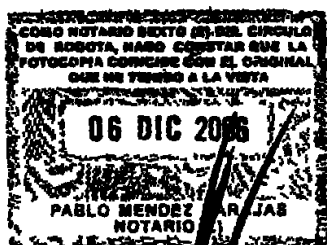
Se certifica en la Oficina de Notario Público de Chao, Yuan-Sun Tribunal de Distrito de Taipei Taiwan, Republica de China, que la firma(s) / sello(s) en este documento es / son auténticas

Notario Publico

Firma Ilegible

Chao Yuan-Sun

(ANEXO)



Se anexa Certificado de Autenticación No 353416 con Recibo Oficial 306874 de la Republica de Panamá por medio de la cual Mayte Yen, en su capacidad de Firma Autorizada de la Embajada de Panamá en Taipei, Taiwán, Republica de China, certifica la firma anterior de CHAO YUAN-SUN como Notario Publico de la Oficina del Tribunal de Distrito de Taipei, Taiwan, Republica de China Dado en Taipei el 4 de octubre de 2006

Se anexa la legalización por parte del Ministerio de Relaciones Exteriores de Panamá bajo la Autenticación No 15C-PC/110574C de la firma anterior de Mayte Yen como firma autorizada de la Embajada de Panamá en Taipei, Taiwán, Republica de China Dada y firmada el 25 de octubre de 2006 por el Lic Ernesto Lozano Lopez, funcionario de Legalizaciones

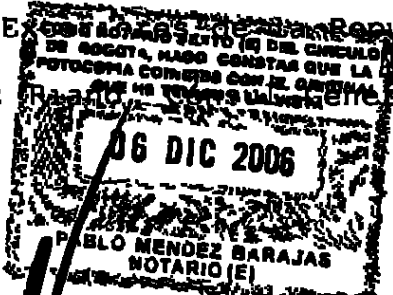
Se anexa la certificación No 117 del 27 de octubre de 2006 del Consul General de Colombia en Panamá, en donde se certifica la firma anterior de Ernesto Lozano Lopez como Jefe de Autenticación y Legalización del Ministerio de Relaciones Exteriores de la Republica de Colombia en Panamá Firmada por César E Hernandez

Pagados los Impuestos

Legalización de la firma anterior por parte del Jefe de Legalizaciones del Ministerio de Relaciones Exteriores de Bogota bajo el numero **517959** con fecha del 7 de noviembre de 2006

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación

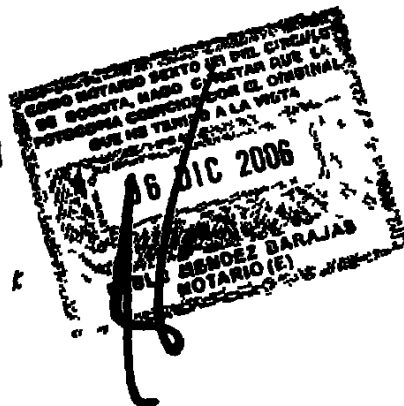
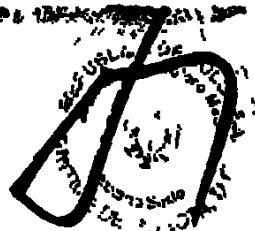
DVZ/ID-8245/WPCL002G/COLO-15277-841-001-8


DIEGO F. VARGAS Z
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL INGLÉS - INGLÉS ESPAÑOL
RFS 0001 DE ENEPO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

NO SE ASUME
"SPONSAC" DEL TEXTO
2006 NOV -9 P 110
JCS
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D C

INTERIO DE
519551
Dup Vargas
AGREGA EN EL
O DESMPEGA
VESTIGADORES

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE
Jorge Felipe
Jorge Salcedo
CONCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA 09 NOV 2006



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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 November 2005 (24.11 2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/110475 A2

- (51) International Patent Classification⁷ A61K 39/395, C07K 16/28 C12N 15/13 (74) Agent TSAO, Y., Rocky, Fish & Richardson P.C. 225 Franklin Street, Boston MA 02110-2804 (US)
- (21) International Application Number PC1/US2005/016357 (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available) AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW
- (22) International Filing Date: 10 May 2005 (10.05 2005) (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English Published.
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- (26) Publication Language: English For two-letter codes and other abbreviations refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette
- (30) Priority Data. 60/569,892 10 May 2004 (10.05.2004) US
- (71) Applicant (for all designated States except US) ABGENOMICS CORPORATION 2F, NO 32, Ln 358, Juikuang Rd, Ntshu, Taipei 114 (TW)
- (72) Inventors, and
- (75) Inventors/Applicants (for US only) LIN, Rong Hwa 7F No 12, Lane 54, Sec 3, Sinsheng S. Rd, Da-an District, Taipei 106 (TW) CHANG, Chung, Nan [US/US] 602 Saint Croix Lane, Foster City, CA 94404 (US) CHEN, Pei-Jiun, 710 Chung-Cheng Road Yung Ho Taipei 234 (TW) HUANG, Chiu Chen, 4F, No 2, Lane 339 Sec 2, Nei hu Road Ntshu Taipei 114 (TW)



WO 2005/110475 A2

(54) Title: ANTIBODIES

(57) Abstract: Immunoglobulin chains or antibodies having light or heavy chain complementarity determining regions of antibodies that bind to P Selectin Glycoprotein Ligand 1. Also disclosed are nucleic acids encoding the immunoglobulin chains, vectors and host cells having the nucleic acids, and methods of inducing death of an activated T cell and of modulating a T cell mediated immune response in a subject.

A
14

ANTIBODIES

RELATED APPLICATION

This application claims priority to U S Provisional Application Serial No 60/569,892, filed on May 10, 2004, the contents of which are incorporated by reference in its entirety

5

BACKGROUND

Overly aggressive T cells often lead to unwanted immune responses, which, in turn, cause various disorders, e g., autoimmune diseases, transplant rejection, allergic diseases, and T cell-derived cancers. Therefore, control of the aggressive T cells is critical in treating such disorders. The activity of these cells can be contained by immunosuppression or by induction of immunological tolerance. An alternative solution is induction of apoptosis, which is believed to be involved in removing unwanted cells, including overly aggressive T cells. See, e g., Kabelitz et al (1993) Immunol Today 14, 338-340, and Raff (1992) Nature 356, 397-399

SUMMARY

15

This invention relates to antibodies and their derivatives that induce apoptosis upon binding to P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) on activated T cells,

}

In one aspect, the invention features an immunoglobulin chain having three sequences that (i) contain, respectively, RSSQSIVHNDGNTYFE, KVSNRFS, and FQGSYVPLT (SEQ ID NOs 1-3), (ii) contain, respectively, SFGMH, YINGGSSTIFYANAVKG, and YASYGGGAMDY (SEQ ID NOs 4-6), (iii) contain, respectively, RASSTVNSTYLH, GSSNLAS, and QQYSGYPLT (SEQ ID NOs 7-9), (iv) contain, respectively, AYYIH, VNPNTGGTSYNPKFKG, and SGSPYYRYDD (SEQ ID NOs 10-12), (v) contain, respectively, RSSQSIVNSNGNTYLE, KVSNRFS, and FQGSHVPWT (SEQ ID NOs 13-15), or (vi) contain, respectively, TNAMNWVRQAPGKGLE, TYYADSVKD, and GGSYWYFDV (SEQ ID NOs 16-18)

25

Each of the just-described six sets of sequences corresponds to the three light or heavy chain complementarity determining regions (CDRs) of an antibody that binds to

PSGL-1, such as those of three mouse 15A7, 43B6, and 9F9 antibodies described in the examples below. Shown below are the light chains and heavy chain variable (V) regions of these three antibodies (SEQ ID NOs: 19-26, the CDRs are underlined and highlighted:

5 SEQ ID NO: 19 (Mouse 15A7 light chain V region):

```
1 ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTGAT
1 M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D
61 ATTTTGATGACCCAACTCCACTGTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCAATA
10 21 I L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I
121 TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAATGATGAAACACCTATTTTGAATGGTAC
41 S C RASSSRQSSITAVSHENEDGGNTAYTPEE W Y
15 181 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAACTCCTGATCTACAAAGTTTCCAATCGATTTTCT
61 L Q K P G Q S P K L L I Y KAVASNNREFES
241 GGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACACATTTACACTCAACATCAGC
20 81 G V P D R F S G S G S G T H F T L N I S
301 AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTTCATATGTTCTCTC
101 R V E A E D L G I Y Y C EQAGSSYAVAPFL
361 ACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
25 121 T F G A G T K L E L K
```

SEQ ID NO: 20 (Mouse 15A7 heavy chain V region):

```
1 ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCTTGTCTTATTTTAAAGGTGTCCAGTGTGAT
30 1 M D S R L N L V F L V L I L K G V Q C D
61 GTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCGGAACTCTCC
21 V Q L V E S G G G L V Q P G G S R K L S
121 TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCTAGTCTTTGGAATGCACTGGGTTTCGTCAAGGCTCCA
35 41 C A A S G F T F S SFGIMH W V R Q A P
181 GAGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGCATACATTAATGGTGGCAGTAGTACCATCTTCTATGCA
61 E K G L E W V A YVFLNAGGLSSSTETLPAVCA
40 241 AACGCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAATACCCTGTTCTCTG
81 NVAVKYG R F T I S R D N P K N T L F L
301 CAAATGACCATTCTAAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGGAAGGTATGCTAGT
45 101 Q M T I L R S E D T A I Y Y C G R YAAAS
361 TACGGAGGGGGTGCTATGGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
121 YGGGA MDY W G Q G T S V T V S S
```

15

SEQ ID NO: 21 (Mouse 43B6 light chain V region):

1 ATGGATTTTCTGGTGCAGATTTTCAGCTTCTTGCTAATCAGTGCCTCAGTTGCAATGTCC
 1 M D F L V Q I F S F L L I S A S V A M S
 5
 61 AGAGGAGAAAATGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAAAAG
 21 R G E N V L T Q S P A I M S A S P G E K
 10
 121 GTCACCATGACCTGCAGGGCCAGCTCAACTGTAAATTCACCTTACTTGCACTGGTTCAG
 41 V T M T C R L A R S L S L T A V N S L T Y G L L H W F Q
 181 CAGAAGTCAGGTGCCTCCCCAAACTCTGGATTATGGCTCATCCAATTGGCTTCTGGA
 15 61 Q K S G A S P K L W I Y G L S L S N L T P A S G
 241 GTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGT
 81 V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S
 20 301 GTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTACAGTGGTTACCCACTCAGC
 101 V E A E D A A T Y Y C Q L Y S S G L Y P L P L
 361 TTCGGTCTGGGACCACGCTGGAGCTGAAA
 121 F G A G T T L E L K
 25

SEQ ID NO: 22 (Mouse 43B6 heavy chain V region):

1 ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTCACTACAGGTGTCCACTCTGAG
 1 M E W S W V F L F L L S V T T G V H S E
 30 61 GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTTAGTGAAGATATCC
 21 V Q L Q Q S G P D L V K P G A L V K I S
 121 TGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGCCTACTACATTCACTGGGTGAAGCAGAGCCAT
 41 C K A S G Y S F T A V Y Y L L L H W V K Q S H
 35 181 GGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTGTTAATCCTAATACTGGTGGTACTAGCTACAAC
 61 G K S L E W I G R V A N L P L N L T L G A G L T S T A Y N
 241 CCGAAGTTCAAGGGCAAGGCCATATTAAATGTAGATAAGTCATCCAGCACAGCCTACATG
 40 81 P K S F K G K A I L N V D K S S S T A Y M
 301 GAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGGGATCC
 101 E L R S L T S E D S A V Y Y C A R S G S
 45 361 CCCTACTATAGGTACGACGACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
 121 P L Y Y L R Y D D W G Q G T T L T V S S

SEQ ID NO: 23 (Mouse 9F9 light chain V region):

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

5

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

10

121 TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTAAATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTAC
41 S C RE-ES-SS-O-S-T-G-V-N-N-S-T-N-A-G-E-N-T-A-Y-L-E W Y

181 CTGCAGAAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCT
61 L O K P G Q S P K L L I Y K-M-V-C-S-N-B-R-P-F-S

15

241 GGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGC
81 G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S

301 AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAGGTTTCACATGTTCCGTGG
101 R V E A E D L G V Y Y C F-Q-G-H-S-H-V-S-P-H-W

20

361 ACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
121 A F G G G T K L E I K

SEQ ID NO: 24 (Mouse 9F9 heavy chain V region):

```

25      1 ATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTTCTTTGTTGTTTTTTATCAAGGTGTGCATTGTGAG
      1 M L L G L K W V F F V V F Y Q G V H C E

      61 GTGCAGCTTGTGAGACTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGGTCATTGAAACTCTCA
      21 V Q L V E T G G G L V Q P K G S L K L S

30      121 TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAATACCAATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCA
      41 C A A S G F T F N TATNCAACACNWAVERONATP

      181 GGAAAGGGTTTGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAGTAATAATTATGCAACATAT
      61 GAKKGGELLE W V A R I R S K S N N Y A TAAY

35      241 TATGCCGATTTCAGTGAAAGACAGGTTTACCATCTCCAGAGATGATACACAAAGCATGATC
      81 YAAADAASAVACKED R F T I S R D D T Q S M I

      301 TATCTGCAATGAACAACCTTGAAAAGTGGAGACACAGGCATGTATTACTGTGTGAGAGGG
      101 Y L Q M N N L K T E D T G M Y Y C V R E

      361 GGAAGCTACTGGTACTTCGATGTCTGCGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCTCA
      121 GASTAYRWYRREDAV W G A G T T V T V S S

```

As an antibody's antigen-binding specificity is determined by its light and heavy chain CDRs, the above-described CDRs can be used to generate antibody derivatives that retain the antigen-binding specificity. Examples of antibody derivatives include chimeric

antibodies, humanized antibodies, and their functional equivalents. Shown below are the light chain V region (SEQ ID NO: 25) and heavy chain V region (SEQ ID NO: 26) of a humanized 15A7 antibody, which include SEQ ID NOs: 1-3 and SEQ ID NOs: 4-6, respectively.

5

SEQ ID NO: 25 (humanized 15A7 light chain V region):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIYHNDGNTYFEWYQOKPGKAPKLLIYKVSNNRESGVPSRFSGSG
SGTHFTLTISLQPEDFATYYCFQGSXVPLTFGQGTKVEIK

10

SEQ ID NO: 26 (humanized 15A7 heavy chain V region):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSEGMHWVRQAPGKGLEWVAYLNGGSSTIEYANAVKGRFTIS
RDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNASVGGGAMDYWGQTSVTVSS

15

20

25

30

This invention also features an isolated nucleic acid having a sequence that encodes one of the above-described immunoglobulin chains. The term "antibody" or "immunoglobulin chain" refers to an isolated polypeptide, i.e., a polypeptide that has been substantially separated from other proteins, lipids, and nucleic acids with which it is naturally associated. The polypeptide can constitute at least 50, 70, or 95% by dry weight of the purified preparation. An "isolated nucleic acid" refers to a nucleic acid the structure of which is not identical to that of any naturally occurring nucleic acid or to that of any fragment of a naturally occurring genomic nucleic acid. The term therefore covers, for example, (a) a DNA which has the sequence of part of a naturally occurring genomic DNA molecule but is not flanked by both of the coding sequences that flank that part of the molecule in the genome of the organism in which it naturally occurs; (b) a nucleic acid incorporated into a vector or into the genomic DNA of a prokaryote or eukaryote in a manner such that the resulting molecule is not identical to any naturally occurring vector or genomic DNA; (c) a separate molecule such as a cDNA, a genomic fragment, a fragment produced by polymerase chain reaction (PCR), or a restriction fragment; and (d) a recombinant nucleotide sequence that is part of a hybrid gene, i.e., a gene encoding a fusion protein. The nucleic acid of this invention can be used to express a polypeptide of this invention. For this purpose, one can operatively link the nucleic acid to suitable regulatory sequences to generate an expression vector

A vector refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked and also capable of autonomous replication or integration into a host DNA. Examples include a plasmid, cosmid and viral vector. A vector of this invention includes a nucleic acid in a form suitable for expression of the nucleic acid in a host cell. Preferably, the vector includes one or more regulatory sequences operatively linked to the nucleic acid sequence to be expressed. Examples of a regulatory sequence include promoters, enhancers, and other expression control elements (e.g., polyadenylation signals). Regulatory sequences also include those that direct constitutive expression of a nucleotide sequence, as well as tissue-specific regulatory and/or inducible sequences. The design of such an expression vector is based on considerations including the choice of the host cell to be transformed and the desired expression level. An expression vector can be introduced into host cells to produce a polypeptide of this invention. This invention also includes a host cell that contains the above-described nucleic acid. A host cell refers to a cell containing an exogenous coding sequence or non-coding sequence. An exogenous sequence can be introduced into a cell by calcium phosphate transfection, DEAE-Dextran mediated transfection or electroporation. Suitable host cells include bacterial cells (e.g., *E. coli*, *Bacillus subtilis*, and *Salmonella typhimurium*), yeast cells (e.g., *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*), plant cells (e.g., *Nicotiana tabacum* and *Gossypium hirsutum*), and mammalian cells (e.g., murine hybridoma cells, CHO cells, and 3T3 fibroblasts).

To produce an immunoglobulin chain of this invention, one can place a host cell in a culture under conditions permitting expression of a polypeptide encoded by a nucleic acid described above, and isolate the polypeptide from the culture. Alternatively, a nucleic acid of this invention can be transcribed and translated in vitro, for example, using T7 promoter regulatory sequences and T7 polymerase.

Within the scope of this invention is an antibody. It is formed by a first immunoglobulin chain and a second immunoglobulin chain which contain respectively the light chain CDRs and heavy chain CDRs of the mouse 15A7, 43B6, or 9F9 antibody mentioned above. Preferably this antibody is formed by the light and heavy chains of 15A7.

17

Also within the scope of this invention is another antibody that (i) binds specifically to P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 without interfering with binding between P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 and P-Selectin and, (ii), upon binding to P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 on an activated T cell, induces the death of the T cell
5 In one embodiment, this antibody binds specifically to human P-Selectin Glycoprotein Ligand 1

Further within the scope of this invention is still another antibody that binds specifically to amino acid residues 115-126 of mature human P-Selectin Glycoprotein Ligand 1. Preferably, the antibody binds specifically to amino acid residues 117-123
10 More preferably, it binds specifically to amino acid residues 119-121, a consensus sequence among all tested epitopes. Indeed, mutation of one or more of these three amino acid residues abolishes antibody binding. In one example, this antibody, upon binding to P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 on an activated T cell, induces the death of the activated T cell

15 In one embodiment, one of the two antibodies mentioned immediately above is formed by a light chain and a heavy chain that contain, respectively, SEQ ID NOs 1-3 and SEQ ID NOs 4-6 (e.g. SEQ ID NOs 19 and 20, or SEQ ID NOs 25 and 26)

In a further aspect, the invention features a method of inducing death of an activated T cell. The method includes contacting one of the three antibodies described
20 above with an activated T cell, in which binding of the antibody to the activated T cell induces cell death

The invention also features a method of modulating a T cell-mediated immune response in a subject. The method includes (1) identifying a subject having or as being at risk of having a condition related to an excessive T cell-mediated immune response and
25 (2) administering to the subject an effective amount of one of the three antibodies described above. An "excessive T cell-mediated immune response" refers to a response caused by an excessive level of activated T cells. An excessive level refers to (1) a level higher than a normal level, and (2) a level higher than desired in an individual, even though it is not greater than a normal level. Examples of the condition include an
30 inflammatory disease, an autoimmune disease, an allergic disease, or a T cell cancer, as

well as the situation in which a subject has received or is contemplated to receive an allogeneic or xenogeneic transplant

The details of one or more embodiments of the invention are set forth in the accompanying description below. Other features, objects, and advantages of the invention will be apparent from the detailed description

DETAILED DESCRIPTION

This invention is based, at least in part, on an unexpected discovery that activated T cells can be induced to undergo apoptosis and be depleted by binding of antibodies or their derivatives to PSGL-1 on the activated cells. The antibodies and derivatives are useful for treating conditions associated with an excessive or unwanted T cell-mediated immune response or T cell proliferation

Accordingly, the invention features polypeptides that contain immunoglobulin light or heavy chain CDRs of anti-PSGL-1 antibodies, as well as nucleic acids encoding them. Both the immunoglobulin chains and nucleic acids can be used to make the above-mentioned antibodies and derivatives

An immunoglobulin chain of the invention can be obtained as a synthetic polypeptide or a recombinant polypeptide. To prepare a recombinant polypeptide, a nucleic acid encoding it can be linked to another nucleic acid encoding a fusion partner, e.g., Glutathione-S-Transferase (GST), 6x-His epitope tag, M13 Gene 3 protein, or an immunoglobulin heavy chain constant region. The resultant fusion nucleic acid can be introduced to a cell for protein expression. The fusion protein can be isolated from the host cell by methods well known in the art. The isolated fusion protein can be further treated, e.g., by enzymatic digestion, to remove the fusion partner and obtain the recombinant polypeptide of interest. Alternatively, an immunoglobulin chain can be obtained from a suitable host cell by activating endogenous expression of a nucleic acid encoding the chain

The amino acid composition of an immunoglobulin chain of the invention may vary without disrupting the ability of forming an antibody capable of binding to PSGL-1. For example, such a variant can contain one or more conservative amino acid substitutions. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid

18

residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Thus, a predicted nonessential amino acid residue in a polypeptide is preferably replaced with another amino acid residue from the same side chain family. Alternatively, mutations can be introduced randomly along all or part of a polypeptide of this invention, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for the ability of forming an antibody capable of binding to PSGL-1 to identify variants of this invention as described below in the examples. Thus, as an example, the term "an immunoglobulin chain containing SEQ ID NO 19" covers immunoglobulin chains containing variants of SEQ ID NO 19.

The above-described immunoglobulin chains and variants can be used to make an antibody of this invention or its derivatives. An "antibody" includes intact molecules as well as fragments thereof, such as Fab, F(ab')₂, Fv, scFv (single chain antibody), and dAb (domain antibody, Ward, et al (1989) Nature, 341, 544). A derivative of an antibody refers to a protein or a protein complex having a polypeptide variant of this invention. An antibody or derivative of this invention can be made by co-expressing corresponding light and heavy chain CDRs-containing polypeptides in a suitable host cell as described in the examples below. Alternatively, they can be made by methods known in the art of making monoclonal and polyclonal antibodies and fragments. See, e.g., Harlow and Lane, (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

To make an antibody of this invention, PSGL-1 or its antigenic fragment can be coupled to a carrier protein, such as KLH, mixed with an adjuvant, and injected into a host animal. Antibodies produced in that animal can then be purified by peptide affinity chromatography. Commonly employed host animals include rabbits, mice, guinea pigs,

and rats. Various adjuvants that can be used to increase the immunological response depend on the host species and include Freund's adjuvant (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol. Useful human adjuvants include BCG (bacille Calmette-Guérin) and *Corynebacterium parvum*.

Polyclonal antibodies, heterogeneous populations of antibody molecules, are present in the sera of the immunized subjects. Monoclonal antibodies, homogeneous populations of antibodies to a particular antigen, can be prepared using standard hybridoma technology. See, e.g., Kohler et al (1975) *Nature* 256, 495, Kohler et al (1976) *Eur J Immunol* 6, 511, Kohler et al (1976) *Eur J Immunol* 6, 292, and Hammerling et al (1981) *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier, N.Y. In particular, monoclonal antibodies can be obtained by any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture such as described in U.S. Patent No. 4,376,110, the human B-cell hybridoma technique (Kosbor et al (1983) *Immunol Today* 4, 72; Cole et al (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 2026) and the EBV-hybridoma technique (Cole et al (1983) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Such antibodies can be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, and any subclass thereof. The hybridoma producing the monoclonal antibodies of the invention may be cultivated in vitro or in vivo. The ability to produce high titers of monoclonal antibodies in vivo makes it a particularly useful method of production.

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" can be used. See, e.g., Morrison et al (1984) *Proc. Natl Acad Sci USA* 81, 6851, Neuberger et al (1984) *Nature* 312, 604, and Takeda et al (1984) *Nature* 314, 452. A chimeric antibody is a molecule in which different portions are derived from different animal species, such as those having a variable region derived from a murine monoclonal antibody and a human immunoglobulin constant region. Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Patent Nos. 4,946,778 and 4,704,692) can be adapted to produce a phage library of single chain Fv antibodies. Single chain antibodies are formed by linking the heavy and light chain fragments of the

Fv region via an amino acid bridge. Moreover, antibody fragments can be generated by known techniques. For example, such fragments include, but are not limited to, F(ab')₂ fragments that can be produced by pepsin digestion of an antibody molecule, and Fab fragments that can be generated by reducing the disulfide bridges of F(ab')₂ fragments.

Antibodies can also be humanized by methods described in the examples below or known in the art. For example, monoclonal antibodies with a desired binding specificity can be commercially humanized (Scotgene, Scotland, and Oxford Molecular, Palo Alto, Calif.). Fully humanized antibodies, such as those expressed in transgenic animals are within the scope of the invention (see, e.g., Green et al. (1994) *Nature Genetics* 7, 13, and U.S. Patent Nos. 5,545,806 and 5,569,825).

Also within the scope of this invention is a method of inducing death of activated T cells, e.g., by contacting activated T cells with an antibody of the invention in vitro, and by administering to a subject in need thereof an effective amount of the antibody. Subjects to be treated can be identified as having or being at risk for having a condition related to an excessive or unwanted T cell-mediated immune response, e.g., patients suffering from autoimmune diseases, transplant rejection, allergic diseases, or T cell-derived cancers. This method can be performed alone or in conjunction with other drugs or therapy.

The term "treating" refers to administration of a composition to a subject with the purpose to cure, alleviate, relieve, remedy, prevent, or ameliorate a disorder, the symptom of the disorder, the disease state secondary to the disorder, or the predisposition toward the disorder. An "effective amount" is an amount of the composition that is capable of producing a medically desirable result in a treated subject.

Exemplary diseases to be treated include diabetes mellitus, arthritis (including rheumatoid arthritis, juvenile rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and psoriatic arthritis), multiple sclerosis, encephalomyelitis, myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus, autoimmune thyroiditis, dermatitis (including atopic dermatitis and eczematous dermatitis), psoriasis, Sjögren's Syndrome, Crohn's disease, aphthous ulcer, iritis, conjunctivitis, keratoconjunctivitis, type I diabetes, inflammatory bowel diseases, ulcerative colitis, asthma, allergic asthma, cutaneous lupus erythematosus, scleroderma, vaginitis, proctitis, drug eruptions, leprosy reversal reactions, erythema nodosum.

leprosum autoimmune uveitis, allergic encephalomyelitis acute necrotizing hemorrhagic encephalopathy idiopathic bilateral progressive sensorineural hearing loss, aplastic anemia, pure red cell anemia, idiopathic thrombocytopenia polychondritis, Wegener's granulomatosis, chronic active hepatitis, Stevens-Johnson syndrome, idiopathic sprue, lichen planus, Graves' disease, sarcoidosis, primary biliary cirrhosis, uveitis posterior, interstitial lung fibrosis, graft-versus-host disease, cases of transplantation (including transplantation using allogeneic or xenogeneic tissues) such as bone marrow transplantation, liver transplantation, or the transplantation of any organ or tissue, allergies such as atopic allergy, AIDS, and T cell neoplasms such as leukemias or lymphomas

In one in vivo approach a therapeutic composition (e.g., a composition containing an antibody of the invention) is administered to the subject. Generally the antibody is suspended in a pharmaceutically-acceptable carrier (e.g., physiological saline) and administered orally or by intravenous infusion, or injected or implanted subcutaneously, intramuscularly, intrathecally, intraperitoneally, intrarectally, intravaginally, intranasally, intragastrically, intratracheally or intrapulmonarily.

The dosage required depends on the choice of the route of administration, the nature of the formulation, the nature of the subject's illness, the subject's size, weight, surface area, age, and sex, other drugs being administered, and the judgment of the attending physician. Suitable dosages are in the range of 0.01-100.0 mg/kg. Variations in the needed dosage are to be expected in view of the variety of compositions available and the different efficiencies of various routes of administration. For example, oral administration would be expected to require higher dosages than administration by intravenous injection. Variations in these dosage levels can be adjusted using standard empirical routines for optimization as is well understood in the art. Encapsulation of the composition in a suitable delivery vehicle (e.g., polymeric microparticles or implantable devices) may increase the efficiency of delivery, particularly for oral delivery.

Also within the scope of this invention is a pharmaceutical composition that contains a pharmaceutically-acceptable carrier and an effective amount of an antibody of the invention. The pharmaceutical composition can be used to treat diseases described above. The pharmaceutically-acceptable carrier includes a solvent, a dispersion medium,

20

a coating, an antibacterial and antifungal agent, and an isotonic and absorption delaying agent

The pharmaceutical composition of the invention can be formulated into dosage forms for different administration routes utilizing conventional methods. For example, it can be formulated in a capsule, a gel seal, or a tablet for oral administration. Capsules can contain any standard pharmaceutically acceptable materials such as gelatin or cellulose. Tablets can be formulated in accordance with conventional procedures by compressing mixtures of the composition with a solid carrier and a lubricant. Examples of solid carriers include starch and sugar bentonite. The composition can also be administered in a form of a hard shell tablet or a capsule containing a binder, e.g., lactose or mannitol, a conventional filler, and a tableting agent. The pharmaceutical composition can be administered via the parenteral route. Examples of parenteral dosage forms include aqueous solutions, isotonic saline or 5% glucose of the active agent, or other well-known pharmaceutically-acceptable excipient. Cyclodextrins, or other solubilizing agents well known to those familiar with the art, can be utilized as pharmaceutical excipients for delivery of the therapeutic agent.

The efficacy of a composition of this invention can be evaluated both *in vitro* and *in vivo*. See, e.g., the examples below. Briefly, the composition can be tested for its ability to induce death of activated T cells *in vitro*. For *in vivo* studies, the composition can be injected into an animal (e.g., a mouse model) and its therapeutic effects are then accessed. Based on the results, an appropriate dosage range and administration route can be determined.

The specific examples below are to be construed as merely illustrative, and not limitative of the remainder of the disclosure in any way whatsoever. Without further elaboration, it is believed that one skilled in the art can, based on the description herein, utilize the present invention to its fullest extent. All publications recited herein are hereby incorporated by reference in their entirety.

30

2005/110475

EXAMPLE 1 Mouse Monoclonal Antibodies 15A7, 43B6, and 9F9

Generation of anti-PSGL-1 antibodies

Standard techniques were used to generate mouse monoclonal antibodies that specifically bound to human PSGL-1 (hCD162). More specifically, mice were immunized with membrane fraction of PHA-activated human T cells and sacrificed to generate hybridoma cell lines. Supernatants from resultant hybridoma cell lines were screened for binding to CHO cells that stably expressed hCD162. Those lines producing antibodies that bound to hCD162-expressing CHO cells, but not the parental CHO cells were identified, subcloned and further analyzed as described below.

Among the lines identified were m152-15A7, m166-43B6 and m128-9F9. They produced IgG1 antibodies 15A7, 43B6 and 9F9, respectively. Immunoblotting assay showed that these three antibodies pulled down from lysate of activated T-cells a protein that could be detected by anti-hCD162 antibody (kpl-1, PharMingen, San Diego, CA).

The just-described three antibodies were tested for their abilities to induce apoptosis of activated T cells. Culture supernatants containing monoclonal antibodies secreted by the three hybridoma cell lines were respectively incubated with either non-activated human T cells (Day 0) or in vitro activated human T cells (Day 7) for 6 hours. The cells were then stained with annexin V and subjected to FACS analysis. CD3-positive cells were gated to ensure counting of either in vitro activated human T cells or resting human T cells. The apoptotic cells were annexin V staining-positive. Table 1 summarizes the percentage of apoptotic T cells among all of the T cells scanned.

Table 1 Percentage of apoptotic T cells

	Untreated	Anti-myc	m128-9F9	Untreated	Anti-myc	m152-15A7	M166-43B6
Day 0	4.17	6.67	5.82	18.18	15.52	5.23	6.57
Day 7	12.63	13.36	28.71	24.18	23.08	51.66	49.44

These results indicate that mouse 15A7, 43B6, and 9F9 antibodies (1) are hCD162-specific and (2) can bind to human activated T cells and induce apoptosis of activated T cells, but not resting human T cells.

21

Apoptosis assay was also conducted on PHA-activated human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). It was found that the antibodies only induced apoptosis in activated T cells, but not in resting T cells, B cells, or in neutrophils.

It is known that T cell-depleting antibodies, such as anti-CD3, are able to induce production of soluble factors. Therapy using such antibodies usually results in a deleterious cytokine syndrome. To test if anti-PSGL-1 antibody also caused cytokine-associated side effects, freshly isolated human PBMC were cultured with 15A7 for 24, 48, or 72 hours. The levels of cytokines in the supernatant were then determined. Considerable amounts of IL-2, TNF α , and IFN- γ were produced in PHA-activated PBMC (positive control), while levels of these cytokines from 15A7-treated cells were not detectable. These results supported that anti-PSGL-1 has no or little effect on resting peripheral blood cells, in both aspects of apoptotic induction and cell activation.

Since the above-described antibodies selectively induce apoptosis of activated T cells without causing adverse effects on resting T or other immune cells, administration of them to a subject is unlikely to result in lymphopenia or broad immunodeficiency like anti-CD3 or immunosuppressant does.

Epitope mapping of anti-CD162 antibodies

To map the binding epitopes of mouse 15A7, 43B6, and 9F9 on human CD162, a series of fusion proteins covering various regions of human CD162 were expressed and purified. Interactions between the fusion proteins and these monoclonal antibodies were examined by Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Briefly, fragments covering various regions of human CD162 gene were expressed as fusion proteins with human immunoglobulin gamma 1 heavy chain constant region in *E. coli*. cDNA encoding the human immunoglobulin gamma 1 heavy chain constant region was amplified by PCR with primers having a *Bgl*III site and a *Bam*HI site. The PCR product was cut by *Bgl*III and *Bam*HI, and subcloned into a pET-32a vector (Novagen) that had been digested by the same enzymes. Then, cDNAs encoding various regions of hCD162 were amplified by PCR with primers having an *Nde*I site at the 5' end and a *Bgl*III site at the 3' end. The PCR products were cut by the corresponding enzymes and in frame fused to the sequence encoding the human immunoglobulin gamma 1 heavy

chain constant region in the pET-32a vector. Primers used in each construction are listed in Table 2 and the sequences of the primers are listed in Table 3.

Table 2 Names of primers used in each experiment.

For amplifying sequences encoding:	Forward primer	Reverse primer
E. coli expressed hCD162 fragments		
42-119	AB1001	AB1005
42-80	AB1001	AB1008
61-99	AB1003	AB1009
81-119	Ab1004	AB1005
42-70	AB1001	AB1007
42-60	AB1001	AB1006
50-80	AB1002	AB1008
50-70	AB1002	Ab1007
42-319	AB1001	Ab1010
115-126	AB1022	AB1023
115-126EtoR	AB1024	AB1025
V region of cDNAs		
Light chain	AB1058	AB1059
Heavy chain	AB1058	AB1060
Mammalian expressed hCD162 fragments		
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
Chimeric chains		
15A7 light chain	AB1030	AB1031
15A7 heavy chain	AB1032	AB1033
9F9 light chain	AB1026	AB1027
9F9 heavy chain	AB1028	AB1029
43B6 light chain	AB1034	AB1035
43B6 heavy chain	Ab1036	AB1037
Humanized chains		
15A7 light chain	AB1048	AB1057
15A7 light chain 1st pair	AB1049	AB1050
15A7 light chain 2nd pair	AB1051	AB1052
15A7 light chain 3rd pair	AB1053	AB1054
15A7 light chain 4th pair	AB1055	Ab1056
15A7 heavy chain	AB1038	AB1047
15A7 heavy chain 1st pair	AB1039	AB1040
15A7 heavy chain 2nd pair	AB1041	AB1042

22

15A7 heavy chain 3rd pair	AB1043	AB1044
15A7 heavy chain 4th pair	AB1045	AB1046

Table 3 Primer sequences

Name	Sequence
AB1001	ccccgggacCATATGcaggccaccgaatatgagtacc
AB1002	tatgagCATATGgattatgatttcctgccagaaacgg
AB1003	aaacggagCATATGgaaatgctgaggaacagcactgacacc
AB1004	aaccctCATATGaccactgtggagcctgctgcaaggcg
AB1005	gtggtcAGATCTtccatagctgctgaatccgtggacagg
AB1006	GTTCCTCAGATCTTCTGGAGGCTCCGTTTCTGGCAGG
AB1007	AGGCCCAAGATCTGGAGTGGTGTCACTGCTGTTCTC
AB1008	ggctccAGATCTgtagactcaggggttccaggccc
AB1009	gtggtcAGATCTgtgactgcccctcctgcatccaggcc
AB1010	GCCAGCAGATCTTGCTTCACAGAGATGTGGTCTGGGG
AB1011	cgcggtccatgcctctgcaactcctcctgttgc
AB1012	GCCAGCCTCGAGCTTCACAGAGATGTGGTCTGGGG
AB1013	GGTCTGctcgagCATAGCTGCTGAATCCGTGGACAGOTTC
AB1058	agacaggccaccgaagggaacctgtccacg
AB1059	cgtggacagggttcccttcggtggcctgtct
AB1014	ccgctcgagcgccaagattaggatggc
AB1015	cgggatccactcaaaccacagccatgg
AB1016	ccgctcgagtggtagtaggttccatgg
AB1017	cgggatcaactcaaccacaggcctg
AB1018	ctgtgcctcgagggctgtggtttgagt
AB1019	cgggatccatggagatacagaccactcaac
AB1020	cgggatccgatgcaggaggggcagtcac
AB1021	ggccgtcactcgagtgtgtgtgctc
AB1022	TatgGATTTCAGCAGCTATGGAGATACAGACCACTCAACCagca
AB1023	GATCTgcTGGTTGAGTGGTCTGTATCTCCATAGCTGCTGAATCCA
AB1024	TatgGATTTCAGCAGCTATGCGGATACAGACCACTCAACCagca
AB1025	GATCTgcTGGTTGAGTGGTCTGTATCCGCATAGCTGCTGAATCCA
AB1026	CTAGTCTAGATGACCCAACTCCACTCTCCC
AB1027	CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTAGCATCAGCCCCTTTGATTTC
AB1028	TAACATtctagATGCTGTGGGGCTGAAGTGGG
AB1029	GGATAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACCGTGG
AB1030	CTAGTCTAGATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGG
AB1031	CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTTTCCAGCTTGGTCCCCCTCC
AB1032	CTAGTCTAGATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCC
AB1033	CTAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACTGAGGttcc
AB1034	CTAGTCTAGATGGATTTTCTGGTGACAGATTTTCAGC
AB1035	CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTAGCATCAGCCCCTTTAGCTCC
AB1036	CTAGTCTAGATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTC
AB1037	CTAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACAGCTTCCAGTGGATAGACTGATGG
AB1038	TCTATCTAGATGAACCTTCGGGTCCAGCTTGATTTTCTTGTCTTGTTTTAAAGGTGTCCAGTG
AB1039	CCTTGTTTTAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGACGCTGG
AB1040	CTGAAAGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAAGCTTCCTCCAGGCTGCACTAAGCCTCC
AB1041	GCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCTCGAG

AB1042	GCATAGAAGATGGTACTACTGCCACCATTAATGTATGCGACCCACTCGAGTCCCTTCCCTGGAGCC
AB1043	GTAGTACCATCTTCTATGCAAACGCGAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGATAATGCC
AB1044	CCTCAGCCCTCAGAGAATTCATTTGCAGGTACAGGGTGTCTTGGCATTATCTCTGGAGATGG
AB1045	GAATTCTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGATATGCTAGTTACGGAGG
AB1046	CTGTGACCAGGGTGCCCTTGGCCCCAATAGTCCATAGCACCCCTCCGTAACTAGCATATC
AB1047	ACCCTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACTGTGACCAGGGTGCCCTTGGCC
AB1048	TCTATCTAGATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGC
AB1049	GCTGCTCTGGGTTCCAGGCTCCACTGGTGACATTTCAGATGACCCAATCTCCGAGCTCTTTG
AB1050	GATCTGCAGGTGATAGTGACCCTATCCCTACAGACGCAGACAAAGAGCTCGGAGATTGG
AB1051	CACATACCTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAATGATGGAAACACCTATTTTGAATG
AB1052	GATGAGAAGCTTGGGTGCCCTTTCCTGGTTTCTGTTGGTACCATTCAAAATAAGTGTTC
AB1053	GCACCCAAGCTTCTCATCTATAAAGTTTCCAATCGATTTTCTGGTGTCCCATCCAGGTTTAGTGGC
AB1054	GCAGAGAAGAGATGGTGAGGGTGAAGTGTGTCCCAGACCCACTGCCACTAAACCTGGATGG
AB1055	CTCACCATCTCTTCTCTGCAGCCGGAGGATTTGCAACCTATTACTGTTTTCAAG
AB1056	CCTTGGTGCCCTTGACCGAACGTGAGAGGAACATATGAACCTTGAAAACAGTAATAGG
AB1057	ACCCTCTAGAATTAGGAAAGTGCACCTTACGTTTGATTTCACCTTGGTGCCCTTGACCG
AB1058	TATATCTAGAATTCCCCCCCCCCCCCCCC
AB1059	TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAGATGGATACAGTTGGTGC
AB1060	TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGAC (C/A/T) GATGGGG (C/G) TGT (C/T) GTTTTGGC

The above-described expression constructs were transformed into *Escherichia coli* strain BL21 (DE3). The transformed cells were harvested after 6 hours of IPTG (2 mM) induction and resuspended in PBS. After the cells were sonicated and spun down at 14,000g for 10 minutes, the resultant supernatants were collected for purification of the fusion proteins. More specifically, the supernatants were first incubated with protein G or protein A beads for 3 hours at 4°C. The beads were then spun down at 3,000g and washed with washing buffer I (0.05% Triton X-100, 50mM Tris-HCl pH 8.5, 400 mM NaCl, 1mM CaCl₂ and 1mg/ml OVA) and washing buffer II (0.05% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5 and 150 mM of NaCl) for 5 times each. Bound proteins were then eluted with an elution buffer containing 0.1M of glycine-HCl, pH 2.7 and neutralized with 1 M Tris-HCl, pH 8.6. All purified fusion proteins were quantified by Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Cat No. 500-0006) and verified by SDS-PAGE.

A sandwich ELISA was conducted to study the interaction between the hCD162 fragments and each of 15A7, 9F9, and 43B6. 96-well microtiter plates were coated with goat anti-human IgG (Southern Biotechnology Cat No. 2040-01) antibody (2 µg/ml, 50 µl/well) overnight at 4°C. Plates were blocked by incubation with 0.25% of BSA in PBS (150 µl/well) for 1 hour at 37°C. The blocked plates were then incubated with

23

fusion proteins containing various fragments of human CD162 (2 µg/ml) for 2 hours at room temperature. After washing 4 times with PBS containing 0.05% of Tween 20 (PBST), the plates were incubated with testing antibodies (2 µg/ml) for 1.5 hours at room temperature. After incubation, the plates were washed 4 times with PBST. 50 µl of 1 to 3000 diluted goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase (Southern Biotechnology, Cat No 1031-04) was then added to each well and the plates were incubated for 1 hour at 37°C. Enzyme reaction was carried out by adding 50 µl of an alkaline phosphatase substrate solution (1 alkaline phosphatase substrate tablet dissolved in 5 ml of substrate buffer containing 0.012 M of Na₂CO₃, 0.16 M of NaHCO₃ and 1 mM of MgCl₂ at pH 8.6), and absorbance at 405 nm was determined.

It was found that 43B6 and 9F9 were able to interact with all fusion proteins containing residues 50 to 60 of mature human CD162, indicating that epitopes of 43B6 and 9F9 were located between residues 50-60. Unlike 9F9 and 43B6, 15A7 only bound to the fusion protein covering residues 42 to 319, but not the fusion protein covering residues 42-119, indicating that the epitope of 15A7 was located between residues 119 to 319. The location of the epitope of 15A7 was then narrowed down to between residues 115 to 126. Change of one amino acid at position 120 (Glu → Arg) diminished interaction between 15A7 and the fusion protein, indicating that the primary contacting domain of 15A7 on human CD162 is located at or adjacent to position 120, and the residue Glu is essential for the interaction.

Fusion proteins covering various human CD162 regions were also expressed in mammalian cells and were tested for their interaction with 15A7. Fragments covering these regions were expressed as fusion proteins with human immunoglobulin gamma 1 heavy chain constant region in mammalian cells. First, the cDNA encoding human immunoglobulin gamma 1 heavy chain constant region was inserted into a pcDNA3 vector (Invitrogen). Second, cDNAs encoding various regions of hCD162 were amplified by PCR with primers introducing a *Bam*HI site at the 5' end and an *Xho*I site at the 3' end. These PCR products were cut by the corresponding enzymes and subcloned into the human immunoglobulin gamma 1 heavy chain constant region-containing pcDNA3 vector. The name and sequence for each primer are listed in Tables 2 and 3 above.

The just-described mammalian expression vectors were transiently transfected into COS-7 cells by Lipofectamine 2000 (Invitrogen Cat No 11668 027) following manufacturer's guide. The transfected cells were grown in ultra low-Ig medium (Invitrogen, Cat No 16250-078). The expressed proteins were purified and subjected to Sandwich ELISA in the same manner described above.

The ELISA results show that only the fusion proteins containing residues 94 to 148 were able to interact with 15A7. These results are consistent with the idea that the epitope of 15A7 is located between residues 115 to 126.

All of the above results indicate that the epitopes of 9F9, 43B6 and 15A7 are protein-dependent, instead of carbohydrate modification-dependent, since all three antibodies bind bacterially expressed fusion proteins. They also indicate that, although 15A7, 9F9, and 43B6 show similar properties in term of binding specificity and function of inducing apoptosis in activated T cells, they function through different domains of human CD162 and behave differently.

EXAMPLE 2 Chimeric Antibodies 15A7, 43B6, and 9F9

Cloning of light and heavy chain variable regions of anti-CD162 antibodies

cDNAs encoding the light and heavy chain variable regions (V_L and V_H) of antibodies 15A7, 43B6 and 9F9 were amplified by an anchored PCR method. The 3 primers hybridized to the C regions and the 5' primers hybridized to G tails attached to the cDNA using terminal deoxytransferase. The PCR fragments were cloned into a pCRII vector (Invitrogen). Several independent clones for each chain were sequenced and compared. A sequence represented by the majority of the independent clones was picked. The translated amino acid sequence was then analyzed to confirm that the chosen sequence possessed the characteristics of typical mouse light or heavy chain V region, and belonged to a specific subtype. The complementarity determining regions (CDRs) were then identified by comparing the translated amino acid sequences with consensus sequence of each subtype. The name and sequence for each primer used are listed in Tables 2 and 3 above. The deduced amino acid sequences of the light and heavy chain V regions of 15A7, 43B6 and 9F9 (SEQ ID NOs 19-24) are shown in Summary.

Chimeric Antibodies

SM

To generate vectors for expressing chimeric antibodies, cDNAs encoding the V_L and V_H regions of 15A7, 43B6, and 9F9 were amplified by PCR using primers to include the 5' signal peptide sequence and the 3' splice donor signal. The primers also introduced *Xba*I sites at both ends of the PCR products, which were then cut by *Xba*I enzyme and ligated into *Xba*I-digested pVk, pVg1, pVg2, or pVg4 vector. More specifically, the V_L region cDNAs of 15A7, 43B6 and 9F9 were subcloned into the plasmid pVk. This plasmid contained a CMV promoter, and a sequence encoding the human light chain constant region. The V_H region cDNAs of 15A7, 43B6 and 9F9 were subcloned into plasmids pVg1, pVg2, or pVg4. Each of the three plasmids had a CMV promoter. They also contained, respectively, the human heavy chain constant regions of IgG1, IgG2, and IgG4.

Each of the above-described light chain encoding plasmids was co-transfected with a heavy chain-encoding plasmid into COS-7 cells. The supernatants of the transfected cells were collected. Chimeric antibodies in the supernatants were analyzed for the ability to bind to human CD162 and to induce apoptosis of activated T cells.

It was found that all chimeric antibodies made from 15A7, 43B6, and 9F9 bound to Sp2/0 transfectants stably expressing human CD162, but not to parental Sp2/0 cells, indicating that they retained the human CD162-binding ability specificity. Furthermore, it was found that the chimeric antibodies induced apoptosis in T cells that had been activated for 7 days, indicating that they retained this function of their mouse counterparts as well.

Humanized Antibodies

Mouse 15A7 was used to make humanized antibodies by grafting its CDRs onto a human framework. To retain binding affinity and specificity, it is essential to conserve the V region conformation when grafting the CDRs onto the human framework. To select a proper framework donor, the amino acid sequences of mouse 15A7 light and heavy chain V regions were compared with those of 50 mouse antibodies that had been humanized.

It was found that a mouse antibody, mDREG-55, had high sequence homology to mouse 15A7 V region in both light and heavy chains. Listed below is a sequence alignment of mouse 15A7 against this mDREG-55 antibody (CDRs are highlighted).

Light chain alignment:

WREG 55 DIVLTQSPASLSVSLGERASISCSGSGTFTFTLNINPVEEEDAAATYYCQGGTKLEIK
 DI++TQ+P SL VELG++ASISC++SQS+ + DG++Y WY QKFGQ PKLLIY SN 8
 S m15A7 DILMTQTPLSLPSVLGDQASISCSGSGTFTFTLNINPVEEEDAAATYYCQGGTKLEIK
 WREG 55 GIPARFSGSGSGTFTFTLNINPVEEEDAAATYYCQGGTKLEIK
 G+P RPSGSGSGT FTLM I VE ED YYC Q + P TF GGTKLE+K
 m15A7 GVFDLPFGSGSGTFTFTLNINPVEEEDAAATYYCQGGTKLEIK

Heavy chain alignment

15 m15A7 mOREG-55

Mouse DREG-55 is a monoclonal IgG1 antibody against L-selectin. The sequences of mouse 15A7 V_L and V_H regions were respectively 64.3% (framework only 73.8%) and 70% (framework only 81.6%) homologous to those of mouse DREG55. Humanized DREG-55 (HuDREG-55) had been constructed using framework sequences of V_L and V_H regions from a human antibody Gal. Therefore, to humanize mouse 15A7, the framework sequences of human Gal light and heavy chains were used to replace the counter parts of mouse 15A7.

The humanized 15A7 light and heavy variable regions were each assembled by 4 pairs of synthetic oligonucleotides (~ 80 bases in length). The oligonucleotides of each pair were overlapped by around 20 nucleotides. Nucleotide sequences were selected and synthesized to encode the protein sequences of the humanized variable regions including signal peptides. The assembling and amplification of the genes were conducted in four steps: (1) the four pairs of complementary oligonucleotides were annealed and extended with Klenow fragment in 4 separate reactions, (2) the resulting 4 dsDNA fragments were mixed pair wise, denatured, reannealed, and extended in two separate reactions, (3) the resulting two dsDNA fragments were mixed, denatured, reannealed, and extended to create the final full-length dsDNA, and (4) the resulting DNA was amplified by PCR.

with primers to introduce an *Xba*I site at both ends. The PCR fragment was then cut by *Xba*I and inserted into the respective *Xba*I-digested pVk and pVg4 vectors. Then, at positions where the interactions between CDR and the framework were considered important, the Gal's residues were changed back into those of the mouse 15A7 (i.e., I62V and D74H). Listed below are alignments of mouse 15A7 and humanized 15A7 (Hu15A7) against mDREG-55, in which V62 and H74 are underlined.

Light chain alignment:

hDREG-55	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYFDGDSYIMNYQQKPGKAPKLLIYAASNLEES
mouse 15A7	DILMTQTPLSLPVSLGDQASISCSQSTIVHNOGNTYFEWYQKPGQSPKLLIYKVSNNRFS
Hu15A7	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSTIVHNOGNTYFEWYQKPGKAPKLLIYKVSNNRFS
hDREG-55	GIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSNEDPMTFGQGTKVEIK
m15A7	GVPRFSGSGSGTHFTLNISRVEAEDLGIYYCFQGSYVELDPGAGTKLELK
Hu15A7	GVPSRFSGSGSGTHFTLTISSLQPEDFATYYCQGSYVELDPGQGTKVEIK

Heavy chain alignment

hDREG-55	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSTYAMSWVRQAPGKGLEWVASISTGGSTFYYPDEVKG
m15A7	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSTPQMHWVRQAPKGLEWVAITNGGSSTIFTYANAVKG
Hu15A7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSTPQMHWVRQAPGKLEWVAITNGGSSTIFTYANAVKG
hDREG-55	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFDYIDGYFDYWGQGLTVTVSS
m15A7	RFTISRDNPKNTLPQMILRSEDTAIYYCGRYASYGGQAMDYWGQTSVTVSS
Hu15A7	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFASYGGQAMDYWGQTSVTVSS

Plasmids thus obtained encoded humanized 15A7 heavy and light chains. These plasmids were then co-transfected into COS-7 cells. The exhausted supernatants from cultured cells were then collected. Humanized 15A7 in the supernatants was tested for its ability to bind to CHO transfectants stably expressing hCD162 and to induce apoptosis in the T cells activated for 7 days. The results show that it retains these abilities.

Preparation of Chimeric and Humanized Antibodies

Cells producing humanized and chimeric antibodies were generated. More specifically, Sp2/0 cells (Sp2/0-Ag14, ATCC CRL 1581) were stably transfected with the appropriate plasmids by electroporation using a Gene Pulser apparatus (Bio-Rad Laboratories) at 360 V and 25 μ F capacitance according to the manufacturer's instructions. Before transfection, the plasmids were linearized by digesting with *Bam*HI enzyme. All transfections were performed using 10^7 cells in PBS and 20 μ g each of

plasmid DNA. The cells from each transfection were plated into two 96-well tissue culture plates. After 48 hours, a selective medium (DMEM10% FBS/hypoxanthine/thymidine media supplement) and 1 µg/ml mycophenolic acid was applied. Antibody-producing cells were screened and isolated by examining the presence of antibody in the culture supernatant by ELISA.

Isolated cells were cultured in serum-free or low-Ig medium and the cultured supernatant was collected. Antibodies were purified by passage over a column of staphylococcal protein A-Sepharose CL-4B. After washing 5 times each with washing buffer I (0.05% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH 8.5, 400 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ and 1 mg/ml OVA) and washing buffer II (0.05% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 8.5 and 150 mM of NaCl) the bound antibodies were eluted with an elution buffer containing 0.1 M of glycine-HCl, pH 2.7, and neutralized with 1 M Tris-HCl, pH 8.6.

Affinity measurements

Binding affinities of the above-described mouse, chimeric and humanized 15A7 antibodies were determined by competitive binding.

Mouse 15A7 was biotinylated by an EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin system (Pierce Biotechnology Cat No 21217). Briefly 0.5 mg (3.3×10^{-4} nmoles) of mouse 15A7 was dissolved in 187 µl of PBS and mixed with 6.8×10^{-5} nmoles of Sulfo NHS-Biotin. The mixture was then incubated on ice for 2 hours before free biotins were removed by dialyzing at 4°C overnight against PBS. The Biotin-labeled mouse 15A7 thus obtained was stored at 4°C until use.

Sp2/0 transfectants stably expressing human CD162 were used as source of human CD162 antigen. Biotin-labeled mouse 15A7 was used as tracer. Increasing amounts of competitor antibodies (mouse, chimeric, or humanized 15A7) were mixed with 35 ng of Biotin-labeled mouse 15A7 and incubated with 1×10^5 CD162-expressing Sp2/0 cells for 1.5 hours at 4°C with constant shaking. After washing, secondary antibody Streptavidin-PE (Becton Dickinson Immunocytometry System Inc Cat No 349023) was added to the mixture. After incubating for 45 minutes at 4°C the cells were washed again, resuspended in 300 µl of PBS-1% of FBS, and subjected to FACS analysis.

28

It was found that the half-maximum competing concentration of mouse 15A7 was 3.72 $\mu\text{g/ml}$ while those of chimeric and humanized 15A7 were around 5.71 $\mu\text{g/ml}$ and 4.51 $\mu\text{g/ml}$, respectively. These results indicate that the affinities of mouse, chimeric, and humanized 15A7 are comparable. In other words, the binding affinity (K_a) for mouse 15A7 is $4.03 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ while those for chimeric and humanized 15A7 are $2.62 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ and $3.33 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, respectively.

Competition analysis

Competition analysis was conducted to study interaction among the above-described three mouse antibodies, PSGL-1, and P-selectin.

P-selectin is a major high-affinity ligand for PSGL-1 on most leukocytes. In order to investigate whether the three antibodies prevent binding of P-selectin to PSGL-1, binding of purified human P-selectin to activated T cells was measured in the presence of the three antibodies. KPL-1, known to block interaction of P-selectin and PSGL-1, was used as a positive control.

Human PBMC were activated with 1% PHA for 2 days and maintained in IL-2-containing medium for 3 days. The cells were incubated with titrated 9F9, 15A7, 43B6, KPL-1 (an PSGL-1 antagonist), or a control antibody (9E10) for 30 minutes, followed by the addition of recombinant human P-selectin (1.25 $\mu\text{g/ml}$). Binding of P-selectin to activated T cells was measured by anti-P-selectin-FITC analyzed on FACS.

Consistent with previous reports, KPL-1 almost completely abolished P-selectin's binding to activate T cells at a low concentration (0.31 $\mu\text{g/ml}$). 43B6 blocked binding of P-selectin to activated T cells as effectively as KPL-1 did, whereas a higher concentration of 9F9 was required to achieve the same effect. Indeed, 0.08 $\mu\text{g/ml}$ KPL or 43B6 was needed to abolish 50% of the binding. In contrast, 5 $\mu\text{g/ml}$ 9F9 was required. Moreover, 15A7 did not have any inhibitory effect on P-selectin binding even at 20 $\mu\text{g/ml}$. Surprisingly, it enhanced binding of P-selectin to PSGL-1. These results indicate that 15A7 and P-selectin bind to different motifs of PSGL-1 on activated T cells.

The fact that 15A7 did not compete with P-selectin for PSGL-1 indicates that in vivo administration of 15A7 is not supposed to affect innate immunity by interfering P-selectin-dependent recruitment of leukocytes.

It has been reported that PSGL-1 is expressed at low levels on platelets. The effects of 15A7 antibodies on platelets were examined. It was found that the antibodies did not enhance or inhibit aggregation of human platelets.

2A

EXAMPLE 3 Hamster Monoclonal Antibody TAB4 against mouse PSGL-1

A monoclonal antibody against mouse PSGL-1, TAB4, was prepared in the manner similar to the method described in Example 1. It induced T cell apoptosis in vitro and depleted T cells in vivo. To determine if it interfered with binding between mouse
5 PSGL-1 and mouse P-selectin, competition analysis was performed in the manner similar to the method described in Example 2. It was found that TAB4 did not inhibit mouse P-selectin binding to mouse PSGL-1 even at a concentration as high as 20 µg/ml.

**EXAMPLE 4 Mouse Monoclonal Antibodies 4B7, 5C4, 12E7, 14B3, 17E5, and
10 18D12**

Additional monoclonal antibodies against human PSGL-1, 4B7, 5C4, 12E7, 14B3, 17E5, and 18D12, were characterized. Upon binding to an activated T cell, they all induced death of the activated T cells. Competition analysis was conducted in the manner described in Example 2 to determine if they blocked interaction between PSGL-1
15 and P-selectin. It was found that these antibodies have little, if any, inhibitory effect on human P-selectin binding to human PSGL-1, even at the highest concentration tested (5 µg/ml).

OTHER EMBODIMENTS

All of the features disclosed in this specification may be combined in any
20 combination. Each feature disclosed in this specification may be replaced by an alternative feature serving the same, equivalent, or similar purpose. Thus, unless expressly stated otherwise, each feature disclosed is only an example of a generic series of equivalent or similar features.

From the above description, one skilled in the art can easily ascertain the essential
25 characteristics of the present invention, and without departing from the spirit and scope thereof, can make various changes and modifications of the invention to adapt it to various usages and conditions. Thus, other embodiments are also within the scope of the invention.

WHAT IS CLAIMED IS

- 1 An immunoglobulin chain comprising, respectively, 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, or SEQ ID NOs 16-18
- 2 The immunoglobulin chain of claim 1 wherein the immunoglobulin chain contains SEQ ID NOs 1-3 or SEQ ID NOs 4-6
- 3 The immunoglobulin chain of claim 1, wherein the immunoglobulin chain contains SEQ ID NO 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, or 26
- 4 The immunoglobulin chain of claim 3 wherein the immunoglobulin chain contains SEQ ID NO 25 or 26
- 5 An antibody comprising a first immunoglobulin chain of claim 1 and a second immunoglobulin chain also of claim 1 wherein the first chain, which is a light chain and the second chain which is a heavy chain contain respectively SEQ ID NOs 1-3 and SEQ ID NOs 4-6 SEQ ID NOs 7-9 and SEQ ID NOs 10-12 or SEQ ID NOs 13-15 and SEQ ID NOs 16-18
- 6 The antibody of claim 5, wherein the light chain and the heavy chain contain respectively SEQ ID NOs 1-3 and SEQ ID NOs 4-6
- 7 The antibody of claim 5, wherein the light chain and the heavy chain contain, respectively, SEQ ID NOs 19 and 20, 21 and 22, 23 and 24, or 25 and 26
- 8 The antibody of claim 7, wherein the light chain and the heavy chain contain, respectively SEQ ID NOs 25 and 26

9 An antibody that binds specifically to P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 without interfering with binding between P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 and P-Selectin, wherein the antibody, upon binding to P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 on an activated T-cell, induces the death of the activated T-cell

10 The antibody of claim 9, wherein the antibody binds to human P-Selectin Glycoprotein Ligand 1

11 The antibody of claim 9, wherein the antibody includes a light chain and a heavy chain containing, respectively, SEQ ID NOs 1-3 and SEQ ID NOs 4-6

12 The antibody of claim 10, wherein the light chain and the heavy chain contain, respectively, SEQ ID NOs 25 and 26

13 An antibody that binds specifically to amino acid residues 115-126 of human P-Selectin Glycoprotein Ligand 1

14 The antibody of claim 13, wherein the antibody binds specifically to amino acid residues 117-123

15 The antibody of claim 14, wherein the antibody binds specifically to amino acid residues 119-121

16 The antibody of claim 13, wherein the antibody includes a light chain and a heavy chain containing, respectively, SEQ ID NOs 1-3 and SEQ ID NOs 4-6

17 The antibody of claim 13, wherein the antibody, upon binding to P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 on an activated T-cell, induces the death of the activated T-cell

18 The antibody of claim 17, wherein the light chain and the heavy chain contain, respectively, SEQ ID NOs 1-3 and SEQ ID NOs 4-6

19 A method of inducing death of an activated T-cell comprising contacting an antibody of claim 8 with an activated T cell, wherein binding of the antibody to the activated T cell induces death of the activated T cell

20 A method of inducing death of an activated T-cell, comprising contacting an antibody of claim 9 with an activated T cell, wherein binding of the antibody to the activated T cell induces death of the activated T cell

21 A method of inducing death of an activated T-cell, comprising contacting an antibody of claim 13 with an activated T cell wherein binding of the antibody to the activated T cell induces death of the activated T cell

22 A method of modulating a T cell-mediated immune response in a subject, the method comprising

identifying a subject having or being at risk of having a condition related to an excessive T cell-mediated immune response, and

administering to the subject an effective amount of an antibody of claim 8

23 The method of claim 22 wherein the condition is an inflammatory disease, an autoimmune disease, an allergic disease, or a T cell cancer

24 The method of claim 23 wherein the subject has received or is contemplated to receive an allogeneic or xenogeneic transplant

29

25 A method of modulating a T cell-mediated immune response in a subject, the method comprising

identifying a subject having or being at risk of having a condition related to an excessive T cell-mediated immune response, and

administering to the subject an effective amount of an antibody of claim 9

26 The method of claim 25, wherein the condition is an inflammatory disease, an autoimmune disease, an allergic disease, or a T cell cancer

27 The method of claim 26, wherein the subject has received or is contemplated to receive an allogeneic or xenogeneic transplant

28 A method of modulating a T cell-mediated immune response in a subject, the method comprising

identifying a subject having or being at risk of having a condition related to an excessive T cell-mediated immune response, and

administering to the subject an effective amount of an antibody of claim 13

29 The method of claim 28, wherein the condition is an inflammatory disease, an autoimmune disease, an allergic disease, or a T cell cancer

30 The method of claim 29, wherein the subject has received or is contemplated to receive an allogeneic or xenogeneic transplant

31 An isolated nucleic acid comprising a sequence encoding the immunoglobulin chain of claim 1

32 An isolated nucleic acid comprising a sequence encoding the immunoglobulin chain of claim 3

33 A vector comprising the nucleic acid of claim 31

34 A vector comprising the nucleic acid of claim 32

35 A host cell comprising a nucleic acid encoding 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 or SEQ ID NOs 16-18

36 The host cell of claim 35, wherein the cell is a bacterial cell, a yeast cell, a plant cell, an insect cell, or a mammalian cell

37 The host cell of claim 36, wherein the mammalian cell is a hybridoma cell

38 A host cell comprising a nucleic acid encoding SEQ ID NO 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 or 26

39 The host cell of claim 38, wherein the cell is a bacterial cell, a yeast cell, a plant cell, an insect cell, or a mammalian cell

40 The host cell of claim 39 wherein the mammalian cell is a hybridoma cell

ANTICUERPOS

APLICACIONES RELACIONADAS

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

Células-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 alérgicas cánceres derivados de células T En consecuencia el control de las células-T agresivas es crítico en el tratamiento de tales desordenes La actividad de estas células puede ser contenida por inmunosupresión o por inducción de tolerancia inmunológica Una solución alternativa es la inducción de apoptosis, al cual se cree está involucrada en la remoción de células no deseadas incluyendo las células-T super agresivas Ver por ejemplo Kabelitz et al (1993) Immunol Today 14 338-340 and Raff (1992) Nature 356, 397-399

RESUMEN

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

En un aspecto, la invención muestra una cadena de inmunoglobulina que tiene tres secuencias que (i) contienen, respectivamente RSSQSI VHNDGNTYFE

KVSNRFS, y FQGSYVPLT (SEQ ID NOs 1-3) (ii) contienen respectivamente SFGMH YINGGSSTIFYANAVKG y YASYGGGAMDY (SEQ ID NOs 4-6) (iii) contienen respectivamente RASSTVNSTYLH, 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 FQGSHPWT (SEQ ID NOs 13-15) o (vi) contiene, respectivamente, TNAMNWVRQAPGKGLE, TYYADSVKD, y GGSYWYFDV (SEQ ID NOs 16-18)

Cada uno de los seis grupos de secuencias antes descritos corresponden a las tres regiones determinantes complementarias de 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 están las regiones variable (V) de cadena liviana y pesada de estos tres anticuerpos (SEQ ID Nos 19-26 las CDRs están subrayadas y destacadas)

SEQ ID NO 19 (Región V de cadena liviana de ratón 15A7)

1ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCA
GCAGTGAT

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

61ATTTTGATGACCCAACTCCACTGTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAA
GCCTCAATA

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

121TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAATGATGGAAACACCTATTTT
GAATGGTAC

41 S C R S S Q S I V H N D G N T Y F E W Y

181CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAACTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAT
CGATTTTCT

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

241GGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACACATTTACAC
TCAACATCAGC

81 G V P D R F S G S G S G T H F T L N I S

301AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTTCATAT
GTTCTCTC

101 R V E A E D L G I Y Y C F Q G S Y V P L

361 ACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

121 I F G A G T K L E L K

SEQ ID NO 20 (Región V de cadena pesada de ratón 15A7)

1ATGGA CTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTTGTCTTATTTTAAAAGGTGTCCA
GTGTGAT

1 M D S R L N L V F L V L I L K G V Q C D

61GTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCC
GGAAACTCTCC

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

121TGTGCAGCCTCTGGATTCAC TTTCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTTCGT
CAGGCTCCA

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

181GAGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGATACATTAATGGTGGCAGTAGTACCA
TCTTCTATGCA

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

241AACGCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAATAC
CCTGTTCTCTG

81 N A V K G R F T I S R D N P K N T L F L

301CAAATGACCATTCTAAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGGAAG
GTATGCTAGT

101 Q M T I L R S E D T A I Y Y C G R Y A S

241GGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACACATTTACAC
TCAACATCAGC

81 G V P D R F S G S G S G T H F T L N I S

301AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTCATAT
GTTCTCTC

101 R V E A E D L G I Y Y C F Q G S Y V P L

361 ACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

121 I F G A G T K L E L K

SEQ ID NO 20 (Región V de cadena pesada de ratón 15A7)

1ATGGA CTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTTGTCCTTATTTTAAAGGTGTCCA
GTGTGAT

1 M D S R L N L V F L V L I L K G V Q C D

61GTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCC
GGAAACTCTCC

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

121TGTGCAGCCTCTGGATTCAC TTTCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTTCGT
CAGGCTCCA

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

181GAGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGATACATTAATGGTGGCAGTAGTACCA
TCTTCTATGCA

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

241AACGCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAATAC
CCTGTTCTCTG

81 N A V K G R F T I S R D N P K N T L F L

301CAAATGACCATCTAAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGGAAG
GTATGCTAGT

101 Q M T I L R S E D T A I Y Y C G R Y A S

361TACGGAGGGGGTGCTATGGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCG
TCTCCTCA
121 Y G G G A M D YW G Q G T S V T V S S

SEQ ID NO 21 (Región V de cadena liviana de ratón 43B6)

1ATGGATTTTCTGGTGCAGATTTTCAGCTTCTTGCTAATCAGTGCCTCAGTTGC
AATGTCC
1 M D F L V Q I F S F L L I S A S V A M S

61AGAGGAGAAAATGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCA
GGGGAAAAG
21 R G E N V L T Q S P A I M S A S P G E K

121GTCACCATGACCTGCAGGGCCAGCTCAACTGTAAATTCCACTTACTTGCA
CTGGTTCCAG
41 V T M T C R A S S T V N S T Y L H W F Q

181CAGAAGTCAGGTGCCTCCCCCAAACCTCTGGATTTATGGCTCATCCAACCTT
GGCTTCTGGA
61 Q K S G A S P K L W I Y G S S N L A S G

241GTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAC
AATCAGCAGT
81 V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S

301GTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTACAGTGGTTA
CCCACTCACG
101 V E A E D A A T Y Y C Q Q Y S G Y P L T

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

SEQ ID NO 22 (Región V de cadena pesada de ratón 43B6)

1ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTCACTACAGGTGTCC
ACTCTGAG
1 M E W S W V F L F L L S V T T G V H S E

61GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTTAGT
GAAGATATCC

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

121TGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGCCTACTACATTCACTGGGTGAAG
CAGAGCCAT

41C K A S G Y S F T A Y Y I H W V K Q S H

181GGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTGTTAATCCTAATACTGGTGGTAC
TAGCTACAAC

61 G K S L E W I G R V N P N T G G T S Y N

241CCGAAGTTCAAGGGCAAGGCCATATTAAATGTAGATAAGTCATCCAGCAC
AGCCTACATG

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

301GAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAG
ATCGGGATCC

101E L R S L T S E D S A V Y Y C A R S G S

381CCCTACTATAGGTACGACGACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTC
CTCA

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

SEQ ID NO 23 (Región V de cadena liviana de ratón 9F9)

1ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCA
GCAGTGAT

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

61GTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAA
GCCTCCATC

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

121TCTTGACAGATCTAGTCAGAGCATTGTAAATAGTAATGGAAACACCTATTTA
GAATGGTAC

41S C R S S Q S I V N S N G N T Y L E W Y

181CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAA
CCGATTTTCT

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

241GGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACAC
TCAAGATCAGC

81 G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S

301AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACA
TGTTCCGTGG

101 R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P W

361 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

121 I F G G G T K L E I K

SEQ ID NO 24 (Región V de cadena pesada de ratón 9F9)

1ATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTTCTTTGTTGTTTTTTATCAAGGTGTGCA
TTGTGAG

1 M L L G L K W V F F V V F Y Q G V H C E

61GTGCAGCTTGTTGAGACTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGGTCATT
GAAACTCTCA

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

121

TGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAATACCAATGCCATGAACTGGGTCCGCCA
GGCTCCA

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

181GGAAAGGGTTT^AATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATG
CAACATAT

61 G K G L E W V A R I R S K S N N Y A T Y

241

TATGCCGATTCAGTGAAAGACAGGTTACCATCTCCAGAGATGATACACAAAG
CATGATC

81 Y A D S V K D R D D T Q S M I

301TATCTGCAAATGAACAACCTTGAAAACCTGAGGACACAGGCATGTATTACTGT
GTGAGAGGG

101 Y L Q M N N L K T E D T G M Y Y C V R C

361GGAAGCTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCG
TCTCCTCA

121 G S Y W Y F D V W G A G T T V T V S S

Como la especificidad antígeno fijadora de un anticuerpo es determinada por sus cadenas livianas y pesadas CDRs los CDRs descritos arriba pueden ser usados para generar derivados de anticuerpos que retienen la especificidad antígeno-fijadora. Ejemplos de derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y sus equivalentes funcionales. Abajo se muestran la región V de cadena sencilla (SEQ ID NO 25) y la región V de cadena pesada (SEQ ID NO 26) del anticuerpo humanizado 15 A 7 el cual incluye las SEQ ID Nos 1-3 y SEQ ID Nos 4-6, respectivamente.

SEQ ID NO 25 (región V de cadena liviana de 15A7 humanizado)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSITVHNDGNTYFEWYQQKPGKAPKLLIY
KVSNRFSGVPSRFSGSGSGTHFTLTISLQPEDFATYYCFQGGSYVPLTIFGQGTK
VEIK

SEQ ID NO 26 (región V de cadena pesada de 15A7 humanizado)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAYING
GSSTIFYANAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYASYGGGAM
DWGQGTSVTVSS

Esta invención también muestra un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia que codifica una de las cadenas de inmunoglobulina descritas arriba.

El término "anticuerpo" o "cadena de inmunoglobulina" se refiere a un polipéptido aislado por ejemplo un polipéptido que ha sido sustancialmente separado de otras proteínas lípidos, y ácidos nucleicos con los cuales está naturalmente asociado. El polipéptido puede constituir al menos 50 70, o el 95 % en peso seco de la preparación purificada. Un "ácido nucleico aislado" se refiere a un ácido nucleico cuya estructura no es idéntica a esa de cualquier ácido nucleico de *ocurrencia natural* o a esa de cualquier fragmento de un ácido nucleico genómico de *ocurrencia natural*. El término en consecuencia cubre, por ejemplo (a) un DNA que tiene la secuencia de parte de una molécula de DNA genómica de *ocurrencia natural* pero que no está flanqueado por ambas secuencias codificadoras que flanquean esa parte de la molécula en el genoma del organismo en la cual él ocurre naturalmente (b) un ácido nucleico incorporado dentro de un vector o dentro de un DNA genómico de una prokariota o eukariota en una manera tal que la molécula resultante no es idéntica a cualquier vector o DNA genómico de *ocurrencia natural* o DNA (c) una molécula 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 nucleotídica recombinada que es parte de un gen híbrido por ejemplo un gen que codifica una proteína fusión. El ácido nucleico de esta invención puede ser usado para expresar un polipéptido de la invención. Para este propósito se puede ligar operativamente el ácido nucleico a secuencias reguladoras adecuadas para generar un vector de expresión.

Un vector se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual éste se le ha ligado, y también capaz de replicación autónoma o de integración dentro de un DNA anfitrión. Los ejemplos incluyen un plásmido un cósmido y un vector viral. Un vector de esta invención incluye un ácido nucleico en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en la célula anfitrión. Preferiblemente, el vector incluye una o más secuencias

regulatorias operativamente ligadas a la secuencia de ácido nucleico a ser expresada. Los ejemplos de secuencias regulatorias incluyen promotores incrementadores, y otros elementos de control de expresión (por ejemplo señales de poliadenilación). Las secuencias regulatorias también incluyen aquellas que dirigen expresión constitutiva de una secuencia nucleotídica así como secuencias regulatorias tejido-específicas y/o inducibles. El diseño de tal vector de expresión está basado en consideración que incluyen la escogencia de la célula anfitriona a ser transformada y el nivel de expresión deseado. Un vector de expresión puede ser introducido dentro de una célula anfitriona para producir un polipéptido de esta invención. Esta invención también incluye una célula anfitriona que contiene el ácido nucleico descrito antes. Una célula anfitriona se refiere a una célula que contiene una secuencia codificante exógena o una secuencia no codificante. Una secuencia exógena puede ser introducida dentro de la célula por transfección de fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-Dextran o electroporación. Células anfitrionas adecuadas incluyen células de bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhimurium*), células de levadura (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*), células de plantas (por ejemplo, *Nicotiana tabacum* y *Gossypium hirsutum*) y células de mamíferos (por ejemplo, células de hibridoma de murino, células CHO, y fibroplastos 3T3).

Para producir una cadena de inmunoglobulina de esta invención se puede colocar una célula anfitriona en cultivo bajo condiciones que permitan la expresión de un polipéptido codificado por uno de los ácidos nucleicos descritos antes y aislar el polipéptido del cultivo. Alternativamente, un ácido nucleico de esta invención puede ser transcrito y traducido *in vitro*, por ejemplo, usando secuencias reguladoras de promotor T7 y polimerasa T7.

Dentro del alcance de la invención está un anticuerpo. Es formado por una primera cadena de inmunoglobulina y una segunda cadena de inmunoglobulina, el cual

contiene respectivamente, CDRs de cadena liviana y CDRs de cadena pesada del anticuerpo de ratón 15A7, 43B6, o 9F9 mencionado antes. Preferiblemente, este anticuerpo está formado por las cadenas livianas y pesadas de 15A7.

También dentro del alcance de esta invención está otro anticuerpo que (i) se fija específicamente al Ligando-1 Glicoproteína P-Selectina sin interferir con la fijación entre Ligando-1 Glicoproteína P-Selectina y P-Selectina y (ii) una vez fijado al Ligando-1 Glicoproteína P-Selectina sobre una célula-T activada induce la muerte de las células-T. En una incorporación, este anticuerpo se fija específicamente a Ligando-1 Glicoproteína P-Selectina humano.

Además dentro del alcance de esta invención está otro anticuerpo que se fija específicamente a residuos aminoácido 115-126 del Ligando-1 Glicoproteína P-Selectina humano maduro. Preferiblemente el anticuerpo se fija específicamente a los residuos aminoácido 117-123. Mas preferiblemente se fija específicamente a los residuos aminoácido 119-121, una secuencia de consenso entre todos los epítopos probados. En efecto, mutación de uno o más de estos tres residuos aminoácidos elimina la fijación de anticuerpos. En un ejemplo, este anticuerpo una vez ligado a Ligando-1 Glicoproteína P-Selectina sobre una célula-T activada induce la muerte de las células T activadas.

En una incorporación, uno de los dos anticuerpos mencionados inmediatamente arriba está formado por una cadena liviana y una cadena pesada que contienen respectivamente SEQ ID Nos 1-3 y SEQ ID Nos 4-6 (por ejemplo SEQ ID Nos 19 y 20, o SEQ ID Nos 25-26).

En un aspecto adicional, la invención muestra un método para inducir la muerte de células-T activadas. El método incluye poner en contacto uno de los tres

anticuerpos descritos arriba con una célula T activada, en la cual la fijación del anticuerpo a la célula T activada induce la muerte de la célula

La invención también muestra un método de modular una respuesta inmune mediada por células-T en un individuo. El método incluye (i) identificar un individuo que tenga o este en riesgo de tener una condición relacionada a una respuesta inmune mediada por células-T excesiva y (ii) administrar al individuo una cantidad efectiva de uno de los tres anticuerpos descritos arriba. Una "respuesta inmune mediada por células-T excesiva" se refiere a una respuesta causada por un nivel excesivo de células-T. Un nivel excesivo se refiere a (1) un nivel más alto que el nivel normal y (2) un nivel más alto que el deseado en un individuo aunque no sea más alto que el nivel normal. Ejemplos de la condición incluyen una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, una enfermedad alérgica o cáncer de células-T, así como la situación en la cual el individuo haya recibido o este contemplando recibir un trasplante alogénico o xenogénico.

Los detalles de una o más incorporaciones de la invención son establecidos en la descripción que acompaña este a continuación. Otros rasgos, objetivos y ventajas de la invención serán aparentes de la descripción detallada.

DESCRIPCION DETALLADA

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

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

Una cadena de inmunoglobulina de la invención puede ser obtenida como un polipéptido sintético o un polipéptido recombinado. Para preparar un polipéptido recombinado, un ácido nucleico que lo codifica puede ser ligado a otro ácido nucleico que codifica un socio de fusión, por ejemplo Glutathione-S-Transferasa (GST) marcador 6x-His eptopo proteína M13 Gene 13 o una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina. El ácido nucleico de fusión resultante puede ser introducido a una célula para la expresión de proteína. La proteína de fusión puede ser aislada de la célula anfitriona por métodos bien conocidos en el arte. La proteína de fusión aislada puede ser tratada adicionalmente, por ejemplo por digestión enzimática, para remover el socio de fusión y obtener el péptido recombinado de interés. Alternativamente, una cadena de inmunoglobulina puede ser obtenida de una célula anfitriona adecuada mediante la activación de expresión endógena de un ácido nucleico que codifica la cadena.

La composición amino ácido de una cadena de inmunoglobulina de la invención puede variar sin afectar la habilidad de formar un anticuerpo capaz de fijarse a PSGL-1. Por ejemplo, tal variante puede contener uno o mas sustituciones amino ácidas conservadoras. Una "sustitución amino ácido conservadora" es una en la cual el residuo amino ácido es reemplazado con un residuo amino ácido que tiene una cadena lateral similar. Familias de residuos amino ácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en el arte. Estas familias incluyen amino ácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico),

cadenas laterales polares descargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína) cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofán) cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofán, histidina). Así, un residuo aminoácido no esencial predicho en un polipéptido es preferiblemente reemplazado con otro residuo aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Alternativamente, mutaciones pueden ser introducidas aleatoriamente a lo largo de todas las partes del polipéptido de esta invención tal como por mutagénesis de saturación y los mutantes resultantes pueden ser seleccionados por su habilidad de formar un anticuerpo capaz de fijarse a PSGL-1 para identificar las variantes de esta invención como se describe adelante en los ejemplos. Así, como un ejemplo, el término "una cadena de inmunoglobulina que contiene SEQ ID NO 19" cubre cadenas de inmunoglobulina que contienen variantes de SEQ ID NO 19.

Las cadenas de inmunoglobulina descritas arriba y las variantes pueden ser usadas para un anticuerpo de esta invención y sus derivados. Un "anticuerpo" incluye moléculas intactas así como fragmentos de ellas tales como Fab, F(ab')₂, Fv, scFv (anticuerpo de cadena simple), y dAb (anticuerpo dominio, Ward et al (1989) Nature, 341: 544). Un derivado de un anticuerpo se refiere a una proteína o complejo de proteína que tiene una variante del polipéptido de esta invención. Un anticuerpo o derivado de esta invención puede ser hecho mediante la co-expresión de polipéptidos que contienen CDRs de cadena liviana y pesada correspondientes en una célula anfitriona adecuada como se describe en los ejemplos de abajo. Alternativamente, ellos pueden ser hechos por métodos conocidos en el arte de elaborar anticuerpos monoclonales y policlonales y fragmentos. Ver, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Para hacer un anticuerpo de esta invención PSGL-1 o su fragmento antigénico pueden ser acoplados a una proteína vehículo tal como KLH mezclados con un adyuvante e inyectados dentro de un animal anfitrión. Los anticuerpos producidos en ese animal pueden ser luego purificados por cromatografía de afinidad de péptidos. Los animales anfitriones comúnmente empleados incluyen conejos, ratones, cerdos de guinea y ratas. Los varios adyuvantes que pueden ser usados para aumentar la respuesta inmunológica dependen de la especie anfitriona e incluyen adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas superficialmente tales como lisolecitina, polioles, plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, keyhole limpet hemocianina y dinitrofenol. Los adyuvantes humanos útiles incluyen BCG (bacilo Calmette-Guenn) y *Corynebacterium parvum*.

Los anticuerpos policlonales, poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos, están presentes en el suero de los sujetos inmunizados. Los anticuerpos monoclonales, poblaciones homogéneas de anticuerpos para un antígeno en particular, pueden ser preparados usando tecnología de hibridoma estándar (ver por ejemplo Kohler et al (1975) Nature 256, 495; 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 técnica que permita la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas de células continuas en cultivo tal como se describe en la patente U.S. No. 4,376,110. La técnica del hibridoma de célula-B humana (Kosbor et al (1983) Immunol Today 4, 72; Cole et al (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80, 2026) and la Técnica de Hibridoma-EBV (Cole et al (1983) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss Inc., pp. 77-96). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de ellas. El hibridoma que produce los anticuerpos

45

monoclonales de la invención puede ser cultivado in vitro o in vivo. La habilidad para producir altas concentraciones de anticuerpos monoclonales in vivo lo hace un método particularmente útil de producción.

Adicionalmente técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" pueden ser usadas. Ver por ejemplo Morrison et al (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81, 6851, Neuberger et al (1984) Nature 312, 604, and Takeda et al (1984) Nature 314 452. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual diferentes partes son derivadas de diferentes especies de animales tales como esas que tienen un región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y un región constante de inmunoglobulina humana. Alternativamente, las técnicas descritas para la producción 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 anticuerpos de cadena sencilla son formados uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente amino ácido. Mas aun los fragmentos anticuerpos pueden ser generados por técnicas conocidas. Por ejemplo tales fragmentos incluyen pero no se limitan a fragmentos $F(ab)_2$ que pueden ser producidos por digestión de pepsina de una molécula de anticuerpo y fragmentos Fab que pueden ser generados mediante la reducción de los puentes disulfuro de fragmentos $F(ab)_2$.

Los anticuerpos pueden también ser humanizados por métodos 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 transgénicos están también dentro del objeto 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).

También dentro del objeto de la invención esta un método de inducir la muerte de células -T activadas, por ejemplo, mediante el contacto de las células-T activadas con un anticuerpo de la invención in vitro, y mediante la administración a un individuo en necesidad de él de una cantidad efectiva de anticuerpo. Los individuos a ser tratados pueden ser identificados como los que tienen o están en riesgo de tener una condición relacionada con una respuesta inmune mediada por células-T excesiva o indeseada, por ejemplo, pacientes que sufren de enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplantes, enfermedades alérgicas o cánceres derivados de células-T. Este método puede ser realizado solo o en conjunto con otras drogas y terapias.

El término "tratamiento" se refiere a la administración de una composición a un individuo con el propósito de cura, alivio, liberación, remedio, prevención o aminoramiento de un desorden, el síntoma del desorden, el estado de enfermedad secundario al desorden o la predisposición hacia el desorden. Una "cantidad efectiva" es una cantidad de la composición que es capaz de producir resultados médicamente deseables en un individuo tratado.

Enfermedades de ejemplo para ser tratadas incluyen diabetes mellitus, artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis y artritis sonática), multiple esclerosis, encéfalomiелitis, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmune, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica y dermatitis eczematosa), sinusitis, síndrome de Sjogren, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, conjuntivitis, keratoconjuntivitis, diabetes tipo I, enfermedades de inflamación del intestino, colitis ulcerativa, asma, asma alérgica, lupus eritematoso cutáneo, escleroma, vaginitis, proctitis, erupciones de droga, reacciones reversas de lepra, eritema nodosum, leprosum, uveítis autoinmune, encéfalomiелitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, pérdida de audición sensorineural progresiva bilateral idiopática, anemia aplásica, anemia

de glóbulos rojos trombocitopenia idiopática policondritis granulomatosis de Wegners, hepatitis activa crónica síndrome de Stevens-Johnson sprue idiopático lichen planus enfermedad de Grave sarcoidosis cirrosis biliar primaria uveítis posterior fibrosis de pulmón intersticial enfermedad de injerto versus anfitrión casos de trasplantes (incluyendo trasplantes usando tejidos alogénicos o xenogénicos) tal como el trasplante de médula, trasplante de hígado, o el trasplantes de cualquier órgano o tejido alergias tal como alergia atópica AIDS y neoplasmas de células T tales como leucemias o linfomas

En una aproximación in vivo, una composición terapéutica (por ejemplo una composición que contiene un anticuerpo de la invención) es administrado a un individuo. Generalmente el anticuerpo es suspendido en un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo solución salina fisiológica) y administrado oralmente o por infusión intravenosa, o inyectado o implantado subcutáneamente intramuscularmente intratecalmente intraperitonealmente intrarectalmente intravaginalmente intranasalmente intragástricamente intratraquea o intrapulmonariamente

La dosis requerida depende de la ruta de administración escogida la naturaleza de la formulación la naturaleza de la enfermedad del individuo el tamaño del individuo, peso, área superficial, edad, y sexo, otras drogas que estén siendo administradas, y el juicio del médico que lo atiende. Las dosis adecuadas están 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 administración. Por ejemplo, la administración oral se esperaría que requiera de mas altas dosis que la administración por inyección intravenosa. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ser ajustadas usando rutinas empíricas estándar para optimización como es bien entendido en el arte. La encapsulación del compuesto en un vehículo adecuado

(por ejemplo micro partículas poliméricas o dispositivos implantables) puede incrementar la eficiencia del suministro, especialmente para el uso oral

También dentro del objeto de la invención esta una composición farmacéutica que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención. La composición farmacéutica puede ser usada para tratar las enfermedades descritas arriba. El vehículo farmacéuticamente aceptable incluye un solvente, un medio de dispersión, un recubrimiento, un agente antibacterial y anti-hongos, y un agente isotónico y retardador de absorción.

La composición farmacéutica de la invención puede ser formulada en formas de dosificación para diferentes vías de administración utilizando métodos convencionales. Por ejemplo, puede ser formulada en una cápsula, un sello de gel o una tableta para administración oral. Las cápsulas pueden contener cualquier material farmacéuticamente aceptable tales como gelatina o celulosa. Las tabletas pueden ser formuladas de acuerdo con procedimientos convencionales mediante la compresión de mezclas de la composición con un vehículo sólido y un lubricante. Ejemplos de vehículos sólidos incluyen almidón y bentonita azucarada. La composición puede también ser administrada en la forma de una tableta de cubierta dura o una cápsula que contiene un aglutinante, por ejemplo, lactosa o manitol, un llenante convencional, o un agente para facilitar la preparación de tabletas. La composición farmacéutica puede ser administrada por la vía parenteral. Ejemplos de las dosificaciones de las formas parenterales incluyen soluciones acuosas, solución salina isotónica o 5% glucosa del agente activo, u otro excipiente aceptable farmacéuticamente bien conocido. Ciclodextrinas u otros agentes solubilizantes bien conocidos a aquellos familiarizados con el arte pueden ser utilizados como excipientes farmacéuticos para llevar el agente terapéutico.

La eficacia de una composición de esta invención puede ser evaluada in vitro o in vivo. Ver por ejemplo, los ejemplos de abajo. Brevemente, la capacidad de la composición puede ser probada para establecer su habilidad para inducir la muerte de las células-T activadas in vitro. Para los estudios in vivo, la composición puede ser inyectada dentro de un animal (por ejemplo un ratón muestra) y sus efectos terapéuticos son luego establecidos. Basado en los resultados, un rango de dosificación apropiado y una vía de administración puede ser determinada.

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

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

Generación de los anticuerpos anti-PSGL-1

Técnicas estándar fueron usadas para generar anticuerpos monoclonales de ratón que específicamente se fijan a PSGL-1 humano (hCD 162). Mas específicamente, los ratones fueron inmunizados con fracciones de membrana de células-T humanas PHA-activadas y sacrificados para generar líneas de células de hibndoma. Los supernadantes de las líneas de células de hibndoma resultante fueron seleccionados por su fijación a células de CHO que expresaban establemente hCD 162. Esas líneas productoras de anticuerpos que se pegan a células de CHO que expresan hCD 162 pero no a las células de CHO parentales fueron identificadas, subclonadas, y analizadas adicionalmente como se describe abajo.

Entre las líneas identificadas estaban m152-15A7, 43B6 y 9F9. Ellas produjeron anticuerpos IgG1 15A7, 43B6 y 9F9 respectivamente. El ensayo de inmunoblotting mostró que estos tres anticuerpos arrancaron de la lisata de células-T activadas una proteína que podía 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 células-T activadas. Los supernadantes de los cultivos que contienen anticuerpos monoclonales secretados por las tres líneas de células de hibndomas fueron respectivamente incubados o con células-T humanas no activadas (Día 0) o células-T humanas activadas in vitro (Día 7) durante 6 horas. Las células fueron luego manchadas con anexina V y sometidas a análisis FACS. Las células CD-3 positivas fueron aforadas para asegurar el conteo de o las células-T humanas activadas in vitro o las células-T humanas en reposo. Las células apoptóticas fueron positivas al manchado de anexina V. La tabla 1 resume los porcentajes de células-T apoptóticas entre todas las células-T barndas.

Tabla 1 Porcentaje de Células-T apoptóticas

	No tratado	Anti-myc	M128- 9F9	No tratado	Anti-mye	m152- 15 A7	m166- 43B6
Día 0	4.17	6.67	5.82	18.18	15.52	5.23	6.57
Día 7	12.63	13.36	28.71	24.18	23.08	51.66	49.44

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

El ensayo de apoptosis fue también conducido sobre células mononucleares de sangre periférica humana PHA-activadas (PBMC). Se encontró que los anticuerpos solo inducen apoptosis en células T activadas, pero no en células T en reposo, células B o en neutrófilos.

Es conocido que los anticuerpos agotadores de células-T tal como anti-CD3 son capaces de inducir producción de factores solubles. Terapia utilizando estos anticuerpos usualmente resulta en un síndrome de citoquina dañino. Para probar si el anticuerpo anti-PSGL-1 también 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 de IL-2, TNF- α , e IFN- γ fueron producidas en el PHA-activado PBMC (control positivo) mientras que los niveles de estas citoquinas en células tratadas con 15A7 no fueron detectables. Estos resultados soportan que el anti-PSGL-1 no tiene o tiene efectos pequeños en células de sangre periférica en reposo, en ambos aspectos inducción apoptótica y activación de células.

Puesto que los anticuerpos descritos anteriormente inducen selectivamente apoptosis de células-T activadas sin causar efectos adversos en las células T en reposo u otras células inmunes, la administración de aquellos a un sujeto es poco probable que resulte en linfopenia o una inmunodeficiencia extensa como lo hace el anti-CD3 o los inmunosupresores.

Mapeo de epítopos de los anticuerpos anti-CD162

Para mapear los epítopos fijadores de ratones 15A7, 43B6, y 9F9 en CD162 humano, una serie de proteínas de fusión que cubren varias regiones de CD162

52

humano fueron expresadas y purificadas Las interacciones entre las proteínas de fusión y estos anticuerpos monoclonales fueron analizadas por el ensayo inmunosorbente de enzima-ligado Sandwich (ELISA)

Brevemente fragmentos que cubren varias regiones del gen humano CD162 fueron expresados como proteínas de fusión con región constante de cadena pesada de inmunoglobulina gamma 1 humana en *E coli* cDNA codificando la región constante de cadena pesada de inmonoglobulina gamma 1 fue amplificado mediante PCR con primers que tienen un sitio *Bgl*II y un sitio *Bam*HI El producto PCR fue cortado con *Bgl*II y *Bam*HI, y subclonado dentro de un vector pET-32a (Novagen) que ha sido digendo por las mismas encimas Luego, cDNA codificando varias regiones de hCD162 fue amplificado mediante PCR con primers que tienen un sitio *Nde*I en el extremo 5 y un sitio *Bgl*II en el extremo 3 Los productos PCR fueron cortados con las correspondientes encimas y enmarcado fusionadas a la secuencia que codifica la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina gamma 1 humana en el vector pET-32a Los primers utilizados en cada construcción son listados en la Tabla 2 y las secuencias de los primers son listadas en la Tabla 3

Tabla 2 Nombres de los primers en cada experimento

Para amplificar secuencias que codifican	Primer hacia adelante	Primer reverso
Fragmentos de E coli que expresan hCD162		
42-119	AB1001	AB1005
42-80	AB1001	AB1008
61-99	AB1003	AB1009
81-119	Ab1004	AB1005
42-70	AB1001	AB1007
42 60	AB1001	AB1006
50 80	AB1002	AB1008
50-70	AB1002	Ab1007
42-319	AB1001	Ab1010
115-126	AB1022	AB1023
115-126EtoR	AB1004	AB1025
Región V de cDNAs		
Cadena liviana	AB1058	AB1059
Cadena pesada	AB1058	AB1060
Fragmentos de mamíferos que expresan hCD162		

Para amplificar secuencias que codifican	Primer hacia adelante	Primer reverso
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 quiméricas		
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 1 ^{er} par	AB1049	AB1050
cadena liviana 15A7 2 ^{do} par	AB10451	AB1052
cadena liviana 15A7 3 ^{er} par	AB1053	AB1054
cadena liviana 15A7 4 ^o par	AB1055	AB1056
cadena pesada 15A7	AB1038	AB1047
cadena pesada 15A7 1 ^{er} par	AB1039	AB1040
cadena pesada 15A7 2 ^{do} par	AB1041	AB1042
cadena pesada 15A7 3 ^{er} par	AB1043	AB1044
cadena pesada 15A7 4 ^o par	AB1045	AB1046

Tabla 3 Secuencias de primers

Nombre Secuencia

Nombre	Secuencia
AB1001	cccggggacCATATGcaggccaccgaatatgagtacc
AB1002	tatgagCATATGgattatgatttcctgccagaaacgg
AB1003	aaacggagCATATGgaaatgctgagggaacagcactgacacc
AB1004	aacccctCATATGaccactgtggagcctgctgcaaggcg
AB1005	gtggtcAGATCTtccatagctgctgaatccgtggacagg
AB1006	GTTCTCAGATCTTCTGGAGGCTCCGTTTCTGGCAGG
AB1007	AGGCCCAAGATCTGGAGTGGTGTCAGTGCTGTTCTCT
AB1008	ggctccAGATCTgtagactcaggggtccaggccc
AB1009	gtggtcAGATCTgtgactgcccctcctgcatccaggcc
AB1010	GCCAGCAGATCTTGCTTCACAGAGATGTGGTCTGGGG
AB1011	cgcggatccatgcctctgcaactcctcctgtgtgc
AB1012	GCCAGCCTCGAGCTTCACAGAGATGTGGTCTGGGG
AB1013	GGTCTGctcgagCATAGCTGCTGAATCCGTGGACAGGTTT
AB1058	agacaggccaccgaagggaacctgtccacg
AB1059	cgltggacagggtcccttcgggtggcctgtct
AB1014	ccgctcgagcgccaagattaggatggc
AB1015	cgggatccactcaaaccacagccatgg
Ab1016	ccgctcgagtggtagtaggttccatgg
Ab1017	cgggatcaactcaaccacaggcctg
Ab1018	ctgtgcctcgagggctgtggtttgagtg
Ab1019	cgggatccatggagatacagaccactcaac
Ab1020	cgggatccgatgcaggaggggagtcac
Ab1021	ggccgtcactcgagtgtctgtgcctc
Ab1022	TatpGATTGAGCAGCTATGGAGATACAGACCACTCAACCAgcA
Ab1023	GATCTgcTGGTTGAGTGGTCTGTATCTCCATAGCTGCTGAATCCA
Ab1024	TatpGATTGAGCAGCTATGCGGATACAGACCACTCAACCAgcA
Ab1025	GATCTgcTGGTTGAGTGGTCTGTATCCGCATAGCTGCTGAATCCA
AB1026	CTAGTCTAGATGACCCAACTCCACTCTCCC
AB1027	CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTAGCATCAGCCCGTTTGATTTC
AB1028	TAACATiCtagATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGG
AB1029	GGATAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACCGTGG
AB1030	CTAGTCTAGATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGG

AB1031	CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTTTTCCAGCTTGGTCCCCCTCC
AB1032	CTAGTCTAGATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCC
AB1033	CTAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACTGAGGttcc
AB1034	CTAGTCTAGATGGATTTTCTGGTGCAGATTTTCAGC
AB1035	CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTAGCATCAGCCCCGTTTCAGCTCC
AB1036	CTAGTCTAGATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTC
AB1037	CTAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCAGCTTCCAGTGGATAGACTGATGG
AB1038	TCTATCTAGATGAACTTCGGGTCCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAGTG
AB1039	CCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAQ
AB1040	CTGAAAGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAAGCTTCTCCAGGCTGCACTAAGCCTQ
AB1041	GCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGAQ
AB1042	GCATAGAAGATGGTACTACTGCCACCATTAAATGTATGCCGACCCACTCGAGTCCCTTCCCTGGAG
AB1043	GTAGTACCATCTTCTATGCAAACGCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGATAATGCC
AB1044	CCTCAGCCCTCAGAGAATTCATTTGCAGGTACAGGGTGTTCTTGCCATTATCTCTGGAGATGG
AB1045	GAATTCTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGATATGCTAGTTACGGAGG
AB1046	CTGTGACCAGGGTGCCTTGGCCCCAATAGTCCATAGCACCCCTCCGTAACCTAGCATATC
AB1047	ACCCTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACTGTGACCAGGGTGCCTTGGCC
AB1048	TCTATCTAGATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGC
AB1049	GCTGCTCTGGGTTCCAGGCTCCACTGGTGACATTCAGATGACCCAATCTCCGAGCTCTTTG
AB1050	GATCTGCAGGTGATAGTGACCCTATCCCCTACAGACGCAGACAAAGAGCTCGGAGATTGG
AB1051	CACTATCACCTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAATGATGGAACACCTATTTTGAATG
AB1052	GATGAGAAGCTTGGGTGCCTTTCCTGGTTTCTGTTGGTACCATTCAAATAGGTGTTTC
AB1053	GCACCCAAGCTTCTCATCTATAAAGTTTCCAATCGATTTTCTGGTGTCCCATCCAGGTTTAGTGG
AB1054	GCAGAGAAGAGATGGTGAGGGTGAAGTGTGTCCAGACCCACTGCCACTAAACCTGGATGG
AB1055	CTCACCATCTCTTCTCTGCAGCCGGAGGATTTGCAACCTATTACTGTTTTCAAG
AB1056	CCTTGGTGCCTTGACCGAACGTGAGAGGAACATATGAACCTTGAAAACAGTAATAGG
AB1057	ACCCTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTACGTTTGATTTCCACCTTGGTGCCTTGACCG
AB1058	TATATCTAGAATTCCCCCCCCCCCCC
AB1059	TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC
AB1060	ATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGAC(C/A/T)GATGGGG(C/G)TGT(C/T)GTTTTGGC

Las construcciones de expresiones descritas anteriormente fueron transformadas en *Escherichia coli* variedad BL21 (DE3). Las células transformadas fueron cosechadas después de 6 horas de inducción de IPTG (2 mM) y resuspendidas en PBS. Después las células fueron sonicadas y centrifugadas a 14 000g por 10 minutos. Los sobrenadantes resultantes fueron recogidos para purificación de las proteínas de fusión. Mas específicamente los sobrenadantes fueron primero incubados con cuentas de proteína G o proteína A por 3 horas a 4°C. Las cuentas fueron después centrifugadas a 3,000g y lavadas con solución de lavado amortiguadora I (0.05% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH 8.5, 400 mM NaCl, 1mM CaCl₂ y 1 mg/ml OVA) y solución de lavado amortiguadora II (0.05% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH 8.5 y 150 mM de NaCl) 5 veces con cada una. Las proteínas fijadas fueron eluidas después con una solución extractadora amortiguadora que contiene 0.1M de glicina-HCl, pH 2.7 y neutralizada con 1 M Tris-HCl, pH 8.6. Todas las proteínas de fusión purificadas fueron cuantificadas por el ensayo de



proteínas Bio-Rad (Bio-Rad Laboratones, Cat No 500-0006) y verificada por SDS-PAGE

Un sandwich ELISA fue llevado a cabo para estudiar la interacción entre los fragmentos hCD162 y cada uno de 15A7, 9F9, y 43B6. Platos microtitrier de 96 columnas fueron cubiertos con anticuerpo IgG de cabra anti humano (Southern Biotechnology Cat No 2040-01) ($2\mu\text{g/ml}$ $50\mu\text{l/columnas}$) de un día para otro a 4°C . Los platos fueron bloqueados por incubación con 0.25% de BSA en PBS ($150\mu\text{l/columna}$) por 1 hora a 37°C . Los platos bloqueados fueron después incubados con proteínas de fusión que contenían varios fragmentos de CD162 humano ($2\mu\text{g/ml}$) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar 4 veces con PBS que contiene 0.05% de Tween 20 (PBST), los platos fueron incubados con anticuerpos de prueba ($2\mu\text{g/ml}$) durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación los platos fueron lavados 4 veces con PBST. $50\mu\text{l}$ de IgG de cabra anti-ratón diluido 1 a 3000 conjugado con fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology, Cat No 1031-04) fueron luego adicionados a cada columna y los platos fueron incubados por 1 hora a 37°C . La reacción de enzimas fue llevada a cabo adicionando $50\mu\text{l}$ de una solución sustrato de fosfatasa alcalina (1 tableta de solución sustrato de fosfatasa alcalina disuelta en 5 ml de solución sustrato amortiguadora que contiene 0.012 M de Na_2CO_3 , 0.16 M de NaHCO_3 y 1 mM de MgCl_2 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 proteínas de fusión que contienen residuos 50 a 60 de CD162 humano maduro indicando que los epítopos de 43B6 y 9F9 estaban localizados entre los residuos 50-60. A diferencia de 43B6 y 9F9, 15A7 solo se fijó a las proteínas de fusión que cubren los residuos 42 a 319, pero no a las proteínas de fusión que cubren residuos 42-119, indicando que el epítopo de 15A7 estaba localizado entre los

residuos 119 a 319 La localización del eptopo de 15A7 fue luego estrechada entre los residuos 115 a 126 El cambio de un amino ácido en la posición 120 (Glu → Arg) disminuyó la interacción entre 15A7 y la proteína de fusión indicando que el dominio de contacto primario del 15A7 sobre CD162 humano está localizado en o adyacente a la posición 120, y el residuo Glu es esencial para la interacción

Proteínas de fusión que cubren varias regiones de CD162 humano fueron también expresadas en células de mamíferos y fueron probadas para su interacción con 15A7 Los fragmentos que cubren estas regiones fueron expresados como proteínas de fusión con región constante de cadena pesada de inmunoglobulina gamma 1 humana en células de mamíferos Primero, el cDNA que codifica la región constante de cadena pesada de inmonoglobulina gamma 1 fue insertado dentro de un vector pcDNA3 (Invitrogen) Segundo, cDNAs codificando varias regiones de hCD162 fueron amplificados mediante PCR con primers introduciendo un sitio *BamHI* en el extremo 5 y un sitio *XhoI* en el extremo 3 Estos productos PCR fueron cortados con las correspondientes enzimas y subclonados dentro de el vector pcDNA3 que contiene la región 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

Los recién descritos vectores de expresión de mamíferos fueron transfectados transientemente dentro de células COS-7 mediante Lipofectamina 2000 (Invitrogen Cat No 11668-027) siguiendo la guía del fabricante Las células transfectadas fueron cultivadas en medio Ig ultra bajo (Invitrogen, Cat No 16250-078) Las proteínas expresadas fueron purificadas y sometidas a Sandwich ELISA en la misma manera descrita arriba

Los resultados de ELISA muestran que solo las proteínas de fusión que contienen residuos 94 a 148 pudieron interactuar con 15A7. Estos resultados son consistentes con la idea de que el epítopo de 15A7 está localizado entre los residuos 115 a 126.

Todos los resultados anteriores indican que los epítopos de 9F9, 43B6 y 15A7 son proteíno-dependientes en lugar de ser modificación de carbohidratos-dependientes, puesto que todos los tres anticuerpos se fijan a proteínas de fusión expresadas bacterionalmente. Ellos también indican que, aunque 15A7, 9F9 y 43B6 muestran propiedades similares en términos de especificidad fijadora y función de inducción de apoptosis en células T activadas, ellos funcionan a través de dominios diferentes del CD162 humano y se comportan de manera diferente.

EJEMPLO 2 Anticuerpos Quiméricos 15A7, 43B6, y 9F9

Clonación de regiones variables de cadena liviana y pesada de anticuerpos anti-CD162

cDNA que codifican las regiones variables de cadenas livianas y pesadas (V_L y V_H) de los anticuerpos 15A7, 43B6, y 9F9 fueron amplificadas por un método de PCR anclado. Los primers 3' hibridizados a la región C y los primers 5' hibridizados a la cola G anexados al cDNA usando deoxi transferasa terminal. Los fragmentos 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 mayoría de los clones independientes fue escogida. La secuencia amino ácido traducida fue luego analizada para confirmar que la secuencia escogida posee las características típicas de la región V de cadena liviana o cadena pesada de ratón y pertenece a un subtipo específico. Las regiones complementarias determinantes (CDRs) fueron entonces identificadas.

por la comparación de las secuencias amino ácido 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 ácidas deducidas de las regiones V de cadenas livianas y pesadas de 15A7, 43B6 y 9F9 (SEQ ID Nos 19-24 se muestran en Resumen.

Anticuerpos Quiméricos

Para generar vectores para expresar anticuerpos quiméricos, cDNA que codifican las regiones V_L y V_H de 15A7, 43B6, y 9F9 fueron amplificados mediante PCR utilizando primers para incluir la secuencia péptida de señal 5 y la señal donante de empalme 3. Los primers también introdujeron sitios XbaI en ambos extremos de los productos PCR, los cuales son luego cortados con la enzima XbaI y ligados dentro de vector pV_K, pVg1, pVg2 o pVg4 XbaI digerido. Mas específicamente, los cDNAs de región V_L de 15A7, 43B6, y 9F9 fueron subclonados dentro del plásmido pV_K. Este plásmido contenía un promotor CMV, y una secuencia que codifica la región constante de cadena liviana humana. El cDNA de región V_H de 15A7, 43B6 y 9F9 fueron subclonados dentro de los plásmidos pVg1, pVg2, o pVg4. Cada uno de los tres plásmidos tenían un promotor CMV. Ellos también contenían respectivamente las regiones constantes de cadena pesada humana de IgG1, IgG2 e IgG4.

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

Se encontró que todos los anticuerpos quiméricos hechos de 15A7 43B6 y 9F9 se fijaron a trasfectantes Sp2/0 que expresan establemente CD162 humano pero no a las células parentales Sp2/0, indicando que ellos retienen la especificidad de fijarse al CD162 humano Además se encontró que los anticuerpos quiméricos indujeron apoptosis en células T que habían sido activadas por 7 días indicando que ellos también retienen esta función de sus contrapartes de ratón

Anticuerpos humanizados

15A7 de ratón fue utilizado para hacer anticuerpos humanizados a través de injertos de su CDR dentro de un marco humano Para conservar la afinidad fijadora y especificidad es esencial conservar la conformación de la región V cuando se injerta el CDR dentro del marco humano Para seleccionar un donante de marco apropiado, las secuencias amino ácidas de las regiones V de cadenas liviana y pesada de 15A7 de ratón fueron comparadas con las de 50 anticuerpos de ratón que habían sido humanizados

Se encontró que un anticuerpo de ratón, mDREG-55, tenía una alta homología de secuencia con la región V de 15A7 de ratón en ambas cadenas liviana y pesada La mostrada a continuación es un alineamiento de secuencia de 15A7 de ratón contra este anticuerpo mDREG-55 (los CDR están resaltados)

Alineamiento de cadena liviana

mDREG-55	DIVLTQSPASLSVSLGERASISCKASQSV <u>VDY DGDSYMNWYQQKPGQP</u> PKLLIYAASNLES
	DI++TQ+P SL VSLG++ASISC++SQS+ + DG++Y WY QKPGQ PKLLIY SN S
m15A7	DILMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSI <u>VHNDGNTYFEWYLQKPGQSP</u> PKLLIYKVSNRFS
mDREG 55	GIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQSNEDPWTFGGGTKLEIK
	G+P RFSGSGSGT FTLNI VE ED YYC Q + P TF GGTKLE+K
m15A7	GYPDRFSGSGSGTHFTLNIERVEAEDLGIYYCFQGSYVPLTFGAGTKLELK

Alineamiento de cadena pesada

mDREG-55	EVKLVESSGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMS ~~WVRQTPEKRLEWVASISTGGST~~ YYPDSVKG +V+LVESGGGLV+PGGS KLSCAASGFTF8++ M WVRQ PEK LEWVA 1+ G ST +Y ++VKG
m15A7	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAEKGLEWVAYINGGSSTIFYANAVKG
mDREG 55	RFTISRDNARNILYLQMSSLRSED ~~TAMYYCAR-DY DGYFDY~~ WGQGTTLTVSS RFTISRDN +N L+LQM+ LRSEDTA+YYC R Y G DYWGQGT++TVSS
m15A7	RFTISRDNPKNTLFLOMTILRSED ~~TAIYYCGRYASYGGGAMDY~~ WGQGTSTVTSS

DREG-55 de ratón es un anticuerpo monoclonal IgG1 contra L-selectina. Las secuencias de las regiones V_L y V_H 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.

DREG-55 humanizado (HuDREG-55) había sido construido utilizando secuencias marco de las regiones V_L y V_H de un anticuerpo Gal humano. En consecuencia para humanizar 15A7 de ratón, la secuencia marco de cadenas liviana y pesada Gal humanas fueron 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 oligonucleótidos sintéticos (~ 80 bases de longitud). Los oligonucleótidos de cada par fueron traslapados por alrededor de 20 nucleótidos. Las secuencias nucleótidos fueron seleccionadas y sintetizadas para codificar las secuencias de proteínas de las regiones variables humanizadas incluyendo péptidos señal. El ensamblaje y amplificación de los genes fue llevado a cabo en cuatro pasos: (1) los cuatro pares de oligonucleótidos complementarios fueron hibridados y extendidos con fragmento Klenow en 4 reacciones separadas; (2) los 4 fragmentos dsDNA resultantes fueron mezclados por pares, desnaturizados, rehibridados y extendidos en dos reacciones separadas; (3) los dos fragmentos dsDNA resultantes fueron mezclados, desnaturizados, 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 XbaI en ambos extremos El fragmento PCR fue luego cortado con XbaI e insertado dentro de los respectivos vectores vVk y pVg4 XbaI digendos 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 I62V y D74H) Listados a continuación están los alineamientos 15A7 de ratón y 15A7 humanizado (Hu15A7) contra mDREG-55 en los cuales V62 y H74 están subrayados

Alineamiento de cadena liviana

hDREG-55	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSV ~~VDY DGDSY~~ MN ~~WYQ~~ KPGKAPKLLIYAASNLES
m15A7	DILMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSI ~~VHNDGNTYFEWY~~ LQKPGQSPKLLIYK ~~VSNRFS~~
Hu15A7	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSQSI ~~VHNDGNTYFEWY~~ QKPGKAPKLLIYK ~~VSNRFS~~
hDREG-55	GIPSRFSGSGSGTDFTLTIS ~~SLQPEDFATYYCQ~~ QSNEDP ~~WTF~~ GGGTKVEIK
m15A7	GVPDRFSGSGSGTHFTLNISRVEAEDLGIYYC ~~FQGSYVPLT~~ FGAGTKLELK
Hu15A7	GVPSRFSGSGSGTHFTLTIS ~~SLQPEDFATYYC~~ FQGSYV ~~PLT~~ FGGQTKVEIK

Alineamiento de cadena pesada

hDREG-55	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS ~~CAASGFTFS~~ TYAMSWVRAQPGKGLEWVA ~~RI~~ STGGST YYPDSVKG
m15A7	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLS ~~CAASGFTFS~~ SFGMLHWVRQAPEKGLEWVAYINGGSTIFYANAVKG
Hu15A7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS ~~CAASGFTFS~~ SFGMLHWVRQAQPGKGLEWVAYINGGSTIFYANAVKG
hDREG 55	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR-- ~~DY~~ DGYFDYWGQGLTVTVSS
m15A7	RFTISRDNPKNTLFQMILRSED ~~TAIYYCGRYAS~~ YGGGAMDYWGQGSTVTVSS
Hu15A7	RFTISRDNAKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARY ~~AS~~ YGGGAMDYWGQGSTVTVSS

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

Preparación de Anticuerpos Quiméricos y Humanizados

Células que producen anticuerpos humanizados y quiméricos fueron producidas. Más específicamente células Sp2/0 (Sp2/0-Ag14 ATCC CRL 1581) fueron establemente transfectadas con los plásmidos apropiados por electroporación utilizando un equipo Gene Pulser (Bio-Rad Laboratones) a 360 V y 25 μ F de capacitancia de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Antes de la transfección los plásmidos fueron linearizados por digestión con enzima *Bam*HI. Todas las transfecciones fueron efectuadas utilizando 10^7 células en PBS y 20 μ g cada uno de DNA plásmido. Las células de cada transfección fueron colocadas en dos platos de cultivo de 96 columnas. Después de 48 horas fueron aplicados un medio selectivo (DMEM 10% FBS/hipoxantina/timidina medio suplementario) y 1 μ g/ml de ácido micofenólico. Las células productoras de anticuerpos fueron seleccionadas y aisladas examinando la presencia de anticuerpo en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA.

Las células aisladas fueron cultivadas en medio libre de suero o Ig bajo y el sobrenadante cultivado fue recogido. Los anticuerpos fueron purificados por el paso sobre una columna de proteína A-Sefarosa CL-4B de estafilococo. Después de lavar 5 veces con cada solución de lavado amortiguadora I (0.05% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH 8.5, 400 mM NaCl, 1mM CaCl_2 y 1 mg/ml OVA) y solución de lavado amortiguadora II (0.05% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH 8.5 y 150 mM de NaCl) los anticuerpos fijados fueron eluidos con una solución amortiguadora de elusión que contiene 0.1 M de glicina-HCl, pH 2.7, y neutralizada con 1 M Tris-HCl, pH 8.6.

Mediciones de Afinidad

Las afinidades de fijación de los anticuerpos de ratón quimérico y 15A7 humanizado descritos anteriormente fueron determinadas por fijación competitiva

15A7 de ratón fue biotinilado por un sistema EZ-Link Sulfo-NHS-Biotina (Pierce Biotechnology, Cat No 21217) Brevemente 0.5 mg (3.3×10^{-6} nmoles) de 15A7 de ratón fueron disueltos en 187 μ l de PBS y mezclados con 6.8×10^{-5} nmoles de Sulfo-NHS-Biotina. La mezcla fue luego incubada sobre hielo por 2 horas antes de que las biotinas libres fueran removidos por diálisis contra PBS a 4°C de un día para otro. El 15A7 de ratón marcado con biotina así obtenido fue almacenado a 4°C hasta su utilización.

Transfectantes Sp2/0 que expresan establemente CD162 humano fueron utilizados como fuente de antígeno CD162 humano. 15A7 de ratón marcado con biotina fue utilizado como trazador. Cantidades crecientes de anticuerpos competidores (de ratón quimérico o 15A7 humanizada) fueron mezclados con 35 ng de ratón 15A7 marcado con biotina e incubado con 1×10^5 células Sp2/0 que expresan CD162 por 1.5 horas a 4°C con agitación constante. Después de lavado el anticuerpo secundario Streptavidin-PE (Becton Dickinson Immunocytometry System Inc. Cat No 349023) fue adicionado a la mezcla. Después de incubación por 45 minutos a 4°C las células fueron lavadas nuevamente, resuspendidas en 300 μ l de PBS-1% de FBS, y sujeto a análisis FACS.

Se encontró que la mitad máxima de concentración competidora de ratón 15A7 fue 3.72 μ g/ml mientras que las de los 15A7 quiméricos y humanizados fueron 5.71 μ g/ml y 4.51 μ g/ml respectivamente. Estos resultados indican que las afinidades de 15A7 de ratón, quimérico y humanizado son comparables. En otras palabras la afinidad fijadora (K_a) para 15A7 de ratón es $4.03 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ mientras que para los

15A7 quiméricos y humanizados son $2.62 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ y $3.33 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ respectivamente

Análisis de Competición

Los análisis de competición fueron conducidos para estudiar la interacción entre los tres anticuerpos de ratón arriba descritos, PSGL-1 y P-Selectina

P-selectina es un ligando principal de alta afinidad por PSGL-1 en la mayoría de leucocitos. Para investigar si los tres anticuerpos previenen la fijación de P-selectina a PSGL-1, la fijación de P-selectina humana purificada a células-T activadas fue medida en 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.

PBMC humanos fueron activados con PHA al 1% durante 2 días y mantenidos en medio que contiene IL-2 durante 3 días. Las células fueron incubadas con 9F9, 15A7, 43B6, KPL-1 (un PSGL-1 antagonista) o un anticuerpo de control (9E10) durante 30 minutos, seguido de la adición de P-selectina humana recombinada ($1.25 \mu\text{g/ml}$). La fijación de P-selectina a las células-T activadas fue medida mediante anti-P-selectina-FITC analizada sobre FACS.

Consistente con reportes previos, KPL-1 casi elimina completamente la fijación de P-selectina a células-T activadas a una baja concentración ($0.31 \mu\text{g/ml}$). 43B6 bloquea la fijación de P-selectina a las células T-activadas casi tan efectivamente como lo hizo KPL-1, mientras una mas alta concentración de 9F9 fue requerida para lograr el mismo efecto. En efecto, $0.08 \mu\text{g/ml}$ de KPL o 43B6 fue necesario para abolir 50% de la fijación. En contraste, $5 \mu\text{g/ml}$ de 9F9 fue requerido. Mas aun, 15A7 no tuvo ningun efecto inhibitorio sobre la fijación de P-selectina aun a

20 µg/ml Sorprendentemente éste aumento la fijación de P-selectina a PSGL-1. Estos resultados indican que 15A7 y P-selectina se fijan a diferentes motivos de PSGL-1 sobre la célula-T activada.

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 encontró 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 preparado de manera similar al método descrito en el ejemplo 1. El indujo apoptosis de células-T in vitro y agotó las células-T in vivo. Para determinar si él interfirió con la fijación entre PSGL-1 de ratón y P-selectina de ratón, análisis de competición fueron realizados en una forma similar a la descrita en el Ejemplo 2. Se encontró que TAB4 no inhibió la fijación de P-selectina de ratón a PSGL-1 de ratón aún en concentraciones tan altas como 20 µg/ml.

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

Anticuerpos monoclonales adicionales contra PSGL-1 humano 4B7, 5C4, 12E7, 14B3, 17E5 y 18D12 fueron caracterizados. Una vez fijados a células-T activadas

todos ellos indujeron muerte de las células-T activadas. Análisis de competición fueron realizados en 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 algún efecto inhibitorio sobre la fijación de P-selectina humana a PSGL-1 humano aun a las mas altas concentraciones probadas (5 µg/ml).

OTRAS INCORPORACIONES

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

De la descripción anterior, una persona hábil en el arte puede fácilmente establecer las características esenciales de la presente invención, y sin apartarse del espíritu y alcance de ellas, puede hacer varios cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a varios usos y condiciones. Así, otras incorporaciones están también dentro del alcance de la invención.

L QUE ES REIVINDICADO

- 1 Una cadena de inmunoglobulina que incluye, respectivamente, 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 o SEQ ID NOs 16-18**
- 2 La cadena de inmunoglobulina de la reivindicación 1 donde la cadena de inmunoglobulina incluye SEQ ID NOs 1-3 o SEQ ID Nos 4-6**
- 3 La cadena de inmunoglobulina de la reivindicación 1 donde la cadena de inmunoglobulina incluye SEQ ID NOs 19 20 21 22 23 24 25 o 26**
- 4 La cadena de inmunoglobulina de la reivindicación 3, donde la cadena de inmunoglobulina incluye SEQ ID NO 25 o 26**
- 5 Un anticuerpo que incluye una primera cadena de inmunoglobulina de la reivindicación 1 y una segunda cadena de inmunoglobulina también 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 o SEQ ID NOs 13-15 y SEQ ID NOs 16-18**
- 6 El anticuerpo de la reivindicación 5 donde la cadena liviana y la cadena pesada contienen respectivamente SEQ ID NOs 1-3 y SEQ ID NOs 4-6**
- 7 El anticuerpo de la reivindicación 5, donde la cadena liviana y la cadena pesada contienen respectivamente SEQ ID NOs 19 y 20, 21 y 22 23 y 24 o 25 y 26**



- 8 El anticuerpo de la reivindicación 5, donde la cadena liviana y la cadena pesada contienen, respectivamente, SEQ ID NOs 25 y 26
- 9 Un anticuerpo que se fija específicamente al Ligando -1 Glicoproteína P-Selectina sin interferir con la fijación entre el Ligando -1 Glicoproteína P-Selectina y la P-Selectina donde el anticuerpo una vez se fija al Ligando -1 Glicoproteína P-Selectina sobre una célula-T activada induce la muerte de la célula-T activada
- 10 El anticuerpo de la reivindicación 10, donde el anticuerpo fija al Ligando -1 Glicoproteína P-Selectina humano
- 11 El anticuerpo de la reivindicación 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
- 12 El anticuerpo de la reivindicación 10, donde la cadena liviana y la cadena pesada contienen respectivamente SEQ ID NOs 1-3 y SEQ ID NOs 4-6
- 13 Un anticuerpo que fija específicamente a los residuos amino ácidos 115-126 del Ligando -1 Glicoproteína P-Selectina humano
- 14 El anticuerpo de la reivindicación 13 donde el anticuerpo fija específicamente a los residuos amino ácidos 117-123
- 15 El anticuerpo de la reivindicación 14 donde el anticuerpo fija específicamente a los residuos amino ácidos 119-121

- 16 El anticuerpo de la reivindicación 13 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
- 17 El anticuerpo de la reivindicación 13, donde el anticuerpo, una vez se fija al Ligando -1 Glicoproteína P-Selectina sobre una célula-T activada induce la muerte de la célula-T activada
- 18 El anticuerpo de la reivindicación 17, donde la cadena liviana y la cadena pesada contienen, respectivamente, SEQ ID NOs 1-3 y SEQ ID NOs 4-6
- 19 Un método para inducir la muerte de células-T activadas que incluye poner en contacto el anticuerpo de la reivindicación 8 con una célula-T activada donde la fijación del anticuerpo a la célula-T activada induce la muerte de la célula-T activada
- 20 Un método para inducir la muerte de células-T activadas, que incluye poner en contacto el anticuerpo de la reivindicación 9 con una célula-T activada donde la fijación del anticuerpo a la célula-T activada induce la muerte de la célula-T activada
- 21 Un método para inducir la muerte de células-T activadas que incluye poner en contacto el anticuerpo de la reivindicación 13 con una célula-T activada donde la fijación del anticuerpo a la célula-T activada induce la muerte de la célula-T activada
- 22 Un método para modular la respuesta inmune mediada por células-T en un individuo, que comprende identificar un individuo que tiene o está en riesgo de tener una condición relacionada a una respuesta inmune mediada por

células-T excesiva y administrar al individuo una cantidad efectiva de un anticuerpo de la reivindicación 8

- 23 El método de la reivindicación 22 donde la condición es una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune una enfermedad alérgica o un cáncer de células-T**
- 24 El método de la reivindicación 23, donde el individuo ha recibido o esta contemplando recibir un trasplante alogénico o xenogénico**
- 25 Un método para modular la respuesta inmune mediada por células-T en un individuo, que comprende identificar un individuo que tiene o está en riesgo de tener una condición relacionada a una respuesta inmune mediada por células-T excesiva y administrar al individuo una cantidad efectiva de un anticuerpo de la reivindicación 9**
- 26 El método de la reivindicación 25 donde la condición es una enfermedad inflamatoria una enfermedad autoinmune una enfermedad alérgica o un cáncer de células-T**
- 27 El método de la reivindicación 26 donde el individuo ha recibido o esta contemplando recibir un trasplante alogénico o xenogénico**
- 28 Un método para modular la respuesta inmune mediada por células-T en un individuo que comprende identificar un individuo que tiene o está en riesgo de tener una condición relacionada a una respuesta inmune mediada por células-T excesiva, y administrar al individuo una cantidad efectiva de un anticuerpo de la reivindicación 13**

- 29 El método de la reivindicación 28 donde la condición es una enfermedad inflamatoria una enfermedad autoinmune una enfermedad alérgica o un cáncer de células-T
- 30 El método de la reivindicación 29, donde el individuo ha recibido o esta contemplando recibir un trasplante alogénico o xenogénico
- 31 Un ácido nucleico aislado que incluye una secuencia que codifica la cadena de inmunoglobulina de la reivindicación 1
- 32 Un ácido nucleico aislado que incluye una secuencia que codifica la cadena de inmunoglobulina de la reivindicación 3
- 33 Un vector que incluye el ácido nucleico de la reivindicación 31
- 34 Un vector que incluye el ácido nucleico de la reivindicación 32
- 35 Una célula anfitriona que incluye un ácido 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 o SEQ ID NOs 16-18
- 36 La célula anfitriona de la reivindicación 35 donde la célula es una célula de bacteria, una célula de levadura, una célula de planta, una célula de insecto, o una célula de mamífero
- 37 La célula anfitriona de la reivindicación 36 donde la célula de un mamífero es una célula de hibndoma

- 38 Una célula anfitriona que incluye un ácido nucleico que codifica SEQ ID NOs 19 20 21 22 23 24 25 o 26
- 39 La célula anfitriona de la reivindicaciones 38 donde la célula es una célula de bacteria una célula de levadura una célula de planta una célula de insecto, o una célula de mamífero
- 40 La célula anfitriona de la reivindicación 36 donde la célula de un mamífero es una célula de hibridoma

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud 22) Fecha de solicitud (30) Prioridad (31) 60/569,892 (32) 10/05/04 (33) US		(51) Int Cl A61K 39/395 (71) Solicitante(s) ABGENOMICS CORPORATION (72) Inventor(es) RONG-HWA LIN Y OTROS (74) Apoderado EMILIO FERRERO	
(85) Fecha límite inicio fase nacional 10/12/2006 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud 10/05/2005 No de solicitud PCT/US2005/016357		(87) Publicación Internacional Fecha 24/11/2005 N° publicación WO 2005/110475 A2	
(54) Título ANTICUERPOS			

Reivindicación(es)

- 1

Una cadena de inmunoglobulina que incluye respectivamente, 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 o SEQ ID NOs 16-18
- 2

La cadena de inmunoglobulina de la reivindicación 1 donde la cadena de inmunoglobulina incluye SEQ ID NOs 1-3 o SEQ ID Nos 4-6
- 3

La cadena de inmunoglobulina de la reivindicación 1, donde la cadena de inmunoglobulina incluye SEQ ID NOs 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26
- 4

La cadena de inmunoglobulina de la reivindicación 3 donde la cadena de inmunoglobulina incluye SEQ ID NO- 25 o 26
- 5

Un anticuerpo, que incluye una primera cadena de inmunoglobulina de la reivindicación 1 y una segunda cadena de inmunoglobulina también de la cadena 1 donde la primera cadena la cual es de
- 6

El anticuerpo de la reivindicación 5, donde la cadena liviana y la cadena pesada contienen, respectivamente, SEQ ID NOs 1-3 y SEQ ID NOs 4-6
- 7

El anticuerpo de la reivindicación 5, donde la cadena liviana y la cadena pesada contienen respectivamente, SEQ ID NOs 19 y 20, 21 y 22, 23 y 24 o 25 y 26
- 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, o SEQ ID NOs 13-15 y SEQ ID NOs 16-18

74.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Nº 08-123238-00000-0000
FOLIO 1240 1/2402 LOP ARD NUCLEO ALUMINIO
NO 11 PATENTE
LIVRO 3/8 HABENAJUALI
ACT 411 PRESENTACION FOLIO 14

RECIBO OFICIAL DE CAJA 06 90,820
FECHA NOVIEMBRE 27 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PAGO	Vr PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050 00110-6	59936393	27/11/2006	44,802,000 00

***** CONCEPTO *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL DE PATENTE DE IN	463,000 00
		TOTAL	463,000 00

SON CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

6060 15277 841 003 4

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

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

COMPLETA ☐

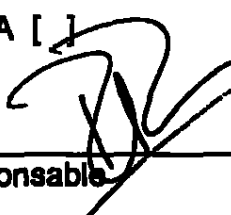
INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Firma Responsable 

Fecha **06 DIC. 2006**

Carraera 13 No 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador 3 82 08 40
Fax. 350 52 20
E-mail info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D C , Colombia

76

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
ABGENOMICS CORPORATION

REFERENCIA	Radicación No	06 123236
	Solicitud internacional	PCT/US2005/016357
	Fecha inicio fase nacional	10/12/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No	

- - - - - **856**

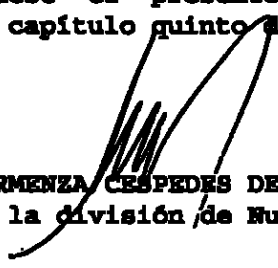
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se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

1 La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante (Art 26-k) Decisión 486

2 El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente (Regla 4 3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular Única 5 2 9)

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

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5 2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No 10 de 2001.


ALIX CARMONA CRESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 26 ENE 2007
adpa10

99

U

U

,

,
