



No. 13-169462-00000-0000

Fecha: 2013-07-17 14:52:29 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO ANTICUERPOS ANTI-P SELECTINA Y MÉTODOS PARA SU USO
E IDENTIFICACIÓN

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE SELEXYS PHARMACEUTICALS CORPORATION -
OKLAHOMA MEDICAL RESEARCH FOUNDATION

DOMICILIO E.U.A.

74. APODERADO LUIS FELIPE CASTILLO

22. BOGOTÁ, D.C., 17 JUL. 2013 2013



No. 13-169462- -00000-0000

Fecha: 2013-07-17 14:52:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85

icación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1	TIPO SE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/ US2011/066470	Fecha 21/12/2011
Publicación Internacional No.		WO 2012/088265 A1	Fecha 28/06/2012
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
ANTICUERPOS ANTI-P SELECTINA Y MÉTODOS PARA SU USO E IDENTIFICACIÓN			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
A61K 39/00			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
SELEXYS PHARMACEUTICALS CORPORATION - OKLAHOMA MEDICAL RESEARCH FOUNDATION		IDENTIFICACIÓN	TIPO
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		Research Parkway, Suite 516 - 825 NE 13th	No. TELÉFONO
CIUDAD		Okahoma City, Estado de Oklahoma, E.U.A. - Okahoma City, Estado de Oklahoma, E.U.A.	CORREO ELECTRÓNICO
PAIS			NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1	Scott ROLLINS - Richard	ALVAREZ - Russell ROTHER - Ziad S. KAWAR -	E.U.A.
2		Rodger P. MCEVER	E.U.A.
3			E.U.A.
4			E.U.A.
5			E.U.A.
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD
1	E.U.A.	Oklahome	Oklahoma City
2	E.U.A.	Oklahoma	Edmond
3	E.U.A.	Oklahoma	Oklahoma City
4	E.U.A.	Oklahoma	Oklahoma City
5	E.U.A.	Oklahoma	Oklahoma City
DIRECCIÓN			
1	5501 White Fences		
2	3604 Katherine Court		
3	10325 Forest Meadow Drive		
4	333 NW 5th Street Ap. 1802		
5	1716 Guilford Lane		
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación			
9	REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONE		IDENTIFICACIÓN	
		C.C. 79.397.879 de TP 68.995 del Bogotá C.S.J.	
DIRECCIÓN		Carrera 13 No. 37-43 Piso 12	
CIUDAD		Bogotá, D.C.	
PAÍS		Colombia	
No. TELÉFONO		285 7460	
CORREO ELECTRÓNICO		info@castillograu.c om	
No. RADICACIÓN O PORTOCOLO DE PODER GENERAL			

10		DECLARACIONES DE PRIORIDAD		☒ SI	☐ NO
(33)PAIS DE ORIGEN		CÓDIGO PAIS		(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1 E.U.A.				12/974,739 -	21.12.2010 - 31.08.2011
2				61/529,682	
3					
11 DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS					
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen,					
☐ SI ☒ NO					
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente,					
12 DECLARACION SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES					
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicional de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.					
☐ SI ☒ NO					
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro expedido por la Autoridad competente.					
13 REDUCCIÓN DE TASAS					
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de la patente.					
☐ SI ☒ NO					
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.					
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐					
Universidades públicas o privadas ☐					
Entidades sin ánimo de lucro ☐					
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos					
14 AUTORIZACION DE NOTIFICACION EN LINEA ☐ SI ☒ NO					
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.					
15		COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO		No.	Fecha.
16 FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL					
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)					
17 ANEXOS					
Documentación Técnica			Documentación Jurídica		
Solicitud Internacional en Castellano					
1	☒ Descripción	No. De folios:	9	☐ Poderes, si fuera el caso.	
2	☒ Reivindicaciones	No. Reivindicaciones:	10	☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante	
3	☐ Dibujos y/o figuras	No. Folios:	11	☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado número de registro, si fuera al caso	
4	☒ Resumen		12	☐ Copia de la licencia o autorización de conocimientos Tradicionales, o certificado o número de registro, si fuera el caso	
5	☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso		13	☐ Reducción de tasas	
6	☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso		Micro, pequeñas o medianas empresas		
7	☒ Arte final 12 x 12		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea		
8	☐ Anexo formato digital		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004		
			Universidades públicas o privadas		
			☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación		
			Entidades sin animo de lucro		
			☐ Copia de regido vigente en Cámara de comercio		
			☐ Hoja de información complementaria		
			☐ Otros, especificar		
			16	☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud	
			17	☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad	
			18	☐ Comprobante de pago de la tasa de concepto de excedente de palabras en la publicación	
			19	☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10	

ANTICUERPOS ANTI-P SELECTINA Y MÉTODOS PARA SU USO E IDENTIFICACIÓN

[0001] La presente invención se relaciona con anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que se enlazan a epítopes conformacionales específicos de la P-selectina y un método para su uso e identificación.

[0002] En la hemostasia normal y en la vigilancia inmunológica los leucocitos circulan libremente en la sangre y responden a la lesión y la infección en un proceso secuencial de señales de adhesión mediadas por moléculas de adhesión celular (1-3). En la enfermedad inflamatoria y trombótica este proceso está disregulado y puede presentar una patología que se caracteriza porque los leucocitos atacan a los propios tejidos del cuerpo y pueden causar complicaciones serias y en ocasiones mortales. Es bien sabido que la adhesión de los leucocitos desempeña un papel muy importante en la patología de muchos trastornos inflamatorios y trombóticos como vasooclusión de la enfermedad de células falciformes, lesión por reperfusión, trombosis, aterosclerosis, asma, artritis reumatoide, psoriasis y metástasis tumorales (4-15) trombosis venosa profunda (TVP). La P-selectina también está involucrada en otros procesos de enfermedad, como el daño de órganos y tejidos asociado con la inflamación, p.ej., la lesión por isquemia-reperfusión. Por ello, la P-selectina es una diana para la intervención en las enfermedades inflamatorias y trombóticas en los seres humanos.

[0003] Las selectinas son una familia de proteínas de adhesión de las que se sabe que desempeñan funciones en el reclutamiento de los leucocitos al endotelio y las plaquetas activadas. La P-selectina es un miembro de la familia de las selectinas de las glucoproteínas de adhesión, la cual también incluye las L- y E-selectinas (16). Las selectinas median el reclutamiento, la unión y el rodamiento inicial y la adherencia de los leucocitos a los sitios de inflamación (1). La P-selectina se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y los gránulos alfa de las plaquetas y se moviliza rápidamente hacia la membrana plasmática tras su estimulación por sustancias vasoactivas como la histamina y la trombina (17).

[0004] Enfermedad de células falciformes

[0005] La enfermedad de células falciformes (ECF) es un raro trastorno hereditario de la sangre que causa anemia crónica y vasooclusión y afecta en principio a personas de ancestro afroamericano en Estados Unidos. La enfermedad de células falciformes es el trastorno más común de gen único en personas de ancestro africano, con aproximadamente 1 de 375-600 personas de este origen afectadas (18, 19). Las patologías de células falciformes también son comunes entre personas de los países del Mediterráneo, África, el Caribe y zonas de América del Sur y Central (18, 19).

[0006] La ECF es una enfermedad autosómica recesiva causada por una única mutación de sentido erróneo (Val6Ala) en el gen de la β -globina que hace que la hemoglobina se vuelva menos soluble y susceptible a la polimerización tras la desoxigenación. La polimerización de la hemoglobina causa la deformación del eritrocito, el cual adopta la forma de una hoz (20).

4

[0007] La ECF tiene tres variantes frecuentes: Enfermedad de células falciformes homocigota (enfermedad de hemoglobina SS), enfermedad doble heterocigota de hemoglobina falciforme C (enfermedad de hemoglobina SC) y las β -talasemias falciformes. La forma más común y grave de la enfermedad se presenta en individuos que heredan dos copias de la variante HbS (HbSS) y la hemoglobina primaria en sus glóbulos rojos es hemoglobina falciforme. Otros individuos pueden verse afectados como heterocigotos compuestos con formas de gravedad variable de la enfermedad. Tienen una copia de la variante HbS emparejada con una copia de otra variante del gen de la β -globina. La HBSC se traduce en una forma leve de la enfermedad. Las variantes de Hb β -talasemia (que comportan la incapacidad de producir la cadena normal de la β A globina (β^0) o una reducción de su producción (β^+) se traducen una amplia gama de gravedades clínicas. La HbS β^0 es una forma grave, en tanto que la HbS β^+ puede ser moderada o leve con base en la contribución de cada variante a la hemoglobina total del paciente. Pueden presentarse otras variantes más raras si en conjunto con el gen S se hereda otra hemoglobina anormal del otro progenitor, como D, G u O. La forma predominante de célula falciforme está en individuos con una copia de HbS y una copia del gen normal de la β -globina (HbA). Estos individuos son portadores del rasgo falciforme (18).

[0008] La ECF afecta a cerca de 50.000-100.000 personas en Estados Unidos (21-24). Todos los individuos que son homocigotos o heterocigotos compuestos para HbS muestran algunas manifestaciones clínicas de la ECF. Los síntomas suelen aparecer dentro de los primeros 6 meses de vida pero hay considerable variabilidad en la gravedad de la ECF (25). Los individuos con HbSS son los más afectados, seguidos por los individuos con HbS β^0 -talasemia (22, 26). Además del genotipo, otros factores afectan la gravedad de la enfermedad como los niveles de hemoglobina fetal y el haplotipo del cúmulo de la β -globina, una región que contiene 5 genes que codifican la porción β de la hemoglobina. A pesar de la capacidad de determinar los factores de riesgo genéticos, la capacidad de predecir el curso de la enfermedad desde el nacimiento es limitada (27).

[0009] En Estados Unidos el tamizaje de las células falciformes al nacer es obligatorio en los 50 estados y el Distrito de Columbia (28) y ofrece una oportunidad para la intervención precoz. La metodología de las pruebas de diagnóstico suele comprender un cuadro hemático completo en conjunto con una o más de electroforesis de la hemoglobina, enfoque isoeléctrico, cromatografía líquida de alta resolución y pruebas de ADN (22).

[0010] Anemia crónica y hemólisis

[0011] El eritrocito falciforme tiene una vida media más corta que el eritrocito normal que resulta de la inestabilidad de la HbS y los efectos de los episodios repetidos de polimerización/despolimerización de la hemoglobina en la circulación. Esto afecta la permeabilidad de la membrana a los iones, la viscosidad y deformabilidad celular (20) y promueve el daño oxidativo de la membrana (29). Los pacientes que tienen enfermedad de células falciformes presentan anemia hacia los 2 a 3 meses de edad y síntomas y complicaciones asociadas con la anemia crónica y la hemólisis (22, 30) como enfermedad renal, trastornos oftálmicos, úlceras en las piernas, priapismo e hipertensión pulmonar (26,

31-37). Los valores de hemoglobina en los pacientes de ECF varían de 6 a 10 g/dL y la molécula de hemoglobina S tiene poca afinidad por el oxígeno. Los desencadenantes de la transfusión en los pacientes son un valor de hemoglobina de 5 o menos o una caída precipitada de la hemoglobina de 2g/dL o más. Normalmente se aplican transfusiones para restablecer los valores de hemoglobina hasta los niveles iniciales establecidos para cada paciente por cuanto un hematocrito excesivo puede precipitar la deformación del eritrocito (38). Los pacientes de ECF son más susceptibles a la infección por parvovirus B19 la cual puede detener la eritropoyesis y conducir a una crisis de anemia aplásica (39).

[0012] Crisis de dolor vasooclusivo

[0013] La oclusión vascular es fundamental en el curso clínico de la ECF y probablemente involucra tanto a la micro como a la macrocirculación. La oclusión que tiene lugar en la microvasculatura puede culminar en episodios dolorosos reales o crisis de dolor vasooclusivo. La crisis de dolor vasooclusivo es la marca distintiva clínica de las oclusiones microvasculares y da cuenta de más de 90% de las hospitalizaciones de los pacientes adultos con ECF. Es bien sabido que la polimerización de la hemoglobina S durante la desoxigenación y la deformación falciforme de la célula conduce al bloqueo de la microvasculatura (40). Sin embargo, hace poco tiempo se aclaró que la polimerización de la hemoglobina S no es la única responsable de la vasooclusión. Ha quedado demostrado que eventos como la lisis del eritrocito falciforme, el daño y el estrés oxidativo de la membrana celular, el daño isquémico a repetición y la lesión de la microvasculatura debida a las interacciones adhesivas entre los eritrocitos falciformes y el endotelio culminan en un ambiente proinflamatorio (41-43). Se piensa que este ambiente de inflamación vascular crónica, la adherencia de los leucocitos, las plaquetas y los eritrocitos falciformes al endotelio activado del vaso sanguíneo y entre sí es una causa primaria del bloqueo de la microvasculatura y las crisis de dolor vasooclusivo (43-47). Otros factores como la rigidez de las células falciformes, el aumento de la viscosidad de la sangre y la vasoconstricción también se han identificado como posibles contribuyentes al proceso de oclusión vascular.

[0014] Los eventos vasooclusivos y las oclusiones repetidas a largo plazo que se presentan en la macrovasculatura pueden causar complicaciones potencialmente mortales que conducen a daño y falla de órganos, ACV y muerte (40). Existe una reducción de aproximadamente 20 a 30 años en la expectativa de vida de los pacientes aquejados por la enfermedad de células falciformes (48). El dolor crónico en la ECF no es apenas una continuación del dolor de la vasooclusión: Suele ser secundario a la necrosis avascular del hueso en varias articulaciones (49). Los eritrocitos falciformes pueden quedar atrapados en el bazo haciendo que se agrande y precipitando las crisis de secuestro esplénico que ocasionan anemia súbita y grave. La asplenia funcional deja al paciente susceptible a la infección (18). El retardo del crecimiento óseo, las complicaciones renales (32), oftálmicas (33) y cerebrovasculares (que varían desde el ACV agudo clínicamente evidente hasta el infarto isquémico silencioso transitorio) (50) se consideran las consecuencias clínicas más graves de la ECF y la lesión vasooclusiva (22). El síndrome torácico agudo es otra complicación grave (51) y es una causa significativa de morbilidad y mortalidad (52).

V

[0015] Los episodios de dolor parecen ser desencadenados por varios factores que incluyen frío, estrés y esfuerzo físico (38, 53). La frecuencia, gravedad, localización y duración de las crisis de dolor pueden variar en grado considerable, incluso dentro de un subtipo específico de la enfermedad. Los pacientes que tienen enfermedad de célula falciforme homocigota y β^0 -talasemia de células falciformes tienen una frecuencia más alta de crisis de dolor vasooclusivo que los pacientes que tienen genotipo de hemoglobina SC y β^0 -talasemia de células falciformes genotipo (54). Se piensa que la gravedad de la enfermedad depende de una compleja interacción de factores genéticos, reológicos y hematológicos, así como de factores microvasculares y endoteliales. Las crisis por lo común incluyen dolor de espalda, piernas, rodillas, brazos, pecho y abdomen (53). La frecuencia de las crisis y la gravedad del dolor varían en grado considerable de un paciente a otro y en el mismo paciente en el tiempo. Un estudio que evaluó las tasas de dolor en pacientes con edades desde recién nacidos hasta los 50 años de edad indicó que 5,2 por ciento de los pacientes con enfermedad de células falciformes presenta de tres a 10 episodios de dolor grave al año (54). En un estudio independiente más de 30% de los pacientes con enfermedad de células falciformes en Estados Unidos (aproximadamente 27.000 pacientes) tiene tres o más crisis de dolor al año (55). Más aún, un estudio reciente (PiSCES) que evaluó aspectos de la calidad de vida relacionada con la salud en los pacientes de ECF indicó que la crisis de dolor podría ser objeto de subregistro importante en los pacientes de ECF (56).

[0016] Terapias actuales para la oclusión vascular

[0017] La oclusión vascular en los pacientes de ECF se puede manifestar en múltiples formas incluidas crisis de dolor vasooclusivo, síndrome torácico agudo, eventos cerebrovasculares y múltiples tipos de falla orgánica. Por consiguiente, las modalidades de tratamiento para la oclusión vascular dependen del curso clínico y la gravedad de la enfermedad y por lo general son de naturaleza sintomática o paliativa. La educación del paciente en la evitación de los factores desencadenantes que precipitan las crisis de dolor vasooclusivo han mostrado cierto beneficio profiláctico. Los dos tratamientos sintomáticos más comunes son las transfusiones de sangre y los analgésicos. La mayoría de los pacientes de ECF por lo general tiene valores de hemoglobina entre 6 y 10 g/dL y los valores de hemoglobina suelen caer por lo menos 1 g por dL durante una crisis de dolor vasooclusivo. El dolor grave resultante de la crisis vasooclusiva se puede tratar con narcóticos pero su uso es controvertido debido a preocupaciones por la adicción y la tolerancia a los narcóticos. Otras complicaciones del uso de narcóticos son los comportamientos de búsqueda de la droga, la sedación y depresión respiratoria. El manejo con oxígeno se ha usado para tratar las crisis de dolor vasooclusivo a pesar de la falta de evidencia sólida que respalde su efectividad. La rehidratación también se usa en ocasiones durante las crisis de dolor vasooclusivo con cierto beneficio (22, 38).

[0018] El trasplante de médula ósea se puede considerar y puede ser curativo, pero su uso está restringido a un número limitado de pacientes y comporta un alto riesgo de morbilidad y mortalidad (22).

[0019] La idroxiurea (Droxia) es el único medicamento aprobado por la FDA para el

7

tratamiento de las crisis de dolor de la ECF. Los mecanismos por los cuales produce sus efectos beneficiosos son inciertos pero pueden involucrar el aumento de los niveles de hemoglobina F en los glóbulos rojos reduciendo así el nivel de polimerización de la hemoglobina S. La hidroxiurea es citotóxica, mielosupresora y teratogénica (57, 58) lo cual supone un riesgo carcinogénico para los pacientes de ECF. Sin embargo, en la actualidad se desconocen los efectos a largo plazo sobre las toxicidades hematológicas, daño de órganos y carcinogenicidad (59, 60).

[0020] En resumen, la mayoría de las terapias para las crisis de dolor vasooclusivo en pacientes con ECF ofrece alivio sintomático y no soluciona la causa subyacente de esta afección debilitante. Hasta la fecha solo una terapia ha sido aprobada por la FDA para el tratamiento de las crisis de dolor; así pues, los pacientes con ECF representan una gran necesidad médica insatisfecha en una enfermedad potencialmente mortal con morbilidad grave.

[0021] La P-selectina como diana terapéutica para la ECF

[0022] En la ECF, como se anotó arriba, las interacciones entre los eritrocitos falciformes, las plaquetas, los leucocitos y la microvasculatura son procesos dependientes de la P-selectina y dan lugar a vasooclusión y crisis de dolor. Los estudios en ratones transgénicos modificados para que expresen hemoglobina β^S humana (β^S) han demostrado que la inhibición mediada por anticuerpos de la función de la P-selectina puede prevenir y/o reducir la vasooclusión, lo cual indica un potencial terapéutico para esta diana. Además, los ratones que expresan la hemoglobina β^S que carecen de P-selectina (debida a delección del gen) no sufren vasooclusión, lo cual respalda todavía más la existencia de un papel clave para esta molécula en esta morbilidad.

[0023] El estado hiperinflamatorio en los pacientes de ECF se caracteriza por activación de los monocitos y el endotelio vascular (61-63). Un fenotipo similar proinflamatorio se demostró en ratones β^S en estado de reposo que muestran niveles elevados de leucocitos y neutrófilos periféricos, un aumento del número de leucocitos rodantes y adherentes y una reducción del volumen del flujo sanguíneo y las velocidades de los glóbulos rojos (64). Los ratones fueron β^S hipersensibles a hipoxia/reoxigenación lo cual dio lugar a una respuesta inflamatoria representada por un aumento significativo del número de leucocitos adherentes y emigrados. Esta respuesta inflamatoria fue completamente bloqueada por un anticuerpo anti-P-selectina de ratón funcionalmente bloqueador, pero no por un anticuerpo anti-E-selectina de ratón funcionalmente bloqueador, lo cual demuestra un papel fundamental para la P-selectina en este proceso.

[0024] P-selectina desempeña su papel crucial en el reclutamiento de los leucocitos a los sitios de inflamación y trombosis uniéndose a su contra-receptor, ligando 1 de la glucoproteína de P-selectina (PSGL-1) (o un receptor similar al PSGL-1 en glóbulos rojos falciformes), que es una glucoproteína similar a la mucina que se expresa de forma constitutiva en los leucocitos incluidos neutrófilos, monocitos, plaquetas y sobre algunas células endoteliales (68). La función fisiológica última de las selectinas es promover la extravasación de los leucocitos hacia los tejidos inflamados o dañados. La unión inicial de la

6

P-selectina sobre el endotelio al PSGL-1 sobre los leucocitos es esencial y capital para este proceso. El mecanismo predominante para el rodaje y la atadura de los leucocitos al endotelio y las plaquetas activadas es la unión del PSGL-1 del leucocito a la P-selectina sobre estas células (68, 69). El PSGL-1 se une a la P-, L- y E-selectina (70). La P-selectina y SGP-3, un glucosulfopéptido modelado a partir del N-terminal del PSGL-1, han sido cristalizados conjuntamente y los residuos de contacto para la unión lectina-ligando han sido identificados (71).

[0025] Las selectinas comparten los mismos motivos estructurales que incluyen un dominio de lectina (o dominio de reconocimiento de carbohidratos), un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF), una serie variable de repeticiones de consenso, un dominio de transmembrana y una cola citoplásmica (70). Como ya se anotó, la ligadura y el rodaje iniciales de los leucocitos están mediados por la interacción de P-selectina y PSGL-1. Así pues, el bloqueo de la función de la P-selectina con el uso de (1) anticuerpos contra P-selectina, (2) anticuerpos contra PSGL-1, (3) fragmentos de PSGL-1 o formas recombinantes de PSGL-1, (4) pequeñas moléculas que simulan el dominio de unión de PSGL-1 y (5) otras moléculas que interrumpen la unión de la P-selectina al PSGL-1, pueden bloquear el rodaje y atadura de los leucocitos y prevenir así la adhesión firme a las células endoteliales o las plaquetas. Los ratones deficientes en P-selectina o PSGL-1 tampoco respaldan la atadura y rodaje de los leucocitos sobre las células endoteliales activadas (72, 74). La L-selectina desempeña un papel dual en que se expresa de forma constitutiva sobre los leucocitos circulantes y puede iniciar una "unión secundaria" por interacción con PSGL-1 sobre otros leucocitos (75). Este proceso conduce a reclutamiento adicional de nuevos leucocitos al área inflamada. La unión de la L-selectina a PSGL-1 también desempeña un papel en el enfoque de los linfocitos sobre las vénulas de la alta vasculatura endotelial (HEV) en el sistema linfático secundario (76). La E-selectina está regulada por la transcripción y se expresa sobre las células endoteliales activadas horas después de los eventos mediados por la P-selectina. La E-selectina se puede unir a PSGL-1 con baja afinidad sino también se puede unir otros ligandos. Los ratones transgénicos con supresión única para cada selectina han demostrado que estas moléculas poseen mecanismos compensatorios de selectina para el enfoque y rodaje de los leucocitos (77).

[0026] En vista de lo anterior, existe una necesidad bien establecida de nuevos tratamientos, como anticuerpos, con la P-selectina como diana, como medio para tratar las enfermedades inflamatorias y trombóticas mediante la disrupción de la unión de la P-selectina y el PSGL-1. Por consiguiente, una meta de los conceptos inventivos que aquí se revelan es bloquear la unión de la P-selectina al PSGL-1 bloqueando así la adherencia de las células sanguíneas que contribuyen a la vasooclusión en la ECF y otros trastornos trombóticos como se discute en otra parte de este documento.

RESUMEN DE LA REVELACIÓN

[0027] Los conceptos inventivos que aquí se revelan están dirigidos a anticuerpos de "doble función" que se unen específicamente a la P-selectina y no solo bloquean la unión de PSGL-1 a P-selectina, sino que también disocian los complejos preformados P-

9

selectina/PSGL-1. La presente revelación describe un dominio de unión de anticuerpo previamente desconocido (un epítoto conformacional) dentro del dominio de la lectina (p.ej., dominio de reconocimiento de carbohidratos, CRD) de la P-selectina al cual se unen los anticuerpos de doble función (los cuales pueden ser anticuerpos quiméricos, humanos o humanizados o fragmentos de los mismos por ejemplo). Los conceptos inventivos que aquí se revelan por consiguiente se refieren a anticuerpos anti-P selectina o fragmentos de los mismos los cuales se unen al epítoto conformacional aquí descrito y los cuales tienen una doble función de (1) bloquear la unión de PSGL-1 a P-selectina y (2) causar la disociación de los complejos preformados P-selectina/PSGL-1. Los conceptos inventivos que aquí se revelan en particular están dirigidos a usar esos anticuerpos de doble función anti-P selectina o fragmentos de anticuerpos como están aquí descritos en tratamientos para patologías o trastornos inflamatorios, trombóticos u otros en primates (incluidos los seres humanos) los cuales involucran la adhesión de plaquetas, eritrocitos falciformes, leucocitos, linfocitos y/o células endoteliales, que se caracteriza porque la patología o trastorno comprende o está asociada con (pero sin limitaciones) por lo menos uno de entre crisis de dolor vasooclusivo por células falciformes, enfermedad intestinal inflamatoria (p.ej., enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y enteritis), artritis (p.ej., artritis reumatoide, osteoartritis y artritis psoriásica), rechazo de injerto, enfermedad injerto contra huésped, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, psoriasis, dermatitis, sepsis, nefritis, lupus eritematoso, escleroderma, rinitis, anafilaxia, diabetes, esclerosis múltiple, aterosclerosis, trombosis, metástasis tumorales, reacciones alérgicas, tiroiditis, lesión isquémica por reperfusión (p.ej., debida a infarto de miocardio, ACV o trasplante de órganos) y patologías asociadas con traumatismos extensos o inflamación crónica como, por ejemplo, hipersensibilidad retardada de tipo IV, asociada por ejemplo con infección por bacilos tuberculosos o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o falla multisistémica. Es importante anotar que el uso de esos anticuerpos de doble función como los aquí descritos para el tratamiento estas enfermedades inflamatorias permite no solo la prevención de la inflamación, sino que también proporciona un mecanismo para tratar procesos continuados de enfermedad inflamatoria en los cuales los anticuerpos pueden disociar complejos preformados de P-selectina/PSGL-1. Por ejemplo, en el caso de las crisis de dolor vasooclusivo por células falciformes, los anticuerpos que tienen actividad de doble función no solo inhiben o previenen futuros eventos vasooclusivos, sino que también permiten el tratamiento de la vasooclusión continuada. Otras modalidades de los conceptos inventivos que aquí se revelan serán aparentes en la siguiente Descripción Detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0028] La Figura 1 muestra una comparación de homología en el nivel de los aminoácidos de P-selectina humana y murina, la cual indica la localización de los dominios de lectina, EGF, CR1 y CR2 (la transición entre dominios está indicada por flechas). Los dominios conformacionales no lineales A, B, C1, D, E1, C2, E2, C3 y F están indicados por cajas punteadas. Las diferencias en aminoácidos están indicados en negrita.

[0029] La Figura 2 muestra datos representativos de unión de la quimera de P-

10

selectina BIAcore en dos etapas para la unión de los anticuerpos anti-P selectina G1, G3, G4 y G5 a SEQ ID NO: 1-4, 7-10, 18 y 19. Nótese que la unión del anticuerpo G5 en el ensayo de unión BIAcore de dos etapas solamente se llevó a cabo para SEQ ID NOs: 1, 2, 18 y 19. G4 es un novedoso anticuerpo monoclonal anti-P-selectina de ratón que es producido por células de hibridoma depositadas como Designación de Depósito de Patente PTA-12154 en la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, un repositorio público reconocido.

[0030] La Figura 3 muestran sensogramas BIAcore que demuestran el bloqueo de la interacción de la P-selectina con PSGL-1 usando anticuerpos anti-P selectina G1, G3, G4 y hSel001 (hSel001, también conocido como SelG1, es una forma humanizada de G1) por los métodos aquí descritos. Se demostró que G1, G3, G4 y hSel001 bloquean la interacción de la P-selectina con el glucosulfopéptido GSP-6, un mimético de PSGL-1. G5 se une la P-selectina, pero no la bloquea. El control es la unión en el estado de equilibrio de la P-selectina a GSP-6.

[0031] La Figura 4 muestran sensogramas BIAcore que demuestran la disociación del complejo preformado P-selectina/PSGL-1 tras la exposición a los anticuerpos de doble función anti-P selectina G1, G4 y hSel001. PSGL-1 es representado por péptido GSP-6, un mimético de PSGL-1. El aumento inicial de RU muestra la unión de la P-selectina a la biotina-GSP-6 acoplada a un chip BIAcore recubierto de estreptavidina. Una vez se alcanzó la unión en el estado de equilibrio del complejo P-selectina/GSP-6 (es decir, después de que la disociación normal del complejo había alcanzado el cuasi-equilibrio), se inyectaron anticuerpos de prueba y se valoraron sus propiedades de disociación. G5 se ligó al complejo preformado, pero no causó su disociación. G3 no se ligó, ni disoció el complejo preformado P-selectina/PSGL-1. G1, G4 y hSel001 se ligaron y causaron la disociación del complejo preformado P-selectina/GSP-6, lo cual indica novedosas capacidades de doble función.

[0032] La Figura 5 muestra una representación tridimensional de una molécula de P-selectina humana con GSP-6 unida a ella. Los dominios de lectina y EGF están demarcados por una línea punteada. La región de unión 1 identifica un epítipo conformacional Cúmulo A que es distal al dominio de unión lectina/ligando. El anticuerpo de prueba G1 se ligó a la región 1, Cúmulo A. G4 y hSel001 también se ligaron a la región 1, Cúmulo A.

[0033] La Figura 6 muestra gráficas de resultados de ensayos de rodamiento *in vitro* basados en células bajo flujo de neutrófilos humanos sobre P-selectina de baja y alta densidad. Los resultados demuestran el bloqueo y/o disociación del complejo preformado P-selectina/PSGL-1 y la liberación subsiguiente de neutrófilos tras la exposición a los anticuerpos G1, G3, G4 y hSel001. Los anticuerpos se introdujeron en concentraciones equivalentes de 20 µg/mL durante todo el estudio. Existe un rezago de tiempo de cerca de 1 minuto antes de que el anticuerpo alcance la cámara debido al volumen muerto del sistema. A intervalos de 1 minuto en lo sucesivo, las células que permanecían ligadas fueron contadas y se expresaron como % de células ligadas. Los paneles (A) y (C) muestran neutrófilos rodando a velocidades promedio de 5 µm/s y 6.5 µm/s respectivamente sobre P-

selectina de baja densidad (50 sitios / μm^2) de membrana. Los paneles (B) y (D) muestran neutrófilos rodando a una velocidad promedio de 1 $\mu\text{m/s}$ sobre P-selectina de alta densidad (380 sitios/ μm^2).

[0034] La Figura 7 es un sensograma que muestra la cinética de la unión de G1 y hSel001 a la P-selectina a una única concentración de P-selectina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0035] Antes de explicar por lo menos una modalidad de los conceptos inventivos que aquí se revelan en detalle por medio de dibujos ejemplares, experimentación, resultados y procedimientos de laboratorio, se debe entender que los conceptos inventivos no están limitados en su aplicación a los detalles de construcción y la configuración de los componentes estipulados en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos, experimentación y/o resultados. Los conceptos inventivos son capaces de otras modalidades o de ser practicados o realizados en diversas formas. En ese sentido, el lenguaje que aquí se usa tiene por objeto abarcar el alcance y el significado más amplios posibles; y las modalidades pretenden ser ejemplares – no exhaustivas. Así mismo, se debe entender que la fraseología y la terminología empleadas aquí tienen por objeto describir y no han de considerarse como limitantes.

[0036] A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos empleados en relación con los conceptos inventivos que aquí se revelan tendrán los significados que son comúnmente entendidos por la persona medianamente versada en la materia técnica correspondiente. Además, a menos que el contexto exija otra cosa, los términos en singular incluirán las pluralidades y los términos en plural incluirán al singular. En general, las nomenclaturas utilizadas en relación con y las técnicas de, cultivos celulares y tisulares, biología molecular y proteína y química e hibridación de oligo- o polinucleótidos aquí descritas son las bien conocidas y comúnmente empleadas en el estado de la técnica. Se usan técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (p.ej., electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se logra comúnmente en la técnica o como está aquí descrito. Las anteriores técnicas y procedimientos en general se llevan a cabo de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como están descritos en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten en toda la presente especificación. Ver p.ej., Sambrook et al. Molecular Clonación: A Laboratory Manual (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Coligan et al. Current Protocols in Immunology (Current Protocols, Wiley Interscience (1994)), los cuales se incorporan a la presente mediante referencia. Las nomenclaturas utilizadas en relación con y los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química de síntesis orgánica y química medicinal y farmacéutica aquí descritas son las bien conocidas y comúnmente empleadas en el estado de la técnica. Se usan técnicas estándar para las síntesis químicas, los análisis químicos, preparación, formulación y administración de especialidades farmacéuticas y el tratamiento

de los pacientes.

[0037] Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la especificación son indicativas del nivel de destreza de la persona medianamente versada en la técnica a la cual pertenecen los conceptos inventivos que aquí se revelan. Todas las publicaciones y solicitudes de patente se incorporan a la presente mediante referencia en el mismo grado que si cada publicación o solicitud de patente individual estuviese indicada específica e individualmente mediante referencia.

[0038] Todas las composiciones y/o métodos revelados y reivindicados aquí pueden hacerse y realizarse sin experimentación indebida a la luz de la presente revelación. Aunque las composiciones y los métodos de los conceptos inventivos que aquí se revelan han sido descritos en términos de modalidades preferidas, será aparente para la persona medianamente versada en la técnica que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y/o métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método aquí descrito sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de los conceptos inventivos. Todos esos sustitutos y modificaciones similares aparentes para la persona medianamente versada en la técnica se considera que caen dentro del espíritu, alcance y concepto de los conceptos inventivos definidos por las reivindicaciones que se anexan.

[0039] Tal como se usa de conformidad con la presente revelación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

[0040] El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa en conjunto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar "uno", pero también concuerda con el significado de "uno o más", "por lo menos uno" y "uno o más de uno." El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para denotar "y/o" a menos que explícitamente se indique que se refiere a alternativas únicamente o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la revelación respalda una definición que se refiere a alternativas solamente e "y/o". A lo largo de esta solicitud, el término "cerca de" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método que se está usando para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos de estudio. El uso del término "por lo menos uno" se entenderá que incluye uno así como cualquier cantidad mayor de uno, que incluye, pero sin limitaciones, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, etc. El término "por lo menos uno" puede extenderse hasta 100 o 1000 o más, dependiendo del término al cual se adhiere; además, las cantidades de 100/1000 no se deben considerar como limitantes, porque los límites más altos también pueden producir resultados satisfactorios.

[0041] El término "cerca de" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método que se está usando para determinar el valor y/o la variación que existe entre sujetos de estudio.

[0042] Tal como se usa en la presente especificación y en las reivindicaciones, las palabras "que comprende" (y cualquier forma de "que comprende", como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de "que tiene", como "tienen" y "tiene"),

3

"incluidos" (y cualquier forma de "incluidos, como "incluidas" e "incluidos") o "que contiene" (y cualquier forma de "que contiene", como "contiene" y "contienen") son inclusivos o abiertos y no excluyen, elementos adicionales o etapas de método no citadas.

[0043] El término "o combinaciones de los mismos" tal como se usa en este contexto se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los artículos enumerados que preceden al término. Por ejemplo, "A, B, C o combinaciones de los mismos" tiene por objeto incluir por lo menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC y si el orden es importante en un contexto o particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o más artículos o términos, como BB, AAA, MB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB y así sucesivamente. La persona medianamente versada en la técnica entenderá que típicamente no hay límite para el número de artículos o términos en cualquier combinación, a menos que el contexto dicte específicamente otra cosa.

[0044] Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. El término "polipéptido" tal como se usa en este contexto es un término genérico que se usa para referirse una proteína nativa, fragmentos de proteína o análogos de una secuencia polipeptídica. Por tanto, proteína nativa, fragmentos de proteína y análogos son especies del género polipéptido. El término "péptido/polipéptido/proteína aislado" tal como se usa en este contexto se refiere a un péptido/polipéptido/proteína de ADNc, ARN recombinante, u origen sintético o alguna combinación de los mismos, el cual por virtud de su origen o fuente de derivación, el "péptido/polipéptido/proteína aislado": (1) no está asociado con péptidos/polipéptidos/proteínas que se encuentran en la naturaleza, (2) está libre de otros péptidos/polipéptidos/proteínas de la misma fuente, p.ej., libre de proteínas murinas, (3) es expresado por una célula de una especie diferente, y/o (4) no está presente en la naturaleza.

[0045] Tal como se usa en este contexto, el término "aminoácido" abarca todas las moléculas, ya sea naturales o sintéticas, que incluyen tanto una funcionalidad amino como una funcionalidad ácida y susceptible de ser incluidas en un polímero de aminoácidos naturales. Los aminoácidos ejemplares incluyen aminoácidos naturales; análogos, derivados y congéneres de los mismos; análogos de aminoácidos que tienen cadenas laterales variantes; y todos los estereoisómeros de cualquiera de los anteriores. Cuando se usa aquí, el término "aminoácido de ratón" se refiere a un residuo de aminoácido que se encuentra en P-selectina de ratón pero no se encuentra en la posición correspondiente en la P-selectina humana. Cuando se usa aquí, el término "aminoácido humano" se refiere a un residuo de aminoácido que se encuentra en la P-selectina humana pero no se encuentra en la posición correspondiente en la P-selectina de ratón.

[0046] Tal como se usan en este contexto, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Ver Immunology -- A Synthesis (2ª Edición, E. S. Golub y D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), la cual se incorpora a la presente mediante referencia. Los estereoisómeros (p.ej., D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales como aminoácidos α,α -

14

disustituidos, N-alquilo aminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de los conceptos inventivos que aquí se revelan y reivindican. Algunos ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, α -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (p.ej., 4-hidroxiprolina). En la notación de los polipéptidos que se usa aquí, la dirección hacia la izquierda es la dirección del amino terminal y la dirección hacia la derecha es la dirección del carboxi-terminal, de conformidad con el uso estándar y la convención.

[0047] Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan de forma intercambiable. Se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: regiones codificadoras o no codificadoras de un gen o fragmento de gen, loci (locus) definidos a partir de análisis de vinculación, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas y cebadores de ácidos nucleicos. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, como nucleótidos metilados y análogos de nucleótido. Si están presentes, las modificaciones de la estructura del nucleótido se pueden impartir antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede ser modificado adicionalmente, como por conjugación con un componente de marcación. Los términos "ácido nucleico aislado" y "polinucleótido aislado" se usan de forma intercambiable; un ácido nucleico o polinucleótido se considera "aislado" si: (1) no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido en el cual el "polinucleótido aislado" que se encuentra en la naturaleza, (2) está vinculado a un polinucleótido al cual no se encuentra vinculado en la naturaleza o (3) no está presente en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

[0048] El término "vector", tal como se usa en este contexto, tiene por objeto referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido vinculado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un asa circular de doble hebra de ADN dentro de la cual se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, que se caracteriza porque se pueden ligar segmentos adicionales de ADN pueden ser ligados dentro del genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped dentro de la cual se introducen (p.ej., vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episómicos de mamíferos). Otros vectores (p.ej., vectores no episómicos de mamíferos) se pueden integrar dentro del genoma de una célula huésped tras su introducción dentro de la célula huésped y por ello ser replicados junto con el genoma del huésped. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes. Esos vectores se denominan aquí "vectores recombinantes de expresión" (o sencillamente, "vectores de expresión").

15

[0049] El término "natural" tal como se usa en este contexto cuando se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, un polinucleótido o una secuencia polipeptídica que está presente en un organismo (incluidos los virus) que se puede aislar de una fuente de la naturaleza y que no ha sido modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio o de otra forma es natural. El término "natural" se puede usar de forma intercambiable con el término "nativo".

[0050] "Leucocito rodante" tal como se usa en este contexto, incluye adhesión débil de los leucocitos a las células endoteliales de los vasos sanguíneos y al rodamiento de los leucocitos a lo largo de las células endoteliales de los vasos sanguíneos antes de la adhesión firme y la trans migración de los leucocitos hacia el interior del tejido endotelial. Luego del rodamiento de los leucocitos, estos leucocitos adherentes pueden migrar a través del endotelio y destruir tejido isquémico durante la reperfusión. Según esto, la reducción del rodamiento de los leucocitos se traduce en una reducción del daño causado a los órganos y tejidos por la respuesta inflamatoria aguda.

[0051] Tal como se usa en este contexto, un "antagonista de la P-selectina" incluye cualquier agente capaz de antagonizar la P-selectina, p.ej., inhibiendo la interacción entre la P-selectina y un ligando 1 de la glucoproteína P-selectina, p.ej., inhibiendo las interacciones de las células endoteliales que expresan P-selectina y las plaquetas activadas con los leucocitos que expresan PSGL-1.

[0052] El término "aislado" o "purificado" se refiere a una molécula que es sustancialmente libre de su ambiente natural y es la especie predominante presente (p.ej., con base molar) como más de 50% de la composición. Por ejemplo, una proteína aislada está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas de la fuente celular o tisular de la cual se derivó. El término también se refiere a preparaciones en las cuales la proteína aislada es por lo menos 60% (p/p) pura o por lo menos 70% (p/p) pura; o por lo menos 75% (p/p) pura; o por lo menos 80% (p/p) pura; o por lo menos 85% (p/p) pura o por lo menos 90% (p/p) pura o por lo menos 92% (p/p) pura o por lo menos 95% (p/p) pura o por lo menos 96% (p/p) pura o por lo menos 97% (p/p) pura o por lo menos 98% (p/p) pura o por lo menos 99% (p/p) pura o 100% (p/p) pura. En algunas modalidades, la molécula aislada es suficientemente pura para composiciones farmacéuticas.

[0053] Actividad "inhibitoria" se refiere a una reducción de una actividad de P-selectina por un inhibidor de la P-selectina (como un anticuerpo o fragmento del mismo), con respecto a la actividad de P-selectina en ausencia del mismo inhibidor. Un anticuerpo neutralizador puede reducir una o más actividades de P-selectina. Por ejemplo, la reducción de la actividad (p.ej., unión de la P-selectina a PSGL-1) es de preferencia por lo menos cerca de 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90% o por lo menos 95% o más alto. En otro ejemplo, la actividad disociativa de un anticuerpo de doble función o fragmento (es decir, el porcentaje de complejo preformado P-selectina/PSGL-1 que puede hacerse que se disocie) puede ser por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo

16

menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95% o más alta.

[0054] El término "inhibidor de la P-selectina" cuando se usa en este contexto incluye cualquier agente, como, p.ej., un anticuerpo neutralizador, capaz de inhibir actividad, expresión, procesamiento, unión o localización en la superficie celular de la P-selectina. Se dice que esos inhibidores "inhiben", "neutralizan" o "reducen" la actividad biológica de la P-selectina.

[0055] El término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de una molécula biológicamente activa o conjugado o derivado de la misma suficiente para mostrar un efecto terapéutico detectable de preferencia sin efectos secundarios adversos indebidos (como toxicidad, irritación y respuesta alérgica) correspondiente a una proporción beneficio/riesgo razonable cuando se usa en la forma de los conceptos inventivos que aquí se revelan. El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a compuestos y composiciones que son adecuados para administración a seres humanos y/o animales sin efectos secundarios adversos indebidos como toxicidad, irritación y/o respuesta alérgica correspondiente con una proporción beneficio/riesgo razonable. Los compuestos de los conceptos inventivos que aquí se revelan pueden ser diseñados para que proporcionen liberación retardada, controlada o sostenida usando técnicas de formulación bien conocidas del estado de la técnica.

[0056] El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico en un polipéptido que interactúa con un sitio de unión específico en el antígeno en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como un parátipo. Los epítipos pueden ser lineales o conformacionales. Un epítipo conformacional es producido por aminoácidos yuxtapuestos espacialmente de diferentes segmentos de una cadena polipeptídica lineal.

[0057] El término "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en este contexto se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, por lo general están dirigidos contra a un único sitio epitópico. Además, en contraposición con preparaciones convencionales de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque, en una modalidad, son sintetizados por el cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El calificativo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no se debe interpretar como la exigencia de la producción del anticuerpo por cualquier método particular.

[0058] Anticuerpos

[0059] Las moléculas de anticuerpos pertenecen a una familia de proteínas plasmáticas llamadas inmunoglobulinas, cuyos elementos fundamentales básicos, el pliegue o dominio inmunoglobulina, se usan en varias formas en muchas moléculas del sistema

✓ 17

inmunológico y otros sistemas de reconocimiento biológico. Una inmunoglobulina típica tiene cuatro cadenas de polipéptidos, que contienen una región antigénica de unión conocida como región variable y una región invariable conocida como la región constante.

[0060] Los anticuerpos e inmunoglobulinas nativos suelen ser glucoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas idénticas ligeras (L) y dos cadenas idénticas pesadas (H). cada cadena ligera está vinculada a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en el otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada.

[0061] Dependiendo de las secuencias de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden ser asignadas a diferentes clases. Existen por lo menos cinco grandes clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de ellas se pueden subdividir en subclases (isotipos), p.ej. IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ e IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ), respectivamente. Las cadenas ligeras de anticuerpos pueden ser asignadas a uno de dos tipos claramente diferenciados, llamados kappa (κ) y lambda (λ), con base en las secuencias de amina de su dominio constante. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

[0062] El término "variable" en el contexto del dominio variable de anticuerpos, se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensamente en la secuencia entre anticuerpos. Los dominios variables son para la unión y determinan la especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida equitativamente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos por cadena llamados regiones determinadoras de complementariedad (CDRs), también conocidas como regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. En la mayoría de los casos, están presentes tres CDRs en una región variable de cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3) y hay tres CDRs presentes en una región variable de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3). Las CDRs contribuyen a la actividad funcional de una molécula de anticuerpo y están separadas por secuencias de aminoácidos que comprenden regiones de andamiaje o marco. Entre las diversas CDRs, las secuencias CDR3 y en particular CDRH3, son las más diversas y por consiguiente prestan la más fuerte contribución a la especificidad del anticuerpo. Hay por lo menos dos técnicas para determinar las CDRs: (1) un abordaje basado en la variabilidad de secuencia entre especies (es decir, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health,

46

Bethesda, Md. (1987), la cual se incorpora a la presente en su integridad mediante referencia); y (2) un abordaje con base en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Chothia et al., Nature, 342:877 (1989), la cual se incorpora a la presente en su integridad mediante referencia).

[0063] Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan el marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que en su mayor parte adoptan una configuración β -lámina, conectada por tres CDRs, las cuales forman asas que conectan y en algunos casos hacen parte de la estructura en β -lámina. Las CDRs en cada cadena liviana y pesada se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Los dominios constantes no participan directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

[0064] Por tanto, un anticuerpo de los conceptos inventivos que aquí se revelan puede presentarse en cualquiera de una variedad de formas, incluida una inmunoglobulina completa, un fragmento de anticuerpo como Fv, Fab y fragmentos similares, anticuerpo de cadena única que incluye las regiones determinadoras de complementariedad del dominio variable (CDRs) y las formas similares, todas las cuales caen dentro del término amplio "anticuerpo", tal como se usa en este contexto. En modalidades preferidas, en el contexto de los métodos terapéuticos y de tamizaje que se describen más adelante, se usa un anticuerpo o fragmento del mismo que es inmunoespecífico para un antígeno o epítipo de los conceptos inventivos que aquí se revelan como está aquí descrito.

[0065] El término "fragmento de anticuerpo" tal como se usa en este contexto se refiere a una porción de un anticuerpo de longitud completa, por lo general la región de unión al antígeno o región variable. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, llamados el fragmento Fab, cada uno de los cuales tiene un sitio único de unión al antígeno y un fragmento residual "Fc", así llamado por su capacidad de cristalizarse rápidamente. El tratamiento con pepsina arroja un fragmento F(ab')₂ que tiene dos fragmentos de unión al antígeno que son capaces de enlazar cruzadamente al antígeno y otro fragmento residual (denominado pFc'). Otros fragmentos pueden incluir diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena única y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo. Tal como se usa en este contexto, "fragmento funcional" con respecto a los anticuerpos, se refiere a fragmentos Fv, F(ab) y F(ab')₂. Los fragmentos de anticuerpos de los conceptos inventivos que aquí se revelan pueden ser tan pequeños como de cerca de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 a 35, a 40, a 45, a 50, a 75, a 100 o a 150 a 200 a 250 (inclusive) o más aminoácidos, por ejemplo.

[0066] Algunos tipos de fragmentos de anticuerpo se definen como sigue:

19

[0067] Fab es el fragmento que contiene un fragmento de unión al antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo. un fragmento Fab se pueden producir por digestión de anticuerpo completo con la enzima papaína para dar una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada.

[0068] Fab' es el fragmento de una molécula de anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para dar una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada. Se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo.

[0069] Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el carboxilo terminal del dominio CH1 de la cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región de la bisagra del anticuerpo.

[0070] (Fab')₂ es el fragmento de un anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción subsiguiente. F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos por dos enlaces disulfuro.

[0071] Fv es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión al antígeno. Esta región consta de un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una cadena ligera en una asociación estrecha no covalente (dímero VH-VL). Es en configuración como las tres CDRs de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno sobre la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDRs confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDRs específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y ligar el antígeno, aunque con menor afinidad que todo el sitio de unión.

[0072] Un anticuerpo de cadena única (SCA) se define aquí como una molécula obtenida por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, vinculadas por un eslabón polipeptídico adecuado como una molécula de cadena única genéticamente fusionada. Esos anticuerpos de cadena única también se llaman "Fv de cadena única" o fragmentos de anticuerpo "sFv" o "scFv". Por lo general, el polipéptido Fv además comprende un eslabón polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el sFv forme la estructura deseada de unión al antígeno.

[0073] Los conceptos inventivos que aquí se revelan en una modalidad están dirigidos a anticuerpos que específicamente se unen a la P-selectina humana. Las CDRs en esos anticuerpos no están limitadas a las secuencias específicas de VH y VL y pueden incluir variantes de estas secuencias que conservan la capacidad de bloquear y disociar la unión de la P-selectina a PSGL-1. Esas variantes pueden ser producidas por la persona versada en la técnica usando técnicas bien conocidas del estado de la técnica. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en los FRs y/o en las CDRs como se describe en otra parte de este documento. Aunque los cambios en los FRs suelen estar diseñados para mejorar la estabilidad y reducir la inmunogenicidad del anticuerpo, los cambios en las CDRs típicamente están diseñados para aumentar la afinidad del anticuerpo por su diana. Las variantes de los FRs también incluyen alotipos de inmunoglobulinas

20

nales. Esos cambios que aumentan la afinidad se pueden determinar empíricamente por técnicas habituales que comprenden la alteración de la CDR y el examen de la afinidad del anticuerpo por su diana.

[0074] Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones conservadoras de aminoácidos dentro de cualquiera de las CDRs reveladas. Se pueden hacer varias alteraciones de acuerdo con métodos bien conocidos de la persona medianamente versada en la técnica (78). Incluyen pero no están limitados a secuencias de nucleótidos que se alteran por la sustitución de diferentes codones que codifican un residuo de aminoácido idéntico o funcionalmente equivalente ("sustituciones conservadoras") dentro de la secuencia, produciendo así un cambio "silencioso". Por ejemplo, los aminoácidos no polares que pueden sustituirse de forma conservadora entre sí incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares que pueden sustituirse de forma conservadora entre sí incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos de carga positiva (básicos) que pueden sustituirse de forma conservadora entre sí incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos de carga negativa (ácidos) que se pueden sustituir de forma conservadora entre sí incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Los sustitutos para un aminoácido dentro de la secuencia también pueden seleccionarse de entre otros miembros de la clase a la cual pertenece el aminoácido.

[0075] Los derivados y análogos de los anticuerpos de los conceptos inventivos que aquí se revelan pueden ser producidos por varias técnicas bien conocidas del estado de la técnica, incluidos métodos recombinantes y sintéticos (79, 80). Los anticuerpos en los cuales las secuencias CDR difieren solo de forma insustancial y conservadora de los de las regiones variables de los anticuerpos anti-P selectina como hSel001, que se discuten en mayor detalle más adelante, también caen dentro del alcance de la presente invención. Como se anotó arriba, típicamente, un aminoácido es sustituido por un aminoácido emparentado que tiene características similares de carga, hidrofobicidad o estereoquímicas. Esas sustituciones caen dentro de las destrezas ordinarias de la persona medianamente versada. Además, la persona versada en la técnica apreciará que se pueden hacer cambios en FRs sin afectar adversamente las propiedades de unión de un anticuerpo. Los cambios de los FRs incluyen, pero sin limitaciones, humanizar un derivado no humano o modificar por ingeniería ciertos residuos del marco que son importantes para el contacto con el antígeno o para estabilizar el sitio de unión, p.ej., cambiando la clase o subclase de la región constante, cambiar residuos específicos de aminoácidos que podrían alterar la función efectora como la unión al receptor de Fc.

[0076] Los conceptos inventivos que aquí se revelan en una modalidad están dirigidos a anticuerpos que se unen específicamente a la P-selectina que se caracterizan porque las CDRs de un anticuerpo parental no humano se injertan dentro de FRs de anticuerpos aceptores humanos, un proceso llamado humanización del anticuerpo. El proceso de humanización está diseñado para reducir la inmunogenicidad de un anticuerpo no humano al tiempo que se mantiene la mayor parte de la afinidad original posible. En una

modalidad, los FRs humanos aceptores de cadena pesada y/o cadena ligera son secuencias no mutadas de aminoácidos de las secuencias de la línea germinal de la cual se derivaron. Sería de esperar que esos FRs de la línea germinal no sean inmunogénicos considerando que estas secuencias están presentes en todos los seres humanos antes de la reconfiguración de los anticuerpos y la maduración de la afinidad. Además, los residuos de aminoácidos de esos FRs de anticuerpos, en particular residuos adyacentes o situados cerca de las CDRs, pueden requerir sustituciones de aminoácidos para preservar mejor la afinidad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, cuando aminoácidos clave difieren entre un FR variable del anticuerpo monoclonal parental murino y el FR variable aceptor humano, los aminoácidos del FR humano pueden ser sustituidos por los residuos de aminoácidos de ratón en esas posiciones. No obstante, se prevé que los FRs de la cadena pesada y/o la cadena ligera pueden no contener sustituciones de aminoácidos y los anticuerpos derivados de esa humanización pueden seguir poseyendo gran parte si no toda la afinidad de unión del anticuerpo parental. Además, los anticuerpos de la invención pueden contener FRs humanos VH y/o VL que son de secuencia puramente de línea germinal y también carecen de sustituciones en una o ambas de estas secuencias FR.

[0077] Tal como se usa en este contexto, la "afinidad" del anticuerpo por la P-selectina o el epítipo conformacional la misma se caracteriza por su K_d o constante de disociación. Una afinidad más fuerte está representada por una K_d más baja en tanto que una afinidad más débil está representada por una K_d más alta. En este sentido, un anticuerpo de la presente invención de preferencia tiene una afinidad por un epítipo conformacional de la P-selectina representado por una $K_d \leq 1000\text{nM}$ o $\leq 500\text{nM}$ o $\leq 100\text{nM}$ o $\leq 50\text{nM}$ o más de preferencia por una $K_d \leq 25\text{nM}$ y todavía más de preferencia por una $K_d \leq 10\text{nM}$ y aún más de preferencia por una $K_d \leq 5\text{nM}$ o $\leq 1\text{nM}$ o $\leq 0,1\text{nM}$.

[0078] Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo "homólogo", tal como se usa en este contexto, significa que una secuencia relevante de aminoácidos (de preferencia por ejemplo en las CDRs y/o los dominios variables VH y/o VL) de una proteína o un péptido es por lo menos 50% idéntica, por lo menos 60% idéntica, por lo menos 70% idéntica, por lo menos 75% idéntica, por lo menos 80% idéntica, por lo menos 85% idéntica, por lo menos 90% idéntica, por lo menos 91% idéntica, por lo menos 92% idéntica, por lo menos 93% idéntica, por lo menos 94% idéntica, por lo menos 95% idéntica, por lo menos 96% idéntica, por lo menos 97% idéntica, por lo menos 98% idéntica, por lo menos 99% idéntica, por lo menos 99,5% idéntica o 100% idéntica a una secuencia dada. Por ejemplo, esas secuencias pueden ser variantes derivadas de varias especies o la secuencia homóloga puede producirse de forma recombinante. La secuencia puede derivarse de la secuencia dada por truncamiento, delección, sustitución o adición de aminoácidos. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina por algoritmos estándar de alineación como, por ejemplo, Basic Local Alignment Tool (BLAST) y otros algoritmos de alineación y métodos de la técnica (81-84).

[0079] La preparación de anticuerpos monoclonales es convencional y bien conocida de la persona medianamente versada en el estado de la técnica. Los anticuerpos

monoclonales pueden aislarse y purificarse de cultivos de hibridoma por una variedad de técnicas bien establecidas. Esas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con Proteína-A Sepharose, cromatografía de exclusión de tamaño y cromatografía de intercambio iónico. En una alternativa a la preparación de hibridomas que segregan anticuerpos monoclonales, un anticuerpo monoclonal anti-P-selectina puede ser identificado y aislado mediante tamizaje de una biblioteca de inmunoglobulinas combinatorias recombinantes (p.ej., una biblioteca de exhibición de fagos de anticuerpo) con los epítopes conformacionales aquí descritos respectivamente para aislar así los miembros de la biblioteca de inmunoglobulinas que se unen a la P-selectina de conformidad con la presente invención. Kits para generación y tamizaje bibliotecas de exhibición de fagos están disponibles comercialmente (p.ej., el Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catalog No. 27-9400-01; y el Stratagene SurJZAP™. Phage Display Kit, Catalog No. 240612).

[0080] Los métodos de manipulación de anticuerpos monoclonales *in vitro* e *in vivo* son bien conocidos de la persona medianamente versada en el estado de la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de conformidad con la presente invención pueden ser hechos por el método de hibridoma descrito por Kohler y Milstein (85) o pueden ser hechos por métodos recombinantes, p.ej., como los descritos en la patente estadounidense No. 4.816.567, por ejemplo.

[0081] Otro método involucra humanizar un anticuerpo monoclonal por medios recombinantes para generar anticuerpos que contienen, por ejemplo, secuencias específicas y reconocibles de humanos o primates.

[0082] Se revelan métodos para hacer anticuerpos de los conceptos inventivos que aquí se revelan, los cuales se unen con alta afinidad a la P-selectina humana o a los epítopes conformacionales de los mismos como está aquí descrito que pueden comprender transfectar una célula con un constructo de ADN, el cual constructo comprende una secuencia de ADN que codifica por lo menos una porción de los anticuerpos específicos neutralizadores de la P-selectina de la invención, cultivar la célula en condiciones tales que la proteína del anticuerpo es expresado por la célula y aislar la proteína del anticuerpo.

[0083] De preferencia, la región constante ha sido modificada para que module (es decir reduzca o intensifique) la función efectora como se anotó en otra parte en comparación con la función efectora de una región Fc de cadena pesada de una inmunoglobulina de tipo silvestre. En varias modalidades, la región constante de la IgG tiene reducida su función efectora o como alternativa tiene aumentada su función efectora. La función efectora del Fc incluye, por ejemplo, citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento y función de vida medios o tasa de depuración. La secuencia de aminoácidos del dominio Fc de la IgG puede ser alterada para afectar la unión a receptores gamma de Fc (y por ende las funciones de ADCC o fagocitosis) o para alterar la interacción con el sistema del complemento (función de citotoxicidad dependiente del complemento).

23

[0084] En una modalidad, el anticuerpo comprende una región constante o porción Fc que tiene poca o ninguna afinidad por al menos un receptor Fc. En una modalidad alternativa, el segundo polipéptido tiene poca o ninguna afinidad por la proteína del complemento C1q. En general, una función efectora de un anticuerpo puede ser alterada alterando la afinidad del anticuerpo por una molécula efectora como un receptor Fc. La afinidad de unión por lo general será variada modificando el sitio de unión de la molécula efectora. La revelación de modificaciones de la IgG que alteran la interacción con moléculas efectoras como receptores Fc puede encontrarse por ejemplo en las patentes estadounidenses Nos. 5.624.821 y 5.648.260,

[0085] Las proteínas de los anticuerpos de los conceptos inventivos que aquí se revelan puede ser producidas usando técnicas bien conocidas del estado de la técnica. Por ejemplo, las proteínas de anticuerpos pueden ser producidas por técnicas recombinantes en las células (79, 86).

[0086] Para la producción recombinante, una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína del anticuerpo se inserta dentro de un vehículo de expresión adecuado, como un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada. El vehículo de expresión entonces se transfecta dentro de una célula diana adecuada que expresará el péptido. Las técnicas de transfección conocidas en la técnica incluyen, pero sin limitaciones, precipitación con fosfato de calcio (87) y electroporación (88). Una variedad de sistemas vectores de expresión del huésped se pueden usar para expresar las proteínas de anticuerpos aquí descritas incluidas de preferencia células eucarióticas.

[0087] Los conceptos inventivos que aquí se revelan además proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos revelados o de otra suerte aquí habilitados. Los ácidos nucleicos pueden comprender ADN o ARN y pueden ser total o parcialmente sintéticos o recombinantes. La referencia a una secuencia de nucleótidos como la estipulada aquí abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada y comprende una molécula de ARN con la secuencia especificada en la cual el U es sustituido por T, a menos que el contexto dicte otra cosa.

[0088] En otra modalidad, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de los conceptos inventivos que aquí se revelan también comprenden secuencias de nucleótidos que son, por ejemplo, por lo menos 50% idénticas a las secuencias aquí reveladas. También se contemplan modalidades en las cuales una secuencia es por lo menos 60% idéntica, por lo menos 70% idéntica, por lo menos 75% idéntica, por lo menos 80% idéntica, por lo menos 85% idéntica, por lo menos 90% idéntica, por lo menos 91% idéntica, por lo menos 92% idéntica, por lo menos 93% idéntica, por lo menos 94% idéntica, por lo menos 95% idéntica, por lo menos 96% idéntica, por lo menos 97% idéntica, por lo menos 98% idéntica, por lo menos 99% idéntica o por lo menos 99.5% idéntica, a una secuencia aquí revelada y/o las cuales se hibridizan a una secuencia de los conceptos inventivos que aquí se revelan en condiciones de rigor alto o moderado. El porcentaje de identidad puede ser determinado por inspección visual y cálculo matemático.

24

[0089] El rigor, incluido "alto rigor", tal como se usa en este contexto, incluye condiciones fáciles de determinar por la persona medianamente versada en la técnica con base en, por ejemplo, la longitud del ADN. Por lo general, esas condiciones se definen como condiciones de hibridización de 50% de formamida, 6xSSC a 42°C (u otra solución similar de hibridización, como, p.ej., solución de Stark, en 50% de formamida a 42°C) y con lavado a aproximadamente 68°C con 0,2xSSC, 0,1% SDS. La persona medianamente versada en la técnica reconocerá que la temperatura y la concentración de sal de la solución de lavado se pueden ajustar según necesidad de acuerdo con factores como la longitud de la sonda.

[0090] "Rigor moderado", tal como se usa en este contexto, incluye condiciones que pueden ser fáciles de determinar por la persona medianamente versada en la técnica con base en, por ejemplo, la longitud del ADN. Las condiciones básicas son estipuladas por Sambrook et al. (79) e incluyen el uso de una solución de prelavado para los filtros de nitrocelulosa 5xSSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0), condiciones de hibridización de 50% de formamida, 6xSSC a 42°C (u otra solución similar de hibridización, como solución de Stark, en 50% de formamida a 42°C) y condiciones de lavado a 60°C, 0,5xSSC, 0,1% SDS.

[0091] Los anticuerpos monoclonales aquí revelados incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los cuales una porción de la cadena pesada y/o la cadena ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, en tanto que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de esos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (Patente estadounidense No. 4.816.567).

[0092] Los métodos para hacer fragmentos de anticuerpo son también conocidos en la técnica (89) (se incorporan a la presente mediante referencia). Los fragmentos de anticuerpo de la presente invención se pueden preparar por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en *E. coli* de ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpo, como se anotó arriba, se pueden obtener por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden producir por separación enzimática de anticuerpos con pepsina para dar un fragmento 5S denotado F(ab')₂. Este fragmento se puede dividir todavía más usando un agente reductor de tioles y opcionalmente un grupo bloqueador para los grupos sulfhidrilo resultantes de la separación de los enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes 3.5S Fab'. Como alternativa, una separación enzimática que usa pepsina produce dos fragmentos monovalentes Fab' y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense No. 4.036.945 y la patente estadounidense No. 4.331.647 y las referencias en ellas contenidas, las cuales se incorporan a la presente en su integridad mediante referencia.

[0093] Otros métodos para dividir anticuerpos, como la separación de cadenas pesadas para dar fragmentos monovalentes de cadena ligera-pesada, separación adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas también se pueden usar,

siempre y cuando los fragmentos se unan al epítipo conformacional que es reconocido por el anticuerpo intacto. Por ejemplo, los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas VH y VL. Esta asociación puede ser no covalente o las cadenas variables pueden ser ligadas por un enlace disulfuro intermolecular o ligadas por químicos como glutaraldehído. De preferencia, los fragmentos Fv comprenden cadenas VH y VL conectadas por un eslabón peptídico. Esta unión de cadena única a las proteínas del antígeno (sFv) se prepara construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta dentro de un vector de expresión, el cual a continuación se introduce dentro de una célula huésped como *E. coli*. Las células huéspedes recombinantes sintetizan a una única cadena polipeptídica con un péptido eslabón que hace puente entre los dos dominios V. Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única CDR. Los péptidos CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") a menudo están involucrados en el reconocimiento y la unión al antígeno. Los péptidos CDR se pueden obtener por clonación o construcción de genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Esos genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de polimerasa para sintetizar la región variable del ARN de células productoras de anticuerpos.

[0094] Los conceptos inventivos que aquí se revelan comprenden anticuerpos obtenidos por ingeniería que incluyen formas plenamente humanas y humanizadas de anticuerpos no humanos (p.ej., de primates o murinos). Esos anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión al antígeno) que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las cuales los residuos de CDRs del anticuerpo aceptor humano son reemplazados por residuos de las CDRs del anticuerpo donante de una especie no humana como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. Un ejemplo de un anticuerpo humanizado de los conceptos inventivos que aquí se revelan es un anticuerpo humanizado que comprende las CDRs del anticuerpo G4 y que comprende secuencias marco humanas que son homólogas con las secuencias marco del anticuerpo G4.

[0095] Para hacer un anticuerpo por ingeniería, una secuencia de ADN que codifica una molécula de anticuerpo de los conceptos inventivos que aquí se revelan se prepara sintéticamente por métodos estándar establecidos. Por ejemplo, de acuerdo con el método de la fosfoamidina, se sintetizan oligonucleótidos p.ej. en un sintetizador automático de ADN purificados, temperados, ligados y clonados en vectores adecuados.

[0096] La secuencia de ADN se puede insertar entonces dentro de un vector de expresión recombinante, que puede ser cualquier vector, el cual puede de modo conveniente ser sometido a procedimientos de ADN recombinante. La elección del vector a menudo dependerá de la célula huésped dentro de la cual se va a introducir. Así pues, el vector puede ser un vector que se replica de forma autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación

76

cromosómica, p.ej., un plásmido. Como alternativa, el vector pueden ser del tipo que, cuando se introduce dentro de una célula huésped, se integra dentro del genoma de la célula huésped y se replica junto con el o los cromosoma al cual ha sido integrado.

[0097] En el vector, la secuencia de ADN que codifica la proteína debe estar operativamente conectado a una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN, que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede derivarse de genes que codifican proteínas bien sea homólogas o heterólogas con la célula huésped. Algunos ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia codificadora de ADN en células de mamífero incluyen, pero sin limitaciones, el promotor LTR, promotor SV 40, el promotor MT-1 (gen de metalotioneína) o el promotor mayor tardío de adenovirus 2. Un promotor adecuado para usar en células de insecto es el promotor de polihedrina. Los promotores adecuados para usar en células huésped de levadura incluyen promotores de genes glucolíticos de levadura o genes de alcohol deshidrogenasa o los promotores TPI1 o ADH2-4c. Los promotores adecuados para usar en células huésped de hongos filamentosos son, por ejemplo, el promotor ADH3 o el promotor tpiA.

[0098] La secuencia de ADN de codificación también puede estar conectada operativamente a un terminador adecuado, como terminador de la hormona de crecimiento humana o (para los huéspedes micóticos) los promotores TPI1 o ADH3. El vector además puede comprender elementos como señales de poliadenilación (p.ej. de SV 40 o región título de adenovirus 5 Elb), secuencias intensificadoras de transcripción (p.ej. el intensificador SV 40) y secuencias intensificadoras de traducción (p.ej., las que codifican ARNs de adenovirus VA).

[0099] El vector de expresión recombinante además puede comprender una secuencia de ADN que permite que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Un ejemplo de esa secuencia (cuando la célula huésped es una célula de mamífero) es el origen SV 40 de replicación. El vector también puede comprender un marcador seleccionable, p.ej. un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped, como el gen que codifica la reductasa de dihidrofolato (DHFR) o uno que confiera resistencia a un medicamento, p.ej. neomicina, hidromicina o metotrexate.

[0100] Los procedimientos que se usan para ligar las secuencias de ADN que codifican las proteínas, el promotor y el terminador, respectivamente y para insertarlos dentro de vectores adecuados que contienen la información necesaria para replicación, son bien conocidas de las personas medianamente versadas en el estado de la técnica.

[0101] Para obtener las proteínas recombinantes de los conceptos inventivos que aquí se revelan las secuencias codificadoras de ADN se pueden fusionar con una segunda secuencia de codificación de péptido y una secuencia de codificación de sitio de separación de proteasa, dañar un constructo de ADN que codifica la proteína de fusión, que se caracteriza porque la secuencia de codificación de sitio de separación de proteasa está situada entre el fragmento HBP y el segundo ADN que codifica péptido, insertada dentro de un vector de expresión recombinante y expresada en células huéspedes recombinantes. En

una modalidad, el mencionado segundo péptido se selecciona, pero sin limitaciones, de entre el grupo que comprende glutatión-S-reductasa, timosina de ternera, tioredoxina bacteriana o variantes naturales o sintéticas de la ubiquitina humana o péptidos de los mismos. En otra modalidad, una secuencia peptídica que comprende un sitio de separación de proteasa puede ser el factor Xa, con la secuencia de aminoácidos IEGR, enterocinasa, con la secuencia de aminoácidos DDDDK, trombina, con la secuencia de aminoácidos LVPR/GS o *Acharombacter lyticus*, con la secuencia de aminoácidos XKX, sitio de separación.

[0102] La célula huésped dentro de la cual se introduce el vector de expresión puede ser cualquier célula capaz de expresión de los péptidos o proteínas de longitud plena y es de preferencia una célula eucariótica, como células de invertebrados (insectos) o células de vertebrados, p.ej. oocitos de *Xenopus laevis* o células de mamífero, en particular células de insecto y de mamífero. Algunos ejemplos de líneas celulares adecuadas de mamífero incluyen, pero sin limitaciones, las líneas celulares HEK293 (ATCC CRL-1573), COS (ATCC CRL-1650), BHK (ATCC CRL-1632, ATCC CCL-10) o CHO (ATCC CCL-61). Los métodos para transfectar las células de mamífero y que expresen secuencias de ADN introducidas en las células son bien conocidos del estado de la técnica.

[0103] Como alternativa, células de hongos (incluidas las células de levadura) se pueden usar como células huésped. Algunos ejemplos de células de levadura adecuadas incluyen células de *Saccharomyces* spp. o *Schizosaccharomyces* spp., en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Algunos ejemplos de otras células de hongos son células de hongos filamentosos como, p.ej. *Aspergillus* spp. o *Neurospora* spp., en particular cepas de *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*. El uso de *Aspergillus* spp. para la expresión de proteínas se describe en, p.ej., EP 238 023.

[0104] El medio que se usa para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para cultivar células de mamífero, como un medio que contiene suero o un medio libre de suero que contiene suplementos adecuados o un medio adecuado para cultivar células de insectos, levaduras o de hongos o cualquier célula que se use para expresar las proteínas. Los medios adecuados están disponibles con proveedores comerciales o pueden prepararse de acuerdo con recetas publicadas.

[0105] Las proteínas producidas por técnicas recombinantes por las células se pueden entonces recuperar del medio de cultivo por procedimientos convencional que incluyen separar las células huésped del medio por centrifugación o filtración, precipitar los componentes proteináceos del sobrenadante o filtrado por medio de una sal, p.ej., sulfato de amonio, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos como, p.ej. HPLC, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o similares.

[0106] Una vez que los anticuerpos se han obtenido, por ejemplo, una vez que las células B individuales han sido identificadas y/o los anticuerpos monoclonales han sido producidos, se pueden obtener las secuencias que codifican las regiones variables de estos anticuerpos. Por ejemplo, las secuencias de la región variable se pueden obtener secuenciando primero la proteína del anticuerpo producido por el hibridoma, célula B o fago

186

y determinar la secuencia que codifica el ácido nucleico. En una modalidad, la región variable del ADN o ADNc de la inmunoglobulina (VH y VL) se puede secuenciar en su lugar. Cuando el anticuerpo es derivado de una línea celular de hibridoma o célula B aislada, los ADNc que codifican las regiones variables pueden ser amplificados usando PCR por ejemplo siguiendo los métodos descritos en Babcook et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:7843-7848 (1996)) y en la Publicación PCT No. WO 92/02551. El contenido de las dos referencias se incorporan expresamente a la presente mediante referencia en su integridad.

[0107] Un anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo compuesto por componentes de por lo menos dos fuentes diferentes. En ciertas modalidades, un anticuerpo quimérico comprende una porción de un anticuerpo derivada de una primera especie fusionada a otra molécula, p.ej., una porción de un anticuerpo derivada de una segunda especie. En ciertas modalidades, un anticuerpo quimérico comprende una porción de un anticuerpo derivada de un animal no humano fusionada a una porción de un anticuerpo derivada del humano. En ciertas modalidades, un anticuerpo quimérico comprende toda o una porción de una región variable de un anticuerpo derivada de un animal y fusionada a una porción de un anticuerpo de un segundo animal. Por ejemplo pero no a manera de limitación, un anticuerpo quimérico puede comprender toda o una porción de una región variable de un anticuerpo derivada de un animal no humano fusionada a una región constante de un anticuerpo derivada de un humano.

[0108] La utilización de los anticuerpos monoclonales de los conceptos inventivos que aquí se revelan puede requerir la administración de los mismos a un sujeto, como pero sin limitaciones, un ser humano. Sin embargo, cuando los anticuerpos monoclonales se producen en un animal no humano, como un roedor, la administración de esos anticuerpos contra un paciente humano normalmente desencadenará una respuesta inmunitaria, que se caracteriza porque la respuesta inmunitaria está dirigida hacia la secuencia de los anticuerpos. Esas reacciones limitan la duración y efectividad de dicha terapia. Con el fin de soslayar ese problema, los anticuerpos monoclonales de los conceptos inventivos que aquí se revelan son "humanizados", es decir, los anticuerpos son modificados por ingeniería de tal manera que una o más porciones antigénicas de los mismos se eliminan y las porciones similares de un anticuerpo humano son sustituidas a continuación, en tanto que la afinidad de los anticuerpos por el epítope deseado se conserva. Esta modificación por ingeniería puede solo involucrar unos pocos aminoácidos o puede incluir regiones marco completas del anticuerpo, dejando solo las regiones determinadoras de complementariedad del anticuerpo intactas. Varios métodos de humanización de anticuerpos son conocidos de la técnica y se revelan en las patentes estadounidenses Nos. 6.180,370, a Queen et al., el 30 de enero de 2001; 6.054.927, a Brickell el 25 de abril de 2000; 5.869.619, a Studnicka el 9 de febrero de 1999; 5.861.155, a Lin el 19 de enero de 1999; 5.712.120, a Rodriguez et al., el 27 de enero de 1998; y 4.816.567, a Cabilly et al., el 28 de marzo de 1989, todas cuyas especificaciones se incorporan expresamente a la presente mediante referencia en su integridad.

[0109] Como se mencionó arriba, un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo no humano que ha sido modificado de manera que se parece más (en su

29

secuencia de aminoácidos) a un anticuerpo humano. Como se describió arriba, los anticuerpos interactúan con antígenos diana de predominio a través de residuos de aminoácidos que están situados en las regiones determinadoras de complementariedad de la cadena pesada y la cadena ligera (CDRs). Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDRs pueden ser más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDRs. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que simulan las propiedades de anticuerpos naturales específicos construyendo vectores de expresión en los cuales las secuencias CDR del anticuerpo natural se injertan dentro de secuencias marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades, como regiones marco de anticuerpo humano. Esas secuencias marco se pueden obtener de bases de datos públicas de ADN o referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de línea germinal para los genes de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras humanas se pueden encontrar en la base de datos "VBase" de secuencias de línea germinal humana (disponible en internet a mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; y Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; el contenido de cada una de las cuales se incorpora expresamente a la presente mediante referencia.

[0110] Las formas humanizadas de anticuerpos son inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de los mismos (como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión al antígeno) que están compuestas principalmente por la secuencia de una inmunoglobulina humana y contienen mínimas secuencias derivadas de una inmunoglobulina no humana. La humanización puede se puede realizar siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., 1986; Riechmann et al., 1988; Verhoeven et al., 1988), sustituyendo secuencias CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. (Ver también la patente estadounidense No. 5.225.539). En algunos casos, los residuos F_v del marco de la inmunoglobulina humana son reemplazados por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las CDR o secuencias marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos uno y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana (Jones et al., 1986;

30

Riechmann et al., 1988; y Presta, 1992).

[0111] Los conceptos inventivos que aquí se revelan además incluyen el uso de anticuerpos monoclonales plenamente humanos. Los anticuerpos plenamente humanos en esencia se relacionan con moléculas de anticuerpos en las cuales toda la secuencia tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, incluidas las CDRs, surgen de genes humanos. Esos anticuerpos se denominan aquí "anticuerpos humanos" o "anticuerpos plenamente humanos". Los "anticuerpos humanos" contienen secuencias de anticuerpos humanos y no contienen secuencias de anticuerpos de un animal no humano. En ciertas modalidades, un anticuerpo humano puede contener además secuencias sintéticas que no se encuentran en anticuerpos nativos. El término no está limitado por la forma como se hacen los anticuerpos.

[0112] Los anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse por la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de célula B humana (Ver Kozbor et al., Hibridoma, 2:7 (1983)) y la técnica del hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Ver Cole et al., PNAS, 82:859 (1985)). Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden utilizar en la práctica de los conceptos inventivos que aquí se revelan y reivindican y se pueden producir usando hibridomas humanos (Ver Cote et al. PNAS, 80:2026 (1983)) o transformando células B humanas con virus de Epstein Barr *in vitro* (Ver Cole et al., 1985).

[0113] Además, los anticuerpos humanos se pueden hacer introduciendo loci de inmunoglobulina humana dentro de animales transgénicos, p.ej., ratones en los cuales los genes de la inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Tras la estimulación se observa la producción de anticuerpos humanos, los cuales se parecen mucho a los observados en los seres humanos en todo respecto, incluida la reordenamiento de los genes, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este abordaje se describe, por ejemplo pero no a manera de limitación, en las patentes estadounidenses Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016 y en Marks et al., J Biol. Chem., 267:16007 (1992); Lonberg et al., Nature, 368:856 (1994); Morrison, 1994; Fishwild et al., Nature Biotechnol., 14:845 (1996); Neuberger, Nat. Biotechnol., 14:826 (1996); y Lonberg y Huszar, Int Rev Immunol., 13:65 (1995).

[0114] Los anticuerpos humanos además se pueden producir usando animales no humanos transgénicos que se modifican para producir anticuerpos plenamente humanos en lugar de los anticuerpos endógenos del animal en respuesta a la estimulación por un antígeno. (Ver Publicación PCT No. WO 94/02602). Los genes endógenos que codifican las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina en el huésped no humano han sido incapacitados y los loci activos que codifican las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas humanas se insertan dentro del genoma del huésped. Los genes humanos se incorporan, por ejemplo, usando cromosomas de levadura artificial que contienen los segmentos requeridos de ADN humano. Entonces se obtiene un animal que proporciona todas las modificaciones deseadas como progenie por el cruce de animales transgénicos intermedios que contienen menos que el complemento completo de las modificaciones. Una modalidad de un animal no humano de este tipo es un ratón y se denomina el XENOMOUSE™ como se revela en las Publicaciones del PCT Nos. WO 96/33735 y

31
WO 96/34096. Este animal produce células B que segregan inmunoglobulinas plenamente humanas. Los anticuerpos se pueden obtener directamente del animal después de inmunización con un inmunógeno de interés como, por ejemplo, una preparación de anticuerpos policlonales o como alternativa de células B inmortalizadas derivadas del animal, como hibridomas que producen anticuerpos monoclonales. Además, los genes que codifican las inmunoglobulinas con regiones variables humanas se pueden recuperar y expresar para obtener los anticuerpos directamente o se pueden modificar todavía más para obtener análogos de anticuerpos como, por ejemplo, moléculas Fv de cadena única.

[0115] Un ejemplo de un método para producir un huésped no humano, ejemplificado como un ratón, que carece de expresión de una cadena pesada de inmunoglobulina endógena se revela en la Patente estadounidense No. 5.939.598, una Kucherlapati et al., el 17 de agosto de 1999, la cual se incorpora a la presente mediante referencia. Se pueden obtener por un método que incluye borrar los genes del segmento J de por lo menos un locus endógeno de la cadena pesada en una célula madre embrionaria para evitar el reordenamiento del locus y prevenir la formación de un transcripto de un locus reordenado de la cadena de inmunoglobulina pesada, la cual delección se efectúa eligiendo como diana un vector que contiene un gen que codifica un marcador seleccionable; y produciendo de la célula madre embrionaria un ratón transgénico cuyas células somáticas y germinales contienen el gen que codifica el marcador seleccionable.

[0116] Un método para producir un anticuerpo de interés, como un anticuerpo humano, se revela en la Patente estadounidense No. 5.916.771, a Hori et al., el 29 de junio de 1999, la cual se incorpora a la presente mediante referencia. Incluye introducir un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada dentro de una célula huésped de mamífero en cultivo, introducir un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera dentro de otra célula huésped de mamífero y fusionar las dos células para formar una célula híbrida. La célula híbrida expresa un anticuerpo que contiene la cadena pesada y la cadena ligera.

[0117] El término "anticuerpo neutralizador" o "anticuerpo que neutraliza" se refiere a un anticuerpo que reduce por lo menos una actividad de un polipéptido que comprende el epítipo al cual se une específicamente el anticuerpo. En ciertas modalidades, un anticuerpo neutralizador reduce una actividad *in vitro* y/o *in vivo*. El término "sitio de unión al antígeno" se refiere a una porción de un anticuerpo capaz de unirse específicamente a un antígeno. En ciertas modalidades, un sitio de unión al antígeno está proporcionado por una o más regiones variables de anticuerpo.

[0118] Los anticuerpos de la presente invención de preferencia incluyen una o más modificaciones que inactivan el complemento. El término "actividad del complemento" abarca ampliamente las actividades bioquímicas y fisiológicas asociadas con la activación del sistema del complemento, moléculas individuales asociadas con la vía del complemento, así como los genes que codifican estas moléculas. Por consiguiente, las actividades del complemento incluyen, p.ej., estructura y expresión de un gen que codifica una molécula de la vía del complemento, actividad bioquímica (p.ej., enzimática o reguladora) de una

molécula de la vía del complemento, actividades celulares que inician o resultan de la activación del sistema del complemento y presencia de autoanticuerpos séricos contra moléculas de la vía del complemento. En el anticuerpo hSel001 la modificación preferida para inactivar el complemento es un reemplazo de un residuo de lisina con alanina en la posición 342 en la región constante de la cadena pesada CH2. Otras sustituciones en la misma posición pueden incluir por ejemplo cualquiera de gly, leu, trp, tyr, pro, thr, ser, met, asp, asn, glu, gln, phe, ile, val, thr y cys con la condición de que la sustitución también tenga el efecto de eliminar la capacidad de la región constante de activar el complemento.

[0119] Los términos "moléculas asociadas a la vía del complemento", "moléculas de la vía del complemento" y "proteínas asociadas a la vía del complemento" se usan de forma intercambiable y se refieren a las varias moléculas que desempeñan un papel en activación del complemento y las actividades celulares corriente abajo mediadas por, que responden a o que son desencadenadas por el sistema del complemento activado. Incluyen iniciadores de la vía del complemento (es decir, moléculas que directa o indirectamente desencadenan la activación del sistema del complemento), moléculas que se producen o desempeñan un papel durante la activación del complemento (p.ej., proteínas/enzimas del complemento como C3, C5, C5b-9, Factor B, MASP-1 y MASP-2), receptores o inhibidores del complemento (p.ej., clusterina, vitronectina, CR1 o CD59) y moléculas reguladas o desencadenadas por el sistema del complemento activado (p.ej., factor inhibitorio del complejo de ataque de membrana, MACIF). Así pues, además de las proteínas del complemento que se anotaron arriba, las moléculas asociadas a la vía del complemento también incluyen, p.ej., reguladores de la convertasa C3/C5 (RCA) como receptor del complemento tipo 1 (también denominado CR1 o CD35), receptor del complemento tipo 2 (también denominado CR2 o CD21), proteína de cofactor de membrana (MCP o CD46) y C4bBP; reguladores MAC como vitronectina, clusterina (también denominados "SP40,40"), CRP, CD59 y factor homólogo de restricción (HRF); cadenas de inmunoglobulina como Ig kappa, Ig lambda o Ig gamma; inhibidor C1; y otras proteínas como CR3, CR4 (CD11b/18) y DAF (CD55).

[0120] Anticuerpos de doble función anti-P selectina

[0121] Los conceptos inventivos que aquí se revelan están dirigidos a anticuerpos de "doble función" y fragmentos de los mismos los cuales se unen específicamente a la P-selectina y no solo bloquean la unión de PSGL-1 a P-selectina, sino que también disocian complejos preformados P-selectina/PSGL-1. La presente revelación describe un dominio de unión de anticuerpo previamente desconocido (un epítopo conformacional) dentro del dominio de la lectina (p.ej., dominio de reconocimiento de carbohidratos, CRD) de la P-selectina al cual se unen los anticuerpos de doble función (los cuales pueden ser anticuerpos quiméricos, humanos o humanizados o fragmentos de los mismos por ejemplo). Los conceptos inventivos que aquí se revelan también van dirigidos a anticuerpos anti-P selectina los cuales se unen al epítopo conformacional aquí descrito y los cuales tienen una doble función de (1) bloqueo de la unión de PSGL-1 a P-selectina y (2) disociación de complejos preformados P-selectina/PSGL-1. Los conceptos inventivos que aquí se revelan

37

en particular están dirigidos al uso de tales anticuerpos de doble función anti-P selectina o fragmentos de los mismos en el tratamiento de patologías o trastornos inflamatorios, trombóticos u otros en primates (incluidos los seres humanos), los cuales involucran la adhesión de plaquetas, eritrocitos falciformes, leucocitos, linfocitos y/o células endoteliales, que se caracterizan porque la patología o trastorno comprende o está asociada con (pero sin limitaciones) por lo menos uno de entre crisis de dolor vasooclusivo por células falciformes, enfermedad intestinal inflamatoria (p.ej., enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y enteritis), artritis (p.ej., artritis reumatoide, osteoartritis y artritis psoriásica), rechazo de injerto, enfermedad injerto contra huésped, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, psoriasis, dermatitis, sepsis, nefritis, lupus eritematoso, escleroderma, rinitis, anafilaxia, diabetes, esclerosis múltiple, aterosclerosis, trombosis, metástasis tumorales, reacciones alérgicas, tiroiditis, lesión isquémica por reperfusión (p.ej., debida a infarto de miocardio, ACV o trasplante de órganos) y patologías asociadas con traumatismos extensos o inflamación crónica, como por ejemplo, hipersensibilidad retardada de tipo IV, asociada por ejemplo con infección por bacilos tuberculosos o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o falla multisistémica.

[0122] Es importante anotar que el uso de tales anticuerpos de doble función para el tratamiento estas enfermedades inflamatorias permitirá no solo la prevención, reducción o inhibición de la inflamación, sino que también ofrecerá un mecanismo para tratar procesos continuados de enfermedad inflamatoria en lo que los anticuerpos pueden disociar complejos preformados de P-selectina/PSGL-1. Por ejemplo, en el caso de las crisis de dolor vasooclusivo por células falciformes, el anticuerpo de doble función es capaz de no solo prevenir futuros eventos vasooclusivos, sino que también se puede usar en el tratamiento de la vasooclusión continuada. Los conceptos inventivos que aquí se revelan también van dirigidos a ensayos de tamizaje para la detección de anticuerpos anti-P selectina los cuales se unen al epítipo conformacional de P-selectina nuevo aquí descrito y los cuales no solo bloquean la unión de PSGL-1 a P-selectina sino que también causan la reversión de la unión de PSGL-1 a P-selectina (es decir, la disociación del complejo prefórmado).

[0123] Como ya se anotó, los conceptos inventivos que aquí se revelan están dirigidos a anticuerpos purificados (incluidos, pero sin limitaciones, anticuerpos quiméricos, humanos o humanizados y fragmentos de los mismos), los cuales reconocen (es decir, se unen a) la P-selectina (SEQ ID NO:1) y los cuales bloquean la unión de la P-selectina a PSGL-1 (o receptores similares aPSGL-1) y que además causan la disociación de adhesiones o complejos celulares preformados que fueron mediados a través de interacciones PSGL-1/P-selectina y métodos terapéuticos de uso de tales anticuerpos (o fragmentos de unión de los mismos)

[0124] De manera más particular, los conceptos inventivos que aquí se revelan están dirigidos a anticuerpos purificados (o fragmentos de los mismos), contra P-selectina, células huésped que producen tales anticuerpos anti-P selectina (o fragmentos de los mismos), ensayos de tamizaje para identificar anticuerpos anti-P selectina (o fragmentos de los mismos) los cuales bloquean la adhesión mediada por la P-selectina de los leucocitos,

eritrocitos falciformes, linfocitos, plaquetas y células endoteliales y además, causan la disociación de adhesiones o complejos celulares preformados que estuvieron mediadas a través de interacciones PSGL-1/P-selectina y métodos terapéuticos que usan tales anticuerpos (o fragmentos de unión de los mismos). Los conceptos inventivos que aquí se revelan incluyen novedosos anticuerpos contra P-selectina de primates (incluidos los humanos) y fragmentos de unión de la misma, y en particular incluyen, pero sin limitaciones, G4, formas humanizadas de G4 y anticuerpos hSel001. Los anticuerpos preferidos de la revelación son capaces de unirse específicamente a la P-selectina de primates (en particular de humanos) e inhibir una o más actividades de la P-selectina *in vitro* y/o *in vivo*. Cuando se usa aquí, el término "PSGL-1" también tiene por objeto incluir "receptor similar a PSGL-1" en los eritrocitos falciformes (eritrocitos).

[0125] En general, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de los conceptos inventivos que aquí se revelan puede tener cualquier límite superior de tamaño siempre y cuando tenga propiedades similares o inmunológicas con respecto al anticuerpo que se une con especificidad al sitio de unión a la P-selectina aquí descrito y que bloquea la unión de PSGL-1 a P-selectina y disocia complejos preformados P-selectina/PSGL-1. Cuando se usa aquí, el término "inclusive" tiene por objeto referirse a todos los enteros entre dos números cualesquiera de los aquí enumerados.

[0126] Como se anotó en otra parte de este documento, los fragmentos de anticuerpo de los conceptos inventivos que aquí se revelan conservan la capacidad de unirse selectivamente a toda o una porción del epítipo de unión de la P-selectina aquí descrito. De preferencia, un anticuerpo o fragmento de unión de un anticuerpo de la presente invención es capaz de unirse a un epítipo que comprende uno o más residuos de los aminoácidos 1-35 o, más en particular, 4-23, de la secuencia estipulada en SEQ ID NO:1.

[0127] Como se anotó arriba, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de los conceptos inventivos que aquí se revelan en modalidades preferidas comprenden inmunoglobulinas de los isotipos IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ o IgG₂/G₄ quimeras, de preferencia se une a la P-selectina con una alta afinidad (por ejemplo, que se caracteriza porque la K_d es ≤ 1000nM) y de preferencia comprende una región constante humana y de preferencia inhibe la unión de la P-selectina a PSGL-1 y más de preferencia también causa reversión de la unión de la P-selectina a PSGL-1 en un complejo preformado. Además, el anticuerpo anti-P-selectina o fragmento de unión del mismo de preferencia no activa el complemento por la vía clásica al interactuar con C1q y de preferencia no se une a los receptores Fc, colectivamente llamados anticuerpos de función efectora. Los conceptos inventivos que aquí se revelan en particular están dirigidos al uso tales anticuerpos de doble función anti-P selectina o fragmentos de anticuerpo tales como están descritos e identificados aquí en tratamientos de patologías o trastornos inflamatorios, trombóticos u otros en primates (incluidos los seres humanos) los cuales involucran la adhesión de plaquetas, eritrocitos falciformes, leucocitos, linfocitos y/o células endoteliales, que se caracteriza porque la patología o trastorno comprende o está asociada con (pero sin limitaciones) por lo menos uno de entre crisis de dolor vasooclusivo por células falciformes, enfermedad intestinal inflamatoria (p.ej.,

enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y enteritis), artritis (p.ej., artritis reumatoide, osteoartritis y artritis psoriásica), rechazo de injerto, enfermedad injerto contra huésped, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, psoriasis, dermatitis, sepsis, nefritis, lupus eritematoso, escleroderma, rinitis, anafilaxia, diabetes, esclerosis múltiple, aterosclerosis, trombosis, metástasis tumorales, reacciones alérgicas, tiroiditis, lesión isquémica por reperfusión (p.ej., debida a infarto de miocardio, ACV o trasplante de órganos) y patologías asociadas con traumatismos extensos o inflamación crónica, como por ejemplo, hipersensibilidad retardada de tipo IV, asociado por ejemplo con infección por bacilos tuberculosos o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o falla multisistémica.

[0128] Como se anotó en otra parte de este documento, la P-selectina desempeña un papel crucial en el reclutamiento de los leucocitos y linfocitos hacia los sitios de inflamación y trombosis al unirse a un ligando de superficie (PSGL-1) sobre estas células y en la unión de eritrocitos falciformes al endotelio que tienen las células endoteliales activadas. El PSGL-1 se expresa de forma constitutiva sobre los leucocitos, incluidos los neutrófilos y monocitos y sobre ciertas células endoteliales. Un receptor similar al PSGL-1 se expresa sobre los eritrocitos falciformes y permite que estas células se unan a la P-selectina sobre las células endoteliales activadas.

[0129] Sin querer quedar atados a la teoría, se piensa que el tratamiento de las crisis de dolor vasooclusivo por células falciformes, por ejemplo con el anticuerpo anti-P-selectina de la presente invención, tiene el efecto de inhibir una o más de las siguientes interacciones: (1) unión de PSGL-1 sobre leucocitos a P-selectina sobre endotelio activado; (2) unión de un ligando similar a PSGL-1 sobre eritrocitos falciformes a P-selectina sobre endotelio activado; (3) unión a P-selectina sobre la superficie de plaquetas activadas a PSGL-1 sobre células endoteliales; (4) unión de eritrocitos falciformes a leucocitos a través de una interacción ligando-receptor no caracterizada; (5) unión de P-selectina sobre plaquetas activadas al receptor similar a PSGL-1 sobre eritrocitos falciformes, y/o; (6) unión de P-selectina sobre la superficie de plaquetas activadas a PSGL-1 sobre leucocitos. Se piensa que el anticuerpo anti-P-selectina de doble función bloquea la iniciación y propagación de la vasooclusión a múltiples niveles de interacciones célula-célula en la microvasculatura. Además, como se anotó en otra parte de este documento, el anticuerpo anti-P-selectina de doble función disocia complejos P-selectina/PSGL-1 y por ello se puede usar terapéuticamente para intervenir en la vasooclusión continuada.

[0130] La P-selectina media interacciones de plaquetas activadas o células endoteliales con células sanguíneas que incluyen ciertos glóbulos rojos (es decir eritrocitos falciformes) y leucocitos que incluyen monocitos, neutrófilos, eosinófilos, células CD4⁺T, células CD8⁺T, células B y células asesinas naturales (NK). Como se anotó aquí, se sabe que la P-selectina está involucrada en varias respuestas celulares a la inflamación resultante de lesión, infección o ataques fisicoquímicos. La aterosclerosis, caracterizada por lesiones ateroscleróticas en las superficies internas de los vasos sanguíneos, es un ejemplo de una patología que involucra la unión de ciertos leucocitos a células endoteliales portadoras de P-selectina en el revestimiento interno de las paredes de los vasos sanguíneos.

36

[0131] Como se indicó arriba, las terapias dirigidas a bloquear la función de la P-selectina, por ejemplo, con el uso de anticuerpos contra P-selectina para prevenir la atadura y rodamiento de los leucocitos y la adherencia de los glóbulos rojos (es decir, los eritrocitos falciformes), podrían tener un profundo efecto sobre numerosos tipos de enfermedades inflