

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

EDIFICIO
CARRERA
BOGOTÁ

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-123236-00008-0000

Fecha: 2012-05-11 17:27:06 Dep. 2020 DIR. NUEVAS CREATIVIDADES
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONAL I
Act. 444 RESPUESTA REQUE Folios: 73

47 3611
11 8650
00 4814
05 7743

Señor Director
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONAL I
Act. 444 RESPUESTA REQUE Folios: 72

Trámite : 011
Evento : 378
Actuación : 444

Referencia : Expediente No. **06.123.236**
Asunto : Solicitud de patente para: **POLIPÉPTIDOS QUE CONTIENEN CDRS DE CADENA LIVIANA O PESADA DE INMUNOGLOBULINA DE ANTICUERPOS ANTI-PSGL-1**
Solicitante : **ABGENOMICS COÖPERATIEF U.A.**
Fecha solicitud : 06 de diciembre de 2006

1. Yo, Luz Clemencia DE PÁEZ, en mi condición de apoderada de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, me refiero al oficio No. **28** notificado por fijación en lista del 05 de enero de 2012.

2. Mediante memorial radicado el día 28 de marzo de 2012, solicité plazo de treinta (30) días para atender el oficio No. **28**.

3. Mediante oficio No. **28** se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Las observaciones realizadas en el oficio son las siguientes:

3.1 Excepción a la patentabilidad

Se objeta el objeto de las reivindicaciones 21 a 29 por cuanto se refiere a la forma de usar en anticuerpo de la solicitud para tratar a un individuo con determinada patología. El Examinador solicita eliminar estas reivindicaciones.

3.2 Reivindicaciones relativas a un uso

A este respecto, se indica que las reivindicaciones 18 y 19 no son patentables de acuerdo con el artículo 14 de la Decisión 486.

3.3 Unidad de invención

El Examinador, basado en el trámite Europeo para la invención equivalente en dicho territorio, indica que la presente solicitud contiene dos grupos inventivos.

El primero conformado por las reivindicaciones 1, 3, 5, 7, 23 a 28 (parcialmente); 2, 4, 6 y 8 a 22 (totalmente).

El segundo grupo, está conformado por las reivindicaciones 1, 3, 5, 7, y 23 a 28 (parcialmente). Se afirma que el concepto común entre estos dos grupos es que los anticuerpos se unen a PSGL-1 en células T activas y que dicho concepto común ya había sido revelado por el documento US 2003/049252.

3.4 Reivindicaciones

De manera resumida, el Examinador expone lo siguiente:

- El pliego reivindicatorio debe ser modificado para reclamar un único grupo inventivo
- Las reivindicaciones 1, 2 y 3 deben definir las 6 CDRs o las regiones variables de las mismas
- Las características definidas en las reivindicaciones 9, 12, 19 y 20 deben ser colocadas en reivindicaciones dependientes de la principal
- La materia de las reivindicaciones 11, 15 a 17 y 33 ya ha sido reclamada en reivindicaciones precedentes
- El ácido nucleótido de la reivindicación 30 debe definirse a partir de las secuencias que lo conforman
- La célula anfitriona de la reivindicación 34 se debe definir como una célula recombinante o una línea celular determinada e indicar un número de depósito
- Las células anfitrionas recombinantes de bacteria, levadura planta e insecto reclamadas en la reivindicaciones 35 y 38, que expresan el anticuerpo de la solicitud carecen de sustento en la descripción

3.5 Análisis de patentabilidad

3.5.1 Novedad

El Examinador ha citado el documento D1: WO 2003/0049252 titulado "MODULATORS OF P-SELECTIN GLYCOPROTEIN LIGAND 1", considerando que afecta la

novedad de la presente solicitud al revelar un anticuerpo monoclonal anti-PSGL-1 de ratón TAB4, el cual induce la muerte celular de células T cuando se une a ellas.

4. Respuesta a las objeciones

De este modo y con el objeto de atender las objeciones arriba mencionadas, se desea presentar las siguientes modificaciones, aclaraciones y argumentos:

4.1 Modificación de una solicitud en trámite

De acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, donde se establece que la modificación de una solicitud es posible en cualquier momento del trámite mientras no implique una ampliación de la solicitud inicial, me permito un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 25 reivindicaciones.

Así, siguiendo las amables sugerencias del Examinador se han realizado las siguientes modificaciones:

- Se ha limitado el pliego reivindicatorio a un único concepto común inventivo, es decir, un anticuerpo aislado, que incluye una primera cadena de inmunoglobulina y una segunda cadena de inmunoglobulina, en donde la primera cadena, la cual es la cadena liviana y la segunda cadena, la cual es la cadena pesada, contienen, respectivamente SEQ ID NOs: 1 a 3 y SEQ ID NOs: 4 a 6. Este grupo corresponde al primer grupo inventivo señalado por el Examinador.
- Las reivindicaciones objetadas por no definir tanto la cadena pesada como la cadena ligera no se incluyen en el pliego reivindicatorio
- La anterior reivindicación 9 (nueva reivindicación 4) ha sido modificada para depender de la reivindicación 1
- Se ha modificado el preámbulo de las reivindicaciones que señalan la actividad, epítipo o uso del anticuerpo, para que dependan de las reivindicaciones del anticuerpo de la invención.
- No se incluyen reivindicaciones que repiten materia incluida en reivindicaciones precedentes

- Las reivindicaciones relacionadas con el ácido nucleico han sido modificadas para señalar las secuencias que constituyen la totalidad del anticuerpo
- El preámbulo de las reivindicaciones relacionadas con la célula anfitriona han sido modificados para indicar que ésta es recombinante.
- Se incluyen las nuevas reivindicaciones 20 a 25. Esta modificación está basada en el contenido de la descripción, páginas 5 a 7, 11 a 12 y 23 a 27.
- No se incluyen las reivindicaciones objetadas por el Examinador.

Las anteriores modificaciones permiten entonces presentar la materia reivindicada de manera más clara y en concordancia con las disposiciones actuales de la Decisión 486.

Sin embargo y teniendo en cuenta algunos comentarios del Examinador, deseamos manifestar lo siguiente:

En primer lugar, el Examinador ha solicitado el número de depósito para la célula anfitriona. A este respecto, solicitamos atentamente tener en cuenta que el preámbulo de las reivindicaciones relacionadas con las células anfitrionas ha sido modificado para señalar que es recombinante. De otro lado, es relevante mencionar que la descripción de la solicitud indica cómo obtener las células anfitrionas de acuerdo con la invención (ver página 7). Por lo tanto, no se considera necesario un depósito.

Igualmente, solicitamos tener en cuenta que las reivindicaciones 35 y 38 (nuevas reivindicaciones 14 y 17) se encuentran soportadas en la descripción, página 7.

En relación con las anteriores dos consideraciones, la página 7 de la descripción señala:

"[...] 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 trasfección de fosfato de calcio, trasfección 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 nucleico descrito 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".

En consecuencia, se considera que el pliego reivindicatorio y las aclaraciones acá señaladas permiten superar las objeciones que por falta de claridad o soporte formuló el Examinador. Solicitamos atentamente tener en cuenta este nuevo pliego reivindicatorio para el análisis de patentabilidad correspondiente.

4.2 Argumentos a favor de la patentabilidad de la solicitud

Siguiendo los lineamientos actuales, se considera que una anterioridad puede afectar la novedad de una solicitud cuando revela todas y cada una de las características técnicas esenciales de la invención.

El documento D1 citado por el Examinador revela compuestos que se unen a PSGL-1 a la superficie de las células T o de células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés) y que pueden ser empleados para inducir la reducción o la apoptosis de dichas células. Los compuestos y métodos de la invención pueden ser empleados para controlar respuestas inmunológicas no deseadas mediadas por células T o células T en condiciones tales como enfermedades autoinmunes, rechazo de transplante y enfermedades alérgicas.

Ahora bien, como se ha indicado arriba, la anterior reivindicación 9 (nueva reivindicación 4) ha sido modificada para depender de la reivindicación 1. Por lo tanto, la nueva reivindicación 4 contiene tanto las características de la reivindicación 1 como de las detalladas en ella y tal como puede ser establecido por una persona medianamente versada en la materia, el documento D1 no revela un anticuerpo aislado, que incluye una primera cadena de inmunoglobulina y una segunda cadena de inmunoglobulina, en donde la primera cadena, la cual es la cadena liviana y la segunda cadena, la cual es la cadena pesada, contienen, respectivamente SEQ ID NOs: 1 a 3 y SEQ ID NOs: 4 a 6.

Por consiguiente, se establece que la objeción por novedad formulada se ve superada.

De otro lado, a pesar de que no se ha comunicado una objeción por falta de nivel inventivo en vista del documento D1, con el fin de agilizar el trámite de esta solicitud, se desea poner de presente la siguiente información:

La presente solicitud hace referencia a un anticuerpo que incluye una primera cadena de inmunoglobulina y una segunda cadena de inmunoglobulina, en donde la primera cadena, la cual es la cadena liviana y la segunda cadena, la cual es la cadena pesada, contienen, respectivamente SEQ ID NOs: 1 a 3 y SEQ ID NOs: 4 a 6, en donde el anticuerpo 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 y en 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.

El documento D1 no contiene enseñanzas o sugerencias que motiven a la persona medianamente versada en la materia a obtener un anticuerpo con las características mencionadas. D1 en particular, no contiene enseñanza alguna sobre el efecto de los anticuerpos allí revelados, incluyendo el TAB4, después de su unión entre PSGL-1 y la P-Selectina. En consecuencia, una persona medianamente versada en la materia que busca obtener un anticuerpo como el de la presente invención no encuentra enseñanzas claras en D1 que lo lleven a seleccionar de manera obvia el anticuerpo anti-PSGL-1 humano, el cual una vez se une a PSGL-1 en células T activadas, induce la muerte celular sin interferir con la unión entre PSGL-1 y la P-Selectina.

La característica mencionada no era sugerida por D1. Un anticuerpo que se une a PSGL-1 en células T activadas e induce la muerte celular sin interferir en la unión entre PSGL-1 y la P-Selectina **no resulta de una selección arbitraria**. Esto se evidencia a partir de la descripción de la presente invención, en donde se demuestra que otros dos anticuerpos humanos anti-PSGL-1 bloquean la unión entre PSGL-1 y la P-Selectina.

Conclusión

En vista de las modificaciones y los argumentos presentados, es posible concluir que el pliego reivindicatorio de la presente solicitud resulta claro, que se encuentra debidamente soportado, que no incluye materia no patentable y que el documento D1 no resulta una anterioridad válida capaz de afectar la novedad o el nivel inventivo de la presente solicitud, por lo que las objeciones formuladas en este sentido se ven superadas.

Por otra parte, solicitamos tener en cuenta que la presente solicitud no puede ser negada con base en otros documentos que no hayan sido citados durante el trámite, **ya que dicho negación se opondría al texto y al espíritu del Artículo 45 de la Decisión 486 y violaría la garantía del debido proceso consagrada en el artículo 29 de la Constitución Política.**

4.3 Presentación de una solicitud divisional

Como consecuencia de las observaciones comunicadas en el oficio No. 28 y con fundamento en el artículo 36 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, que faculta al solicitante para que en cualquier momento del trámite divida la solicitud en dos o más fraccionarias, presento junto con este escrito una solicitud de división de la materia de la presente solicitud, acompañada por la memoria descriptiva y pliego reivindicatorio conformado por 40 reivindicaciones.

Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de la fecha 06 de diciembre de 2006.

De acuerdo con el artículo 36 de la Decisión 486, manifiesto a ese Despacho que la materia de la presente solicitud queda cubierta por la prioridad Estadounidense No. 60/569,892 del 10 de mayo de 2004 y por lo tanto ésta no implica una ampliación de la protección que corresponda a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

En consecuencia, solicito a ese Despacho admitir a trámite la presente solicitud divisional.

5. Puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, atentamente solicito que se continúe su tramitación.

6. Anexos

- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 25 reivindicaciones para la solicitud madre
- Formulario de modificaciones en solicitud pendiente
- Recibo por concepto de presentación de quince (15) reivindicaciones adicionales a la décima por valor de \$450.000
- Solicitud de división de solicitud
- Memoria descriptiva de la solicitud divisional
- Pliego reivindicatorio de la solicitud divisional conformado por 40 reivindicaciones

CAVELIER
ABOGADOS

- Recibo por concepto de presentación de solicitud
- Recibo por presentación de treinta (30) reivindicaciones adicionales a la décima por valor de \$900.000.
- Copia del poder a mí otorgado por el solicitante

Señor Director,


LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

T.P.A. No. 23.555

COLO-17516-843-002-3

COLO-17516-841-001-7

COLO-15277-841-003-4

 JMS\JMS\ID-216820\WPC17516

No. M-2012-216820\JMS



Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

1

SOLICITUD DE:
☐ Corrección de Error Material ☒ Modificación a una solicitud

2

SOLICITANTE

Nombre: ABGENOMICS COÖPPERATIEF U.A.

Sociedad constituida y existente bajo las leyes de los Países Bajos.

Dirección: Strawinskylaan 3111,
1077 ZX Amsterdam,
Países Bajos

Domicilio: Amsterdam,
Países Bajos

Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número: _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: Luz Clemencia de PAEZ

Dirección: Carrera 4ª No. 72-35

Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11

E-mail: cavelier@cavelier.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número: 35.456.344 TP 23.555

4

Número de expediente: 06.123.236

5

Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 25 reivindicaciones con el fin de superar las objeciones hechas por Su Despacho a la presente solicitud de patente y pido respetuosamente que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas.

6

Comprobante de pago No. 12-0039350 Fecha: 23 de abril de 2012

Comprobante de pago No. 12-0041842 Fecha: 27 de abril de 2012

Comprobante de pago No. 12-0032597 Fecha: 02 de abril de 2012

7

Anexos

☐ Comprobante de pago de la tasa por \$120.000.oo, por concepto de modificaciones.

☒ Comprobante de pago por 15 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$450.000.oo

☐ Poderes, si fuere el caso

☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

☐ Copia auténtica de la sustitución que del poder otorgado por la Sociedad Solicitante hizo el Doctor EMILIO FERRERO a mi favor, y para lo cual solicito me sea reconocida personería para continuar con el trámite del asunto de la referencia.

10

8	NOMBRE:	LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	FIRMA:	<i>Luz Clemencia de Paez</i>
				C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P.A. 23.555
JMS				



Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO ÚNICO DE CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1 SOLICITUD DE: ☐ Conversión.☒ División☐ Fusión		
☐ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Registro de Diseño Industrial☐ Esquemas de Trazado para Circuitos Integrados		
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: ABGENOMICS COÖPPERATIEF U.A. Sociedad constituida y existente bajo las leyes de los Países Bajos. Dirección: Strawinskylaan 3111, 1077 ZX Amsterdam, Países Bajos Domicilio: Amsterdam, Países Bajos Teléfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70 E-mail: clientes@cavelier.com	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11 E-mail: cavelier@cavelier.com.	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>35.456.344</u> T.P. <u>23.555</u>
4 CONVERSIÓN Expediente No: _____ De: _____ A: _____	5 DIVISIÓN Expediente No: <u>06.123.236</u> No. de Divisionales: <u>1</u>	6 FUSIÓN Expediente No: _____ Expediente No: _____
7 Comprobante de pago No.: <u>12-0041873</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0041841</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0044560</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0025033</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0025034</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0025035</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0032602</u> Fecha: <u>27 de abril de 2012</u> Fecha: <u>27 de abril de 2012</u> Fecha: <u>07 de mayo de 2012</u> Fecha: <u>12 de marzo de 2012</u> Fecha: <u>12 de marzo de 2012</u> Fecha: <u>12 de marzo de 2012</u> Fecha: <u>02 de abril de 2012</u>		

12

8	Anexos ☒ Comprobante de pago de la tasa por \$590.000.oo ☒ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por. ☒ Poderes, si fuere el caso ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas. ☒ Copia de la Solicitud Divisional.
9	NOMBRE: <u>LUZ CLEMENCIA DE PAEZ</u> FIRMA : <u>Luiz Clemencia de Paez</u> C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555
JMS	

13

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 06.123.236. La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de las observaciones hechas por ese Despacho y que fueron dadas a conocer al solicitante por medio del oficio No. 0028 notificado por fijación en lista del 05 de enero de 2012. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 06 de diciembre de 2006 y la prioridad que allí se reivindica del 10 de mayo de 2004

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 06.123.236

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, que incluye una primera cadena de inmunoglobulina y una segunda cadena de inmunoglobulina, en donde la primera cadena, la cual es la cadena liviana y la segunda cadena, la cual es la cadena pesada, contienen, respectivamente SEQ ID NOs: 1 a 3 y SEQ ID NOs: 4 a 6.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cadena liviana y la cadena pesada contienen, respectivamente, SEQ ID NOs: 19 y 20, o 25 y 26.
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la cadena liviana y la cadena pesada contienen, respectivamente, SEQ ID NOs: 25 y 26.
4. El anticuerpo aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo 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 y en 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.
5. El anticuerpo aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo se fija específicamente a los residuos aminoácidos 115 a 126 del Ligando 1 Glicoproteína P-Selectina humano.
6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo se fija específicamente a los residuos amino ácidos 117 a 123.
7. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el anticuerpo se fija específicamente a los residuos amino ácidos 119 a 121.
8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, en 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.
9. Un ácido nucleico aislado que incluye una secuencia que codifica las SEQ ID NOs: 1 a 3 y SEQ ID NOs. 4 a 6.
10. Un ácido nucleico aislado que incluye una secuencia que codifica las SEQ ID NOs: 19 y 20, o 25 y 26.

11. Un vector que incluye el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9.
12. Un vector que incluye el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10.
13. Una célula anfitriona recombinante que incluye un ácido nucleico que codifica las SEQ ID NOs: 1 a 3 y SEQ ID NOs: 4-6.
14. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 13, en 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.
15. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la célula de mamífero es una célula de hibridoma.
16. Una célula anfitriona recombinante que incluye un ácido nucleico que codifica las SEQ ID NOs: 19 y 20, o 25 y 26.
17. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 16, en 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.
18. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la célula de mamífero es una célula de hibridoma.
19. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
20. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
21. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada de IgG1, IgG2 o IgG4 humanas.
22. Un anticuerpo aislado que se fija específicamente al Ligando 1 Glicoproteína P-Selectina, en donde el anticuerpo comprende: (i) una cadena ligera que incluye una región variable con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 25 unida a la región constante de cadena ligera kappa humana y (ii) una cadena pesada que incluye una región variable con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 26.

23. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada de IgG1, IgG2 o IgG4 humana.

24. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el anticuerpo comprende: (i) una cadena ligera que incluye una región variable con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25 unida a la región constante de cadena ligera kappa y (ii) una cadena pesada que incluye una región variable con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26 unida a la región constante de cadena pesada IgG4 humana.

25. Una composición que comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o 19 a 24.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0046924

Bogotá D.C., Mayo 11 de 2012 - 17:17:12

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	32597	02/04/2012		5.000.00
RECIBO DE CA	999999999	39350	23/04/2012		345.000.00
RECIBO DE CA	999999999	41842	27/04/2012		100.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
15 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	450.000.00
			\$450.000.00

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-123236- -00008-0000

Fecha: 2012-05-11 17:27:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASCRI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 73

Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 72

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 11 de 2012 - 17:17:13



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TÍTULO** _____ POLIPEPTIDOS QUE CONTIENEN CDRS DE CADENA LIVIANA O

_____ PESADA DE INMUNOGLOBULINA DE ANTICUERPOS ANTI-PSGL-1

_____ APLICACIONES RELACIONADAS

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** _____ ABGENOMICS COOPERATIEF U.A.

DOMICILIO _____ AMSTERDAM, PAISES BAJOS

74. **APODERADO** _____ LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D. C.,** _____



Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO ÚNICO DE CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1 SOLICITUD DE: ☐ Conversión.☒ División☐ Fusión		
☐ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Registro de Diseño Industrial☐ Esquemas de Trazado para Circuitos Integrados		
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: ABGENOMICS COÖPPERATIEF U.A. Sociedad constituida y existente bajo las leyes de los Países Bajos. Dirección: Strawinskyiaan 3111, 1077 ZX Amsterdam, Países Bajos Domicilio: Amsterdam, Países Bajos Teléfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70 E-mail: clientes@cavelier.com	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11 E-mail: cavelier@cavelier.com.	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>35.456.344</u> T.P. <u>23.555</u>
4 CONVERSIÓN Expediente No: _____ De: _____ A: _____	5 DIVISIÓN Expediente No: <u>06.123.236</u> No. de Divisionales: <u>1</u>	6 FUSIÓN Expediente No: _____ Expediente No: _____
7 Comprobante de pago No.: <u>12-0041873</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0041841</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0044560</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0025033</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0025034</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0025035</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0032602</u> Fecha: <u>27 de abril de 2012</u> Fecha: <u>27 de abril de 2012</u> Fecha: <u>07 de mayo de 2012</u> Fecha: <u>12 de marzo de 2012</u> Fecha: <u>12 de marzo de 2012</u> Fecha: <u>12 de marzo de 2012</u> Fecha: <u>02 de abril de 2012</u>		

8

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa por \$590.000.00
- ☒ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por.
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.
- ☒ Copia de la Solicitud Divisional.

9

NOMBRE:LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**FIRMA :**Luz Clemencia de Paez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

JMS

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 06.123.236. La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de las observaciones hechas por ese Despacho y que fueron dadas a conocer al solicitante por medio del oficio No. 0028 notificado por fijación en lista del 05 de enero de 2012. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 06 de diciembre de 2006 y la prioridad que allí se reivindica del 10 de mayo de 2004

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 06.123.236

Notaría
Sexta

6

DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.

COPIA NUMERO 2

DE LA ESCRITURA NUMERO: 0652
FECHA: 10/Febrero/2010

ACTO O CONTRATO:
PODER GENERAL
OTORGANTES:
CAVELIER ABOGADOS
GERMAN HUMBERTO MARIN RUALES



CERTIFICADO SC 3980-1
PRESTACION DEL
SERVICIO PUBLICO
NOTARIAL
ISO 9001:2000
NTC-ISO 9001:2000



AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA SEXTA

CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41

Correo Electrónico: notaria6debgta@etb.net.co



ESCRITURA PUBLICA NUMERO: 652 - - - - -

SEISCIENTOS CINCUENTA Y DOS - - - - -

FECHA: FEBRERO DIEZ (10) - - - - -

DEL AÑO DOS MIL DIEZ (2010) - - - - -

NOTARIA SEXTA (6ª) DE BOGOTA D.C.-----

CLASE DE ACTO: PODER ESPECIAL

RAZON SOCIAL : CAVELIER ABOGADOS NIT : 860.041.367-3

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, ante mí AMPARO QUINTERO -----

ARTURO - - - - - Notaria Sexta (6a) - - - - - de éste

Círculo Notarial, se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes términos: - - - - -

CONSTANCIA SOBRE COMPARECENCIA Y DECLARACIONES ANTE EL NOTARIO : - - - - -

COMPARECIO : Con minuta (correo electrónico) compareció el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, mayor de edad, vecino de esta ciudad, casado, identificado con la cédula de ciudadanía No. 19.066.425 de Bogotá, y dijo: - - - - -

ESTIPULACIONES:

PRIMERA. Que obra en su calidad de representante legal de la sociedad denominada CAVELIER ABOGADOS, NIT : 860.041.367-3 domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia. - - - - -

SEGUNDA: Que **ABGENOMICS COÖPERATIEF U.A.**, sociedad constituida y existente bajo las leyes de Holanda, domiciliada en Strawinskylaan 3111, 1077 ZX Holanda, designó a **CAVELIER ABOGADOS** como su representante para la Propiedad Industrial en Colombia con facultades de nombrar apoderados tal como consta en la copia auténtica del documento de representación que se protocoliza.

TERCERA. Que en su carácter de representante legal de **CAVELIER ABOGADOS**, y en desarrollo de la facultad otorgada por **ABGENOMICS COÖPERATIEF U.A.**, confiere poder a los abogados **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**, T.P.A. No. 23.555, identificada con cédula de ciudadanía número 35.456.344 de Usaquen, **NIDIA OSORIO LOPEZ**, T.P.A. No. 73.366, identificada con cédula de ciudadanía número 39.787.682 de Bogotá, **OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA**, T.P.A. No. 71.027, identificado

con cédula de ciudadanía número 79.524.634 de Bogotá y **EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY**, T.P.A. No. 65.794, identificada con cédula de ciudadanía número 52.006.265 de Bogotá y **JORGE CHAVARRO ARIZTIZABAL**, T.P.A. No. 40.119, identificado con cédula de ciudadanía número 16.209.380 de Cartago (Valle), mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo 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, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, 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, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, acción por infracción, concesión de licencias, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; acciones populares, de tutela y de cumplimiento; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

CUARTO. Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos. **QUINTO-** Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la sociedad **CAVELIER ABOGADOS**, igualmente protocoliza copia autenticada del documento de representación otorgado el día 8 de octubre de 2009 Por la Sociedad **ABGENOMICS COÖPERATIEF U.A** documento que está debidamente legalizado por Apostilla.-----



01



* 8 9 2 5 4 8 8 7 *

24

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

1 DE FEBRERO DE 2010 HORA 15:36:29

R027404463

PAGINA: 1 de 3

* EN JUNIO DE ESTE AÑO SE ELEGIRAN JUNTA DIRECTIVA Y REVISOR FISCAL *
* DE LA CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA. LAS INSCRIPCIONES DE *
* CANDIDATOS DEBEN HACERSE EN LA PRIMERA QUINCENA DE MAYO. *
* PARA INFORMACION DETALLADA DIRIGIRSE A LA SEDE PRINCIPAL, QUINTO *
* PISO, O COMUNICARSE AL SIGUIENTE TELEFONO: 5941000 EXTENSION 2899.*

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS

CERTIFICA:

NOMBRE : CAVELIER ABOGADOS

N.I.T. : 860041367-3

DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA:

NO: 00820237

CERTIFICA:

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0006233 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE SEPTIEMBRE DE 1974 , INSCRITA EL 26 DE SEPTIEMBRE DE 1974 BAJO EL NUMERO 00021234 DEL LIBRO IX, SE CONSTITUYO LA SOCIEDAD CIVIL DENOMINADA: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001000 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE MARZO DE 1983 , INSCRITA EL 5 DE ABRIL DE 1983 BAJO EL NUMERO 00130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER. POR EL DE : CAVELIER ABOGADOS

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1.000 OTORGADA EN LA NOTARIA 6A. DE BOGOTA EL 10 DE MARZO DE 1.983, INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE ABRIL DE 1.983 BAJO EL NUMERO 130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER, POR EL DE: CAVELIER ABOGADOS, E INTRODUJO OTRAS REFORMAS.

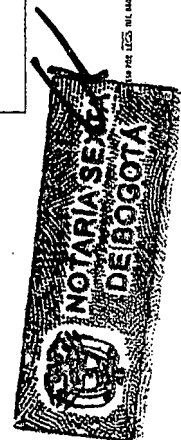
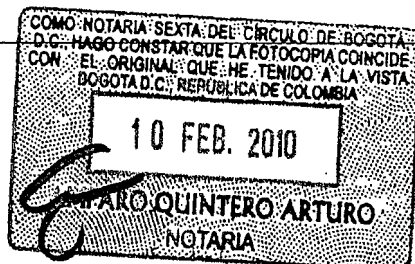
CERTIFICA:

CERTIFICA

QUE POR E.P.NO. 2.034 DE LA NOTARIA 6 DE SANTAFE DE BOGOTA DEL 18 DE ABRIL DE 1.995, INSCRITA EL 27 DE ABRIL DE 1.995 BAJO EL NO. 5.937 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD TRASLADO SU DOMICILIO DE LA CIUDAD DE SANTAFE DE BOGOTA D.C. AL MUNICIPIO DE TABIO (CUNDINAMARCA) .-.

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 7710 DE LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA DEL 10 DE OCTUBRE DE 1984, INSCRITA EL 15 DE NOVIEMBRE DE 1984 BAJO EL NO. 1559 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD CAMBIO SU



NATURALEZA JURIDICA DE SOCIEDAD COMERCIAL A SOCIEDAD CIVIL

CERTIFICA:

REFORMAS:

ESCRITURAS NO.	FECHA	NOTARIA	INSCRIPCION
842	10-V-1.977	18. BTA.	27-V-1.977-NO. 46.204
3.430	1-VII-1.980	6A. BTA.	3-IX-1.980-NO. 89.582
4.844	10-IX-1.980	6A. BTA.	8-X-1.980-NO. 91.261
432	10-II-1.983	6A. BTA.	1-III-1.983-NO.129.337
7.710	10-X-1.984	6A. BTA.	15-XI-1.984-NO. 1.559
7.305	21-X-1.985	6A. BTA.	18-XI-1.985-NO. 1.906
2.567	29-IV-1.987	6A. BTA.	7-V- 1.987-NO. 2.386
4.278	3-VII-1.987	6A. BTA.	23-VII-1987 NO.215.652
2.657	25- IV-1.988	6A. BTA.	19- V -1988-NO. 2,740
9.033	21-XII-1.990	6A. BTA.	10- I - 1991-NO. 3.786
25	3- I -1.991	6A. BTA.	10- I - 1991-NO. 3.787
1.608	8-III-1.991	6A. BTA.	14-III- 1991-NO. 3.841
2.155	2-IV- 1.991	6A. BTA.	8-IV - 1991-NO. 3.862
797	7-II -1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO. 3.882
1.739	14-III-1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO. 3.881
5.886	21-VIII-1.991	6A. BTA.	27-VIII-1991 NO. 4.019
8.596	4-XII -1.991	6A. BTA.	16-III -1992 NO. 4.430
1.494	10-III -1.992	6A. BTA.	19-III -1992 NO. 4.436
4.205	8 -VII -1.992	6A. BTA.	15-VII -1992 NO. 4.554
8.829	16-XII -1.992	6A. BTA.	24-XII -1992 NO. 4.819
12	5-I -1.993	6 STAFE BTA	13-I -1993 NO. 4.850
4.877	29-VI -1.993	6 STAFE BTA	7-VII -1993 NO. 5.065
5.216	12-VII -1.993	6 STAFE BTA	16-VII -1993 NO. 5.077
ACTA NO.71	2-IX- 1.993	JUNTA DE SOCIOS	29-IX- 1993 NO. 5.174
2.034	18-IV- 1.995	6 STAFE BTA	27- IV -1995 NO. 5.937
2.227	25-IV-1.995	6 STAFE BTA	18-VIII-1.995 NO. 6.092
7.594	12-XII-1.995	6 STAFE BTA	19- XII-1.995 NO. 6.294
676	11- II-1.997	6 STAFE BTA	14- II -1.997 NO. 6.873

CERTIFICA:

REFORMAS:

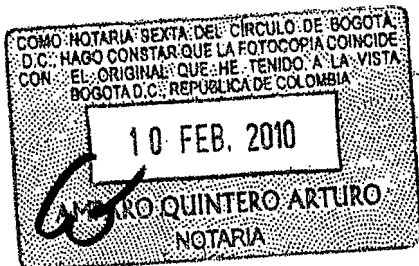
E.P. NO.	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	FECHA	NO. INSC.
0004506	1997/07/28	0006	BOGOTA D.C.	1997/09/02	00007115
0002103	1998/04/08	0006	BOGOTA D.C.	1998/04/21	00007426
0005326	1998/08/06	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/13	00007544
0005538	1998/08/14	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/27	00007564
0007760	1998/11/10	0006	BOGOTA D.C.	1998/11/12	00007644
0006709	1997/11/04	0006	BOGOTA D.C.	2000/12/04	00008481
0003034	2003/05/30	0006	BOGOTA D.C.	2003/06/04	00882729
0003786	2004/07/16	0006	BOGOTA D.C.	2004/07/28	00009703
0001432	2005/03/18	0006	BOGOTA D.C.	2005/04/07	00009917
0004818	2005/08/22	0006	BOGOTA D.C.	2005/08/26	00010008
0005506	2007/07/17	0006	BOGOTA D.C.	2007/07/24	00010841
5453	2009/10/19	0006	BOGOTA D.C.	2009/10/21	00012243

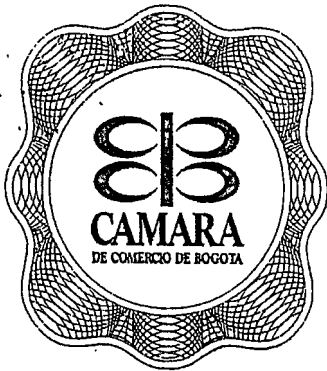
CERTIFICA:

VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE SEPTIEMBRE DE 2024 .

CERTIFICA:

OBJETO SOCIAL: LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD PROFESIONAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO LA SOCIEDAD PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL MISMO, INCLUSIVE LOS DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN





01



* 8 9 2 5 4 8 8 8 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

1 DE FEBRERO DE 2010 HORA 15:36:29

R027404463

PAGINA: 2 de 3

* * * * *

INTERES, MANDATO CIVIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO PARTICIPAR EN ASOCIACIONES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES SIN ANIMO DE LUCRO.

CERTIFICA:

CAPITAL Y SOCIOS: \$10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR NOMINAL DE \$1.00 CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI :

- SOCIO CAPITALISTA (S)

ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO

N.I.T. 000008001722568

NO. CUOTAS: 8,800.00

VALOR: \$8,800.00

GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE

C.E. 000000000131100

NO. CUOTAS: 1,200.00

VALOR: \$1,200.00

- SOCIO INDUSTRIAL (S)

CHAVARRO JORGE

C.C. 000000016209380

NO. CUOTAS: 0.00

VALOR: \$0.00

SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA

C.C. 000000035456344

NO. CUOTAS: 0.00

VALOR: \$0.00

PEÑA VALENZUELA DANIEL

C.C. 000000079518915

NO. CUOTAS: 0.00

VALOR: \$0.00

MARIN RUALES GERMAN HUMBERTO

C.C. 000000079155665

NO. CUOTAS: 0.00

VALOR: \$0.00

TOTALES

NO. CUOTAS: 10,000.00

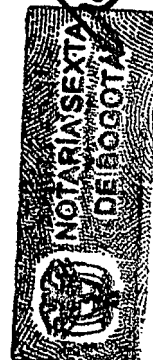
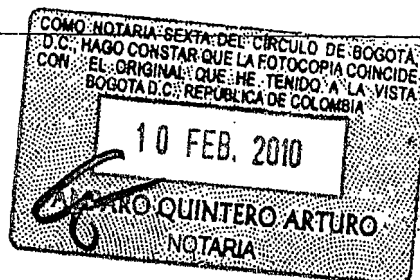
VALOR: \$10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS (1200) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, INES CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO, Y LUCIA CAVELIER FRANCO.

CERTIFICA:

REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL ES EL DIRECTOR. EL SOCIO FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA EL CARACTER DE PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA ABSOLUTA DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTÁN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACIÓN DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO, SIN PERJUICIO DE LAS DELEGACIONES CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES



ESTATUTOS

CERTIFICA:

** NOMBRAMIENTOS **

QUE POR NO. 12 DE JUNTA DE SOCIOS DEL 14 DE AGOSTO DE 2009, INSCRITA EL 24 DE SEPTIEMBRE DE 2009 BAJO EL NUMERO 00012200 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
DIRECTOR (REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO) GALLON GIRALDO CARLOS	C.C. 000000019066425
QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):	

NOMBRE	IDENTIFICACION
PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO CAVELIER GAVIRIA GERMAN	C.C. 000000002877924
SUPLENTE DEL PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100

CERTIFICA:

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA (180) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION PREVIA DEL CONSEJO SUPERIOR.

CERTIFICA:

** REVISOR FISCAL **

QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

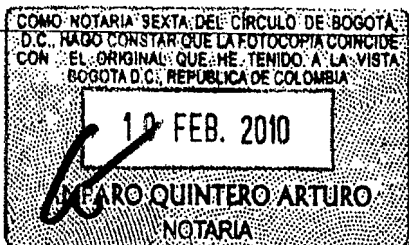
NOMBRE	IDENTIFICACION
REVISOR FISCAL RINCON FANDIÑO MIGUEL ALFONSO	C.C. 000000002877024

CERTIFICA:

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS EN LA VIA GUBERNATIVA.

* * * EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE * * *
* * * FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO * * *

SEÑOR EMPRESARIO, SI SU EMPRESA TIENE ACTIVOS INFERIORES A 30.000 SMLMV Y UNA PLANTA DE PERSONAL DE MENOS DE 200 TRABAJADORES, USTED TIENE DERECHO A RECIBIR UN DESCUENTO EN EL PAGO DE LOS PARAFISCALES DE



28
26



01



* 8 9 2 5 4 8 8 9 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

1 DE FEBRERO DE 2010

HORA 15:36:29

R027404463

PAGINA: 3 de 3

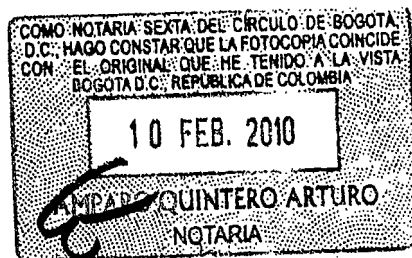
* * * * *

75% EN EL PRIMER AÑO DE CONSTITUCION DE SU EMPRESA, DE 50% EN EL SEGUNDO AÑO Y DE 25% EN EL TERCER AÑO. LEY 590 DE 2000 Y DECRETO 525 DE 2009.

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,
VALOR : \$ 3,600

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

Esteban Q



CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ 8 - COLOMBIA

REPRESENTACION

REPRESENTATION

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

AbGenomics Cooperatief U.A.

domiciliado (s)
en/of

Strawinskylaan 3111, 1077 ZX Amsterdam, The Netherlands

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Círculo de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

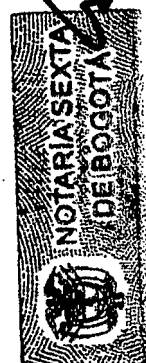
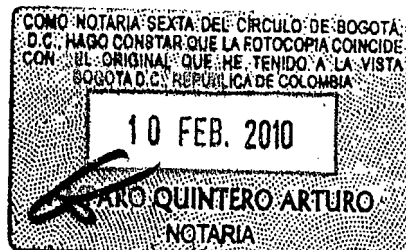
La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar,

© CAVELIER ABOGADOS

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.

The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervener ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the



29
28



admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this

OCT 8 - 2009

En/in

Por/by

Firma/Signature

Lucy Lin

Nota:

PARA SOCIEDADES

El documento de Representación deberá ser firmado por el representante legal de la compañía. Deberá ser presentado ante Notario Público para que certifique que la persona que firma es quien dice ser. La firma del señor Notario deberá ser legalizada.*

Adicionalmente deberá anexarse copia legalizada* del documento que pruebe la existencia y representación legal de la sociedad.

*La legalización podrá ser por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario. Una sola legalización que incluya ambos documentos sería suficiente.

PARA PERSONAS NATURALES

El documento de Representación deberá ser firmado por el otorgante. El Notario Público deberá certificar que la persona que firma es quien dice ser.

Posteriormente el documento de Representación deberá ser legalizado por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

Note:

FOR CORPORATIONS

The Representation document should be signed by the Legal Representative of the company. It should be produced before a Notary Public, who should certify that the person signing the same is in fact who he/she purports to be. The Notary's signature should then be legalized.*

In addition a legalized copy* of the document proving the existence and legal representation of the company should also be attached.

*Legalization may be made by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961, or before the Colombian Consulate if otherwise. A single legalization that would include both documents would be sufficient.

FOR INDIVIDUALS

The Representation should be signed by the grantor. The Notary Public should certify that the person signing is who he/she purports to be.

Subsequently, the Representation document should be legalized by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961 or before the Colombian Consulate if otherwise.

© CAVELIER ABOGADOS

案號

Case No. : 5646

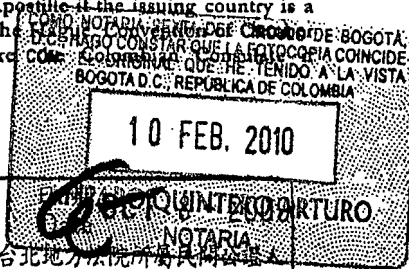
本文件之簽名或蓋章，於台灣台北地方法院所屬民間公證人趙原孫事務所認證。

Attested at the Chao, Yuan-Sun Notary Public Office of Taiwan Taipei District Court, R.O.C., that the signature(s)/seal(s) in this document is/are authentic.

Notary Public

Chao, Yuan-Sun

301, NO. 346, NAN-KING E. RD., SEC. 3, TAIPEI, TAIWAN





REPUBLICA DE PANAMA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES



Departamento Consular y
Legalizaciones

**CERTIFICADO DE
AUTENTICACIÓN**

Recibo Oficial No. 567846
Arancel No. 60
Derecho B/. 10.00

No. **531541**

AMP-08

El Suscrito MARIO LUIS CUCALON
NOMBRE DEL FUNCIONARIO CONSULAR
EMBAJADOR DE PANAMA EN TAIPEI, TAIWAN, R.O.C.

TITULO Y LUGAR DE ACREDITACIÓN

CERTIFICA:

que la firma que aparece en el documento adjunto que
dice: TSAO, YU-FEN
es auténtica y corresponde a la que acostumbra usar en los
documentos que autoriza en calidad de OFFICER OF BUREAU
OF CONSULAR AFFAIRS, MINISTRY OF FOREIGN AFFAIRS,
REP. OF CHINA

Dado en la Ciudad de TAIPEI el día 12
del mes de OCTUBRE del año 2009



Mario L. Cucalon
MARIO LUIS CUCALON
Embajador de Panama
FIRMA DEL FUNCIONARIO CONSULAR
Sección Consular

中華民國文件證明專用
REPUBLIC OF CHINA (TAIWAN)

No. 0980025943-001

中華民國外交部
茲證明本文件係經台北地院民間公證人簽章屬實

簽發日期：中華民國 98 年 10 月 9 日
MINISTRY OF FOREIGN AFFAIRS,
REPUBLIC OF CHINA

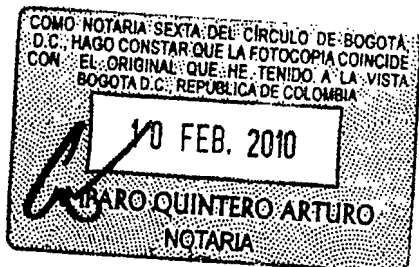
This is to certify that the
Signature/Seal of Notary Public, Taipei
District Court is authentic

Date of Issue: OCT-9-2009
For the Minister and by authorization

Tsao, Yu-Fen
Officer
Bureau of Consular Affairs

費用 Fee: 驗章 NT\$400

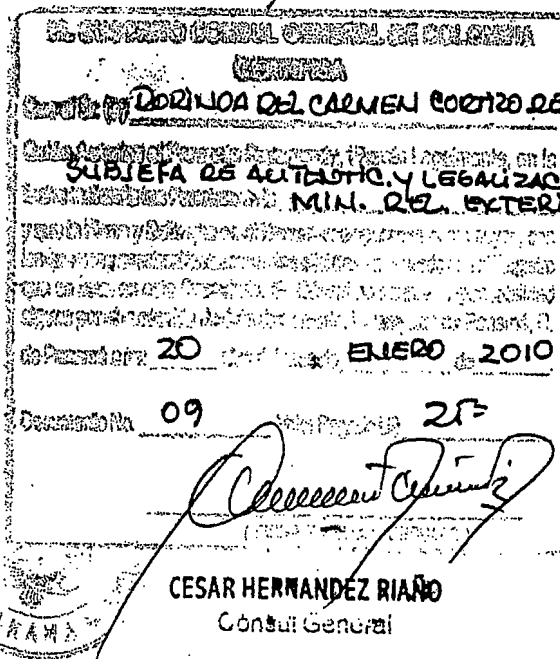
E059473



MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

FINA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
FUNCIONES INICIAADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

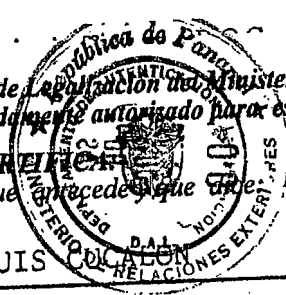


INTERESADO

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

Que la firma que antecede que

MARIO LUIS



Es autentica del funcionario que el día 12

de OCTUBRE año 2009

ejercía el cargo de EMBAJADOR DE PANAMA EN

TAIPEI, TAIWAN, R.O.C., CHINA.

Panamá 18 de ENERO año 2010

Autenticación N° 75/C/AR

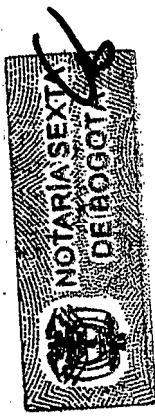
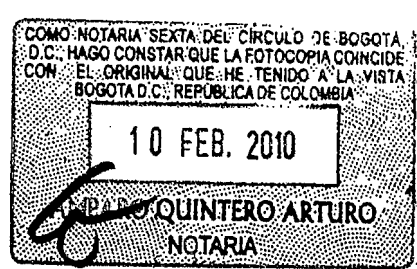
Firma del funcionario *Mario Luis Cortizo de Zanetti* 295628

Dorinda del Carmen Cortizo de Zanetti

Firma Autorizada

QUE LISTA DE AUTENTICACIÓN Y LEGALIZACIÓN

Este Ministerio de Relaciones Exteriores asume responsabilidad en cuanto al contenido del documento



0017
CUMPLE
HUBO
LAS
FE

ASNOU 10/02

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2010 FEB - 2010 FEB - 02

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

Ministerio de Relaciones Exteriores
Firma Autorizada
Bordado del Carmen Corzo de Sandoz

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
10 FEB. 2010
ARTURO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

TRADUCCIÓN OFICIAL 309/2009 DE UN DOCUMENTO EN IDIOMA INGLÉS
 REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL
 APROBADO POR RESOLUCION 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976
 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA Y
 DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES
 EXTERIORES DE COLOMBIA, POR EL CUAL **ABGENOMICS COÖPERATIEF**
U.A. DOMICILIADA EN STRAWINSKYLAAN 3111, 1077 ZX, AMSTERDAM,
 PAISES BAJOS, OTORGA REPRESENTACIÓN EN ASUNTOS RELACIONADOS
 CON PROPIEDAD INDUSTRIAL A **CAVELIER ABOGADOS**.

DADO Y FIRMADO HOY 8 DE OCTUBRE DE 2009. FIRMADO LEEWEN LIN.

SELLO: CASO 5646. FECHA 8 DE OCTUBRE DE 2009.

Certificado en la oficina de notario público de CHAO, YUAN-SUN de la corte de distrito de Taipei, Taiwan, República de China, que las firmas/sellos en este documento son auténticos. NOTARIO PÚBLICO: CHAO, YUAN-SUN

901, NO. 346, NAN-KING E. RD. SEC. 3, TAIPEI, TAIWAN

REPUBLICA DE CHINA (TAIWAN)

NO. 0980025943-001

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, REPUBLICA DE CHINA

Por la presente se certifica que la firma/sello de notario público, Corte de distrito de Taipei es auténtica. Fecha de expedición: 9 de octubre de 2009. A nombre del ministro y por autorización. TSAO, YU-FEN, FUNCIONARIO.

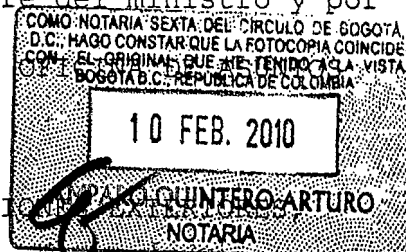
CONSULARES. HONORARIOS NT\$400. EO59473

REPUBLICA DE PANAMA, MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, DEPARTAMENTO CONSULAR Y LEGALIZACIONES. CERTIFICADO DE

AUTENTICACIÓN. El suscrito MARIO LUIS CUCALÓN, embajador de

Eduardo Calado N.

TRADUCTOR OFICIAL
 Inglés al español y viceversa
 Reg. 541 del 27 de febrero de 1976



Panamá en Taipei, Taiwan, República de China, certifica que la firma que aparece en el documento adjunto que dice TSAO, YU-FEN, es auténtica y corresponde a la que acostumbra usar en los documentos que autoriza en calidad de funcionario de la oficina de asuntos consulares, Ministerio de Relaciones Exteriores, República de China. Dado en la ciudad de TAIPEI el 12 de octubre de 2009. Firmado: MARIO LUIS CUCALÓN, EMBAJADOR DE PANAMA, SECCION CONSULAR, TAIPEI, TAIWAN, REPUBLICA DE CHINA. E059473

SELLO FIJADO POR EL CONSUL GENERAL DE COLOMBIA PARA AUTENTICAR LA FIRMA DE DORINDA DEL CARMEN CORTIZO DEL CARMEN CORTIZO DE ZANETTI, SUBJEFA DE AUTENTICACIONES Y LEGALIZACIONES DEL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE PANAMA, DE FECHA 20 DE ENERO DE 2010. DOCUMENTO 09, FIRMADO: CESAR HERNANDEZ RIAÑO, CONSUL GENERAL.

SELLO: MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, 20 DE FEBRERO DE 2010, DILIGENCIA 007232 PARA AUTENTICAR LA FIRMA DE CESAR HERNANDEZ R, CONSUL. FIRMADO: JEFE DE LEGALIZACIONES, BOGOTA, D.C. COLOMBIA.

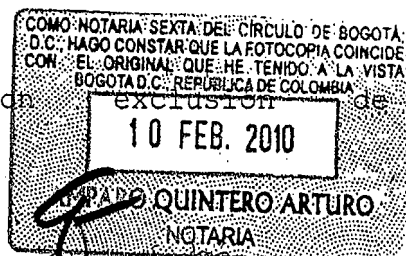
CÁMARA DE COMERCIO

EXPEDIENTE NUMERO 34288932. PAGINA 00001

Traducción al inglés de un resumen tomado del registro comercial de Cámara de comercio. Este registro es administrado por la Cámara de Comercio de Amsterdam.

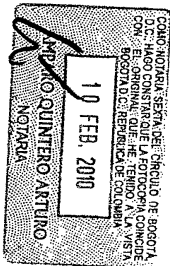
PERSONA JURIDICA

COÖPERATIE U.A. (cooperativa con exclusión de responsabilidad)



Eduardo Calado
TRADUCCION
Inglés-Español
Rev. 241 Febrero 2010





MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2010 FEB - 10/9 07

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ACEPTA
RESPONSABILIDAD
DEL TERCERO

007399

Eduardo Belandier

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

RECIBO LEGALIZACION

No. 107384913169 2/2



Dossiernummer: 34288932

Blad 00001

Uittreksel uit het handelsregister van de Kamers van Koophandel
Deze inschrijving valt onder het beheer van de Kamer van Koophandel voor
Amsterdam

Rechtspersoon:

Rechtsvorm :Coöperatie U.A.
Naam :AbGenomics Coöperatief U.A.
Statutaire zetel :Amsterdam
Eerste inschrijving in het
handelsregister :17-12-2007
Akte van oprichting :17-12-2007

Onderneming:

Handelsna(a)m(en) :AbGenomics Coöperatief U.A.
Adres :Strawinsky laan 3111, 1077ZX Amsterdam
Telefoonnummer :020-4064444
Datum vestiging :17-12-2007
Bedrijfsomschrijving :Het voorzien in bepaalde stoffelijke behoeften
van haar leden krachtens met hen gesloten
overeenkomsten, hierna genoemd
"ledenovereenkomsten", in het bedrijf dat zij
te dien einde te hunnen behoefte uitoefent of ..
doet uitoefenen in haar eigen naam, alsmede ...
holding- en financieringsactiviteiten

Werkzame personen :0

Bestuurder(s) :

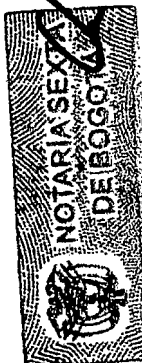
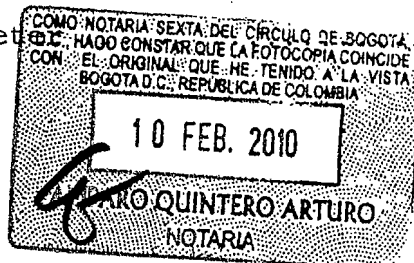
Naam :Lin, Leewen
Geboortedatum en -plaats :18-02-1958, China, China
Infunctietreding :17-12-2007
Titel :Bestuurder A
Bevoegdheid :Gezamenlijk bevoegd (met andere bestuurder(s),
zie statuten)

Naam :Chung, Yung-Hua
Geboortedatum en -plaats :01-06-1963, Taiwan, Taiwan
Infunctietreding :17-12-2007
Titel :Bestuurder A
Bevoegdheid :Gezamenlijk bevoegd (met andere bestuurder(s),
zie statuten)

Naam :Everwijn, Jakob Piet

21-09-2009

Blad 00002 volgt.





Dossiernummer: 34288932

Blad 00002

Geboortedatum en -plaats	:24-02-1953, Apeldoorn
Infunctietreding	:17-12-2007
Titel	:Bestuurder B
Bevoegdheid	:Gezamenlijk bevoegd (met andere bestuurder(s), zie statuten)
Naam	:Funnekotter, Rutger Herman Willem
Geboortedatum en -plaats	:26-02-1967, Leidschendam
Infunctietreding	:17-12-2007
Titel	:Bestuurder B
Bevoegdheid	:Gezamenlijk bevoegd (met andere bestuurder(s), zie statuten)

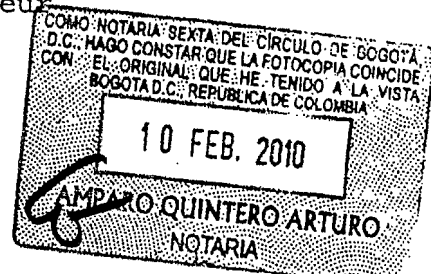
Alleen geldig indien door de kamer voorzien van een ondertekening.

Amsterdam, 21-09-2009

Uittreksel is vervaardigd om 10.10 uur

Voor uittreksel

N. Snijders
plv. Algemeen Directeur





29
33

File number: 34288932

Page 00001

English translation of an extract from the trade register of the Chambers of Commerce. This registration is administrated by the Chamber of Commerce for Amsterdam

Legal person:

Legal form :Coöperatie U.A. (Cooperative with Exclusion of Liability)
Name :AbGenomics Coöperatief U.A.
Statutory seat :Amsterdam
First registration in the :17-12-2007
trade register :17-12-2007
Incorporation deed

Undertaking:

Tradenam(e)s :AbGenomics Coöperatief U.A.
Address :Strawinskylaan 3111, 1077ZX Amsterdam
Telephone number :020-4064444
Date of establishment :17-12-2007
Description of business conducted :See Dutch extract
Employees :0

Director(s):

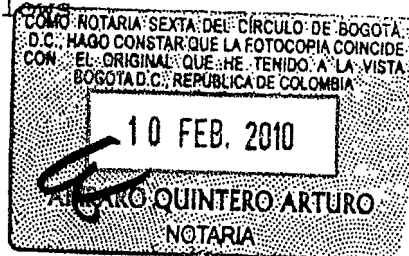
Name :Lin, Leewen
Date and place of birth :18-02-1958, China, China
Date of entry into office :17-12-2007
Title :Bestuurder A
Powers :Authorised jointly (with other director(s), ...
see articles)

Name :Chung, Yung-Hua
Date and place of birth :01-06-1963, Taiwan, Taiwan
Date of entry into office :17-12-2007
Title :Bestuurder A
Powers :Authorised jointly (with other director(s), ...
see articles)

Name :Everwijn, Jakob Pieter
Date and place of birth :24-02-1953, Apeldoorn
Date of entry into office :17-12-2007
Title :Bestuurder B
Powers :Authorised jointly (with other director(s), ...

21-09-2009

Page 00002 follows





34

File number: 34288932

Page 00002

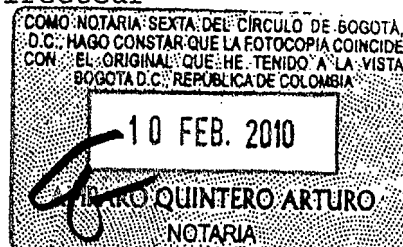
see articles)
Name : Funnekotter, Rutger Herman Willem
Date and place of birth : 26-02-1967, Leidschendam
Date of entry into office : 17-12-2007
Title : Bestuurder B
Powers : Authorised jointly (with other director(s), ...
see articles)

Issued by the chamber of commerce

Amsterdam, 21-09-2009
Extract has been produced at 10.10

For extract

N. Snijders
plv. Algemeen Directeur



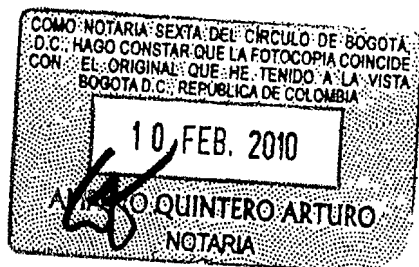
APOSTILLE
Convention de La Haye du 5 octobre 1961

1. Country: THE NETHERLANDS
This public document
2. Has been signed by: N. Snijders
3. Acting in the capacity of: deputy general manager
of the chamber of commerce at Amsterdam
4. Bears the seal/stamp of:

Certified

5. At Amsterdam
6. On 25 september 2009
7. By the clerk of the Court of Amsterdam
8. No: 031861
9. Seal/Stamp:

10. Signature
mw. F. El Gueriri



NOMBRE: ABGENOMICS COÖPERATIEF U.A.

SEDE: AMSTERDAM

PRIMER REGISTRO ANTE EL REGISTRO COMERCIAL: 17 DE DICIEMBRE DE 2007.

ESCRITURA DE CONSTITUCIÓN DEL 17 DE DICIEMBRE DE 2007.

EMPRESA

NOMBRE COMERCIAL: ABGENOMICS COÖPERATIEF U.A.

DIRECCIÓN: STRAWINSKYLAAN 3111, 1077ZX AMSTERDAM

NUMERO DE TELÉFONO 020-4064444

FECHA DE CONSTITUCIÓN: 17 DE DICIEMBRE DE 2007

DESCRIPCIÓN DEL NEGOCIO: VER EXTRACTO EN HOLANDÉS

EMPLEADOS: 0

DIRECTORES:

NOMBRE: LIN, LEEWEN

FECHA Y LUGAR DE NACIMIENTO: 18 DE FEBRERO DE 1958, CHINA, CHINA.

FECHA DE INGRESO A LA OFICINA: 17 DE DICIEMBRE DE 2007

TÍTULO : BESTUURDER A

FACULTADES: AUTORIZADO CONJUNTAMENTE (CON OTROS DIRECTORES, VER ARTICULOS)

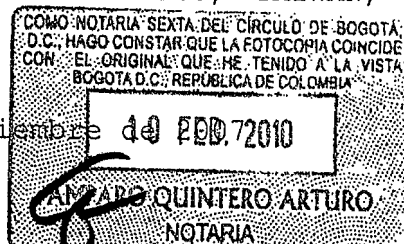
NOMBRE: CHUNG, YUNG-HUA

FECHA Y LUGAR DE NACIMIENTO: 1 DE JUNIO DE 1963, TAIWAN, TAIWAN

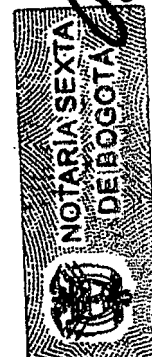
Fecha de ingreso a la oficina: 17 de diciembre de 2007

TITULO: BESTUURDER A

FACULTADES: AUTORIZADO CONJUNTAMENTE (CON OTROS DIRECTORES, VER ARTÍCULOS)



Eduardo Calado N.



NOMBRE: EVERWIJN, JAKOB PIETER

FECHA Y LUGAR DE NACIMIENTO: 24 DE FEBRERO DE 1953, APELDOORN

Fecha de ingreso a la oficina: 17 de diciembre de 2007.

Título: BESTUURDER B

Facultades: Autorizado conjuntamente (con otros directores,
ver artículos)

NOMBRE: FUNNEKOTTER, RUTGER HERMAN WILLEM

FECHA Y LUGAR DE NACIMIENTO: 26 DE FEBRERO DE 1967,
LEIDSCHENDAM

Fecha de ingreso a la oficina: 17 de diciembre de 2007.

Título: Bestuurder B

Facultades: Autorizado conjuntamente (con otros directores,
ver artículos)

Amsterdam, 21 de septiembre de 2009.

Este resumen ha sido emitido a las 10:10

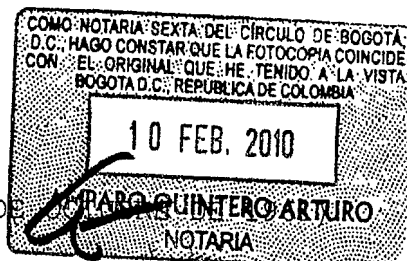
Con respecto al extracto:

N. SNIJDERS,

Plv. Director

APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE ABRIL DE 1954)



1. PAIS: PAISES BAJOS
2. Este documento público ha sido firmado por N. SNIJDERS
3. quien actúa en su calidad de GERENTE GENERAL SUPLENTE de la cámara de comercio de AMSTERDAM
4. lleva el sello/estampilla de _____

CERTIFICADO

5. En AMSTERDAM

6. el 25 de septiembre de 2009

Eduardo Calado

37
36

7. Por el oficial de la corte de Amsterdam

8. No. 031861

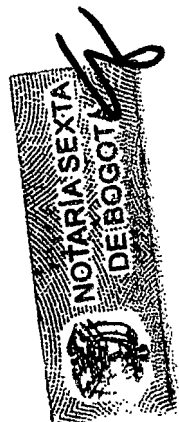
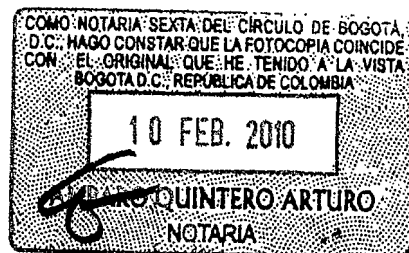
9. Sello/estampilla: RECHTBANK, AMSTERDAM

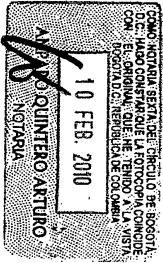
10. Firma: F. EL GUERIRI.

COLO-15277-841-001-8

ECN\ECN\ID-161655\WPCL002G

Eduardo Caldas N.



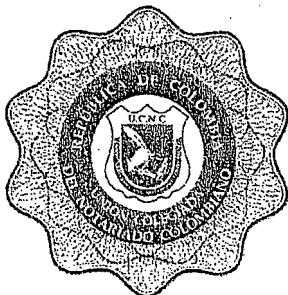


MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
2010 FEB -3 09
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
007402
Edmundo Calvo
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
AS FUNCIONES INDICADAS

7 700004 313894

3



Presente el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, domiciliado en Bogotá, identificado como aparece al pie de su firma y manifestó que está conforme con el contenido de esta escritura pública.-----

HASTA AQUI LA MINUTA

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION : Leída la presente escritura pública por el Compareciente y habiéndosele hecho las advertencias sobre los trámites y formalidades de rigor le impartió su aprobación y en constancia la firma por ante mí el Notario que AUTORIZA.

DERECHOS NOTARIALES : RESOLUCION 10301 del 17 de diciembre año 2009, \$ 42,860 - - - - - IVA: \$ 28,757 - - - - -

PAPEL NOTARIAL : Esta escritura se extendió en las hojas de papel sellado números : AA- 7-700004-313900 - 7-700004-313894 - - - - -

EN BLANCO... EN BLANCO


CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO

CC.No. 19.060425 Mr

Representante legal **CAVELIER ABOGADOS**



AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIO SEXTO (6°) DE BOGOTA D.C.

ELABORO : Mac.2010-PODER 608

PAPEL DE USO EXCLUSIVO DEL PROTOCOLO NOTARIAL . NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO



ES FIEL Y SEGUNDA COPIA (FOTOCOPIA) TOMADA DE LA ESCRITURA
PUBLICA NUMERO 0652 DE FECHA 10 DE FEBRERO DE 2010

COPIA QUE EXPIDO CON DESTINO AL INTERESADO EN 15 HOJAS RUBRICADAS
EN SUS MARGENES, LA CUAL CARECE DE NOTAS DE REVOCATORIA,
MODIFICACION O SUSTITUCION, POR TANTO SE PRESUME VIGENTE EL PODER
EN ELLA CONTENIDO.

BOGOTÁ D.C. FEBRERO 11 DE 2010

RESOLUCION 01 DE 2009

LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ



AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

POLIPÉPTIDOS QUE CONTIENEN CDRS DE CADENA LIVIANA O PESADA DE
INMUNOGLOBULINA DE ANTICUERPOS ANTI-PSGL-1
APLICACIONES RELACIONADAS

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

ANTECEDENTES

10

Células-T súper 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 súper agresivas. Ver, por ejemplo, Kabelitz et al. (1993) Immunol Today 14, 338-340; and Raff (1992) Nature 356, 397-399.

15

20

RESUMEN

- 25 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.

30

35

En un aspecto, la invención muestra una cadena de inmunoglobulina que tiene tres secuencias que (i) contienen, respectivamente, RSSQSIVHNDGNTYFE, KVSNRFS, y FQGSYVPLT (SEQ ID NOs: 1-3); (ii) contienen, respectivamente, SFGMH, YINGGSSTIFYANAVKG, y 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 FQGSHVPWT (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):

```

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

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

121  TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAATGATGGAACACCTATTTTGAATGGTAC
41  S C R S S Q S L V H N D G N T Y F E W Y

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

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

301  AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTTCATATGTTCTCTC
101  R V E A E D L G I Y Y C P Q G S Y V P T

361  ACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
121  AT F G A G T K L E L K

```

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

```

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

181  GAGAAGGGGCTGGAGTGGTTCGCATACATTAATGGTGGCAGTAGTACCATCTTCTATGCA
61  E K G L E W V A V L N G G S S P T F Y A

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

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

361  TACGGAGGGGGTGCTATGGAATATTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
121  V G G G G A M D Y W G Q G T S V T V S S

```

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

```

1  ATGGATTTTCTGGTGCAGATTTTCAGCTTCTTGCTAATCAGTGCCTCAGTTGCAATGTCC
1  M D F L V Q I F S F L L I S A S V A M S

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

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

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

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

301  GTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTACAGTGGTTACCCACTCACG
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

```

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

```

1  ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTCACTACAGGTGTCCACTCTGAG
1  M E W S W V F L F L L S V T T G V H S E

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 Y Y F H W V K Q S H

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

241  CCGAAGTTCAAGGGCAAGGCCATATTAAATGTAGATAAGTCATCCAGCACAGCCTACATG
81  P K 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

361  CCCTACTATAGGTACGACGACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
121  P 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):

```

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

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

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

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

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

301  AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTCAAGGTTACATGTTCCGTGG
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

```

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

```

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

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

121  TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAATACCAATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCA
41  C A A S G F T F N I N A M N W V R Q A R

181  GGAAAGGGTTTGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAACATAT
61  S K G L E W V A R I R S K S N N Y A P Y

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

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

361  GGAAGCTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
121  G S Y W Y R D V W G A G T T V T V S S

```

10 Como la especificidad antigénica 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,

43
42

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:

5

SEQ ID NO: 25 (región V de cadena liviana de 15A7 humanizado):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSOSIVHNDENTYMEWYQOKPGKAPKLLIYKVSNRFS
SGTHFTLTISLQPEDFATYYCFQGSYVPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 26 (región V de cadena pesada de 15A7 humanizado):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSEGMHWVRQAPGKGLEWVA
RDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVASYGGGAMDYWGQTSVTVSS

10

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 esta flanqueado por ambas secuencias codificadoras que flanquean esa parte de la molécula en el genoma del organismo en la cual el ocurre naturalmente; (b) un ácido nucleico incorporado dentro de un vector o dentro de un DNA genómico de una procariota o eucariota 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 nucleótida 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

15

20

25

30

operativamente el ácido nucleico a secuencias regulatorias 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 mas 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 nucleótida, 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 trasformada 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 trasfección de fosfato de calcio, trasfección 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 nucleico descrito 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 esta 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 Gliproteína P-Selectina sin interferir con la fijación entre Ligando-1 Gliproteína P-Selectina y P-Selectina y, (ii), una vez fijado al Ligando-1 Gliproteína 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 Gliproteína P-Selectina humano.

Además dentro del alcance de esta invención está otro anticuerpo que se fija específicamente a residuos amino ácido 115-126 del Ligando-1 Gliproteína P-Selectina humano maduro. Preferiblemente el anticuerpo se fija específicamente a los residuos amino ácido 117-123. Mas preferiblemente, se fija específicamente a los residuos amino ácido 119-121. , una secuencia de consenso entre todos los epitopos probados. En efecto, mutación de uno o mas de estos tres residuos amino ácidos elimina la fijación de anticuerpos. En un ejemplo, este anticuerpo, una vez ligado a Ligando-1 Gliproteína 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 esta 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 relacionad 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 esta 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-Trasferasa (GST), marcador 6x-His epitopo, 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 más 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 acídicas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares descargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteina), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofan), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofan, histidina). Así, un residuo amino ácido no esencial predicho en un polipéptido es preferiblemente reemplazado con otro residuo amino ácido de la misma familia de cadena lateral. Alternativamente, mutaciones puede ser introducidas aleatoriamente a lo largo de todas las partes del polipéptido de esta invención, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutante 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 contiene 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 anfitrión 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, poliols plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, keyhole limpet, hemocianina, y dinitrofenol. Los adyuvantes humanos útiles incluyen BCG(bacilo Calmette-Guerin) 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 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 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 una 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. Más aún, 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
5 cánceres derivados de células-T. Este método puede ser realizado solo o en conjunto con otras drogas y terapias.

El termino "tratamiento" se refiere a la administración de una composición a un individuo con el propósito de cura, alivio, liberación, remedio, prevención o
10 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.

15 Enfermedades de ejemplo para ser tratadas incluyen, diabetes melitos, artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis y artritis soriatica), múltiple esclerosis, encéfalomiелitis, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmune, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica y dermatitis eczematosa), soriasis, síndrome de Sjogren, enfermedad de Crohn,
20 úlcera aftosa, iritis, 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, perdida
25 de audición sensorineural progresiva bilateral idiopática, anemia aplástica, 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,
30 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.

35 En una aproximación in vivo, una composición terapéutica (por ejemplo, una composición que contiene un anticuerpo de la invención) es administrada a un

50

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 más 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, una 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 hibridoma. Los supernadantes de las líneas de células de hibridoma resultante fueron seleccionados por su fijación a células de CHO que expresaban

52

establemente hDC 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.

5

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).

10

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 hibridomas 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 barridas.

15

20

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

25

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.

30

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 PBCM (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 epítomos de los anticuerpos anti-CD162

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

54
85

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		
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

55-56

Para amplificar secuencias que codifican	Primer hacia adelante	Primer reverso
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	cccgggacCATATGcaggccaccgaatatgagtacc
AB1002	tatgagCATATGgattatgattcctgccagaaacgg
AB1003	aaacggagCATATGgaaatgctgaggaacagcactgacacc
AB1004	aaccctCATATGaccactgtggagcctgtgcaaggcg
AB1005	gtggtcAGATCTtccatagctgctgaatccgtggacagg
AB1006	GTTCTCAGATCTTCTGGAGGCTCCGTTTCTGGCAGG
AB1007	AGGCCCAAGATCTGGAGTGGTGTGTCAGTGCTGTTCTCTC
AB1008	ggctccAGATCTgtagactcaggggttcaggccc
AB1009	gtggtcAGATCTgtgactgcccctcctgcatccaggcc
AB1010	GCCAGCAGATCTTGCTTCACAGAGATGTGGTCTGGGG
AB1011	cgcgatccatgcctctgcaactcctcctgttgc
AB1012	GCCAGCTCGAGCTTCACAGAGATGTGGTCTGGGG
AB1013	GGTCTGctcgagCATAGCTGCTGAATCCGTGGACAGGTTC
AB1058	agacaggccaccgaagggaacctgtccacg
AB1059	cgtggacaggttccctcggtggcctgtct
AB1014	ccgctcgagcgccaagattaggatggc
AB1015	cgggatccactcaaaccacagccatgg
Ab1016	ccgctcgagtggtagtaggttccatgg
Ab1017	cgggatcaactcaaccacaggcctg
Ab1018	ctgtgcctcgagggctgtggttgagtg
Ab1019	cgggatccatggagatacagaccactcaac
Ab1020	cgggatccgatgcaggaggggcagtcac
Ab1021	ggccgtcactcgagttgtctgtgctc
Ab1022	TatgATTTCAGCAGCTATGGAGATACAGACCACTCAACCAgcA

Ab1023	GATCTgcTGGTTGAGTGGTCTGTATCTCCATAGCTGCTGAATCCA
Ab1024	TatgGATTCAGCAGCTATGCGGATACAGACCACTCAACCAgcA
Ab1025	GATCTgcTGGTTGAGTGGTCTGTATCCGCATAGCTGCTGAATCCA
AB1026	CTAGTCTAGATGACCCAACTCCACTCTCCC
AB1027	CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTAGCATCAGCCCGTTTGATTTC
AB1028	TAACATtCtagATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGG
AB1029	GGATAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACCGTGG
AB1030	CTAGTCTAGATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGG
AB1031	CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTTTTCCAGCTTGGTCCCCCCTCC
AB1032	CTAGTCTAGATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCC
AB1033	CTAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACTGAGGttcc
AB1034	CTAGTCTAGATGGATTTTCTGGTGCAGATTTTCAGC
AB1035	CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTAGCATCAGCCCGTTTCAGCTCC
AB1036	CTAGTCTAGATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTC
AB1037	CTAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCGCTTCCAGTGGATAGACTGATGG
AB1038	TCTATCTAGATGAACTTCGGGTCCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAGTG
AB1039	CCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCACTG
AB1040	CTGAAAGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAAGCTTCCTCCAGGCTGCACTAAGCCTC
AB1041	GCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGAC
AB1042	GCATAGAAGATGGTACTACTGCCACCATTAAATGTATGCGACCCACTCGAGTCCCTTCCCTGGAG
AB1043	GTAGTACCATCTTCTATGCAAACGCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGATAATGCC
AB1044	CCTCAGCCCTCAGAGAATTCATTTGCAGGTACAGGGTGTCTTGGCATTATCTCTGGAGATGG
AB1045	GAATTCTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGATATGCTAGTTACGGAGG
AB1046	CTGTGACCAGGGTGCCTTGGCCCCAATAGTCCATAGCACCCCCTCCGTAACCTAGCATATC
AB1047	ACCCTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACTGTGACCAGGGTGCCTTGGCC
AB1048	TCTATCTAGATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCAGGC
AB1049	GCTGCTCTGGGTTCAGGCTCCACTGGTGACATTCAGATGACCCAATCTCCGAGCTCTTTG
AB1050	GATCTGCAGGTGATAGTGACCCTATCCCCTACAGACGCAGACAAAGAGCTCGGAGATTGG
AB1051	CACTATCACCTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAATGATGGAAACACCTATTTTGAATG
AB1052	GATGAGAAGCTTGGGTGCCTTTCCTGGTTTCTGTTGGTACCATTCAAATAGGTGTTTC
AB1053	GCACCCAAGCTTCTCATCTATAAAGTTTCCAATCGATTTTCTGGTGTCCCATCCAGGTTTAGTGG
AB1054	GCAGAGAAGAGATGGTGAGGGTGAAGTGTGTCCCAGACCCACTGCCACTAAACCTGGATGG
AB1055	CTCACCATCTCTTCTCTGCAGCCGGAGGATTTGCAACCTATTACTGTTTTCAAG
AB1056	CCTTGGTGCCTTGACCGAACGTGAGAGGAACATATGAACCTTGAAAACAGTAATAGG
AB1057	ACCCTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTACGTTTGATTTCCACCTTGGTGCCTTGACCG
AB1058	TATATCTAGAATTCCCCCCCCCCCCCCCC
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

57

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
5 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 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) 5 veces con cada una. Las proteínas fijadas fueron eluidas después con una solución extractadora amortiguadora que
10 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 Laboratories, Cat. No. 500-0006) y verificada por SDS-PAGE.

15 Un sandwich ELISA fue llevado a cabo para estudiar la interacción entre los fragmentos hCD162 y cada uno de 15A7, 9F9, y 43B6. Platos microtitier de 96 columnas fueron cubiertos con anticuerpo IgG de cabra anti humano (Southern Biotechnology, Cat. No. 2040-01) (2µg/ml, 50 µl/columnas) de un día para otro a 4°C. Los platos fueron bloqueadas por incubación con 0.25% de BSA en PBS (150
20 µl/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 µg/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 µg/ml) durante 1.5 horas a temperatura ambiente.
25 Después de la incubación, los platos fueron lavados 4 veces con PBST. 50µl 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 µl de una solución sustrato de fosfatasa alcalina
30 (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.

35 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 epítomos de 43B6 y 9F9 estaban localizados entre los residuos

58

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 epítipo de 15A7 estaba localizado entre los residuos 119 a 319. La localización del epítipo 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 *Bam*HI en el extremo 5' y un sitio *Xho*I en el extremo 3'. Estos productos PCR fueron cortados con las correspondientes encimas 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 interactuar con 15A7. Estos resultados son consistentes con la idea de que el epítipo de 15A7 está localizado entre los residuos 115 a 126.

10
59

Todos los resultados anteriores indican que los epítomos de 9F9, 43B6, y 15A7 son proteíno-dependientes, en lugar de ser modificación de carbohidratos-dependientes, puesto que todos los tres anticuerpos se fijan proteínas de fusión expresadas bacteriamente. 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 *Xba*I en ambos extremos de los productos PCR, los cuales son luego cortados con la encima *Xba*I y ligados

60 61

dentro de vector pV_K, pVg1, pVg2, o pVg4 *Xba*I digerido. Más 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.

10 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.

15 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

25 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.

30 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.

35 La mostrada a continuación es un alineamiento de secuencia de 15A7 de ratón contra este anticuerpo mDREG-55 (los CDR están resaltados)

62
61

Alineamiento de cadena liviana:

mDREG-55 DIVLTQSPASLSVSLGERASISCHASQSVDPY-DGDSYMNWYQKPGQPPKLLIYAASNEES
DI++TQ+P SL VSLG++ASISC++SQS+ + DG++Y WY QKPGQ PKLLIY SN S
m15A7 DILMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSIHVHNDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRES

mDREG-55 GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCOOSNEDEWTFGGGTKLEIK
G+P RFSGSGSGT FTLNI VE ED YYC Q + P TF GGTKLE+K
m15A7 GVPDRFSGSGSGTHFTLNISRVEAEDLGIYYCFQGSXVPETFGAGTKLELK

5 Alineamiento de cadena pesada:

mDREG-55 EVKLVESGGGLVKGPGGSLKLSCAASGFTFSRYAMS WVRQTPEKRLWVASTSGGSTFYAPDSVKG
+V+LVESGGGLV+PGGS KLSCAASGFTFS++ M WVRQ PEK LEWVA I+ G ST +Y ++VKG
m15A7 DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSEGMHWVRQAPEKGLEWVAIINGGSSTFYANAVKG

mDREG-55 RFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDATAMYYCAR-DY-DGYEDYWGQGTTLTVSS
RFTISRDN +N L+LQM+ LRSEDTA+YYC R Y G DYWGQGT++TVSS
m15A7 RFTISRDNPKNTLFLQMTILRSEDATAIYYCGRMASYCGGAMDYWGQGTSTVTVSS

10 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.

15 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.

20 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 para 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
25 cuatro pasos: (1) los cuatro pares de oligonucleótidos complementarios fueron

63
62

hibridados y extendidos con fragmento Klenow en 4 reacciones separadas; (2) los 4 fragmentos dsDNA resultantes fueron mezclados por pares, desnaturalizados, rehibridados y extendidos en dos reacciones separadas; (3) los dos fragmentos dsDNA resultantes fueron mezclados, desnaturalizados, rehibridados, y extendidos para crear la dsDNA longitud total final; y (4) el DNA resultante fue amplificado mediante PCR con primers para introducir un sitio *Xba*I en ambos extremos. El fragmento PCR fue luego cortado con *Xba*I e insertado dentro de los respectivos vectores vVk y pVg4 *Xba*I digeridos. Luego, en las posiciones donde las interacciones entre CDR y el marco fueron consideradas importantes, los residuos de Gal fueron cambiados nuevamente a aquellos del 15A7 de ratón (es decir 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.

15 Alineamiento de cadena liviana:

hDREG-55	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	KASQSVDY-DGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLES
mouse 15A7	DILMTQTPLSLPVSLGDQASISCR	SSQSVHNDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
Hu15A7	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RSSQSVHNDGNTYFEWYQQKPGKAPKLLIYKVSNRFS
hDREG-55	GIPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYCQOSNEDPWTFGQGTKVEIK
m15A7	GVPDRFSGSGSGTHFTLNIS	RVEAEDLGIIYCFGGSYVPLTFGAGTKLELK
Hu15A7	GVP	SRFSGSGSGTHFTLTISSLQPEDFATYYCFGGSYVPLTFGQGTKVEIK

Alineamiento de cadena pesada:

20

hDREG-55	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVA	STSTGGSTFYWPSVKG	
m15A7	DVQLVESGGGLVQPGGSRKL	S	CAASGFTFS	SFGMH	WVRQAPKGLEWVA	ITNGGSSITFYANAVKG
Hu15A7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SFGMH	WVRQAPGKGLEWVA	ITNGGSSITFYANAVKG	
hDREG-55	RFTISRDNKNTLYLQMNSL	RAEDTAVYYCAR	FDY-DGYRDY	WGQGLTVTVSS		
m15A7	RFTISRDNPKNTLFLQMTIL	RS	EDTAIYYCGRYAS	YGGGAMDY	WGQGTSVTVSS	
Hu15A7	RFTISRDNKNTLYLQMNSL	RAEDTAVYYCAR	YAS	YGGGAMDY	WGQGTSVTVSS	

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

25

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.

5

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
10 establemente transfectadas con los plásmidos apropiados por electroporación utilizando un equipo Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories) 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
15 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
20 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
25 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-
30 HCl, pH 8.6.

Mediciones de Afinidad

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

65
64

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 removidas 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) tritrados, o un anticuerpo de control (9E10) durante 30 minutos, seguido de la adición de P-selectina humana recombinada (1.25 µg/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 µg/ml). 43B6 bloqueo 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 µg/ml de KPL o 43B6 fue necesario para abolir 50% de la fijación. En contraste, 5 µg/ml de 9F9 fue requerido. Mas aún, 15A7 no tuvo ningún efecto inhibitorio sobre la fijación de P-selectina aún 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.

5

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

Anticuerpos monoclonales adicionales contra PSGL-1 humano, 4B7, 5C4, 12E7, 10 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 15 humana a PSGL-1 humano, aún a las mas altas concentraciones probadas (5 µg/ml)

OTRAS INCORPORACIONES

20 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 series genéricas de rasgos equivalentes o similares.

25

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 30 están también dentro del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.

5

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.

10

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.

15

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.

20

24. El método de la reivindicación 23, donde el individuo ha recibido o esta contemplando recibir un trasplante alogénico o xenogénico.

25

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.

30

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.

35

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 un secuencia que codifica la cadena de inmunoglobulina de la reivindicación 1.

32. Un ácido nucleico aislado que incluye un 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 hibridoma.

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.

5

40. La célula anfitriona de la reivindicación 36, donde la célula de un mamífero es una célula de hibridoma.

10

15

JMS\JMSID-216891\WPC17516

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0046922

Bogotá D.C., Mayo 11 de 2012- 17:15:12

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	25033	12/03/2012		20.000.00
RECIBO DE CA	999999999	25034	12/03/2012		20.000.00
RECIBO DE CA	999999999	25035	12/03/2012		20.000.00
RECIBO DE CA	999999999	32602	02/04/2012		20.000.00
RECIBO DE CA	999999999	41841	27/04/2012		100.000.00
RECIBO DE CA	999999999	41873	27/04/2012		490.000.00
RECIBO DE CA	999999999	44560	07/05/2012		820.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO
1 50005-01-01 SOLICITUDES

CONCEPTO
1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE
INVENCIÓN

Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
590.000.00 590.000.00
\$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-123236- -00008-0000

Fecha: 2012-05-11 17:27:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASCRI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 73

Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 72

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 11 de 2012 - 17:15:14

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

72
73

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0046923
		Bogotá D.C., Mayo 11 de 2012 - 17:15:12

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

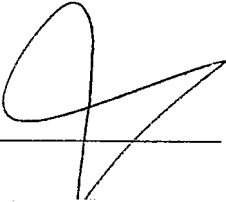
RE

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	25033	12/03/2012		20.000.00
RECIBO DE CA	999999999	25034	12/03/2012		20.000.00
RECIBO DE CA	999999999	25035	12/03/2012		20.000.00
RECIBO DE CA	999999999	32602	02/04/2012		20.000.00
RECIBO DE CA	999999999	41841	27/04/2012		100.000.00
RECIBO DE CA	999999999	41873	27/04/2012		490.000.00
RECIBO DE CA	999999999	44560	07/05/2012		820.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
30 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	900.000.00
			\$900.000.00

SON: **NOVECIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-123236- -00008-0000

Fecha: 2012-05-11 17:27:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 73

Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 72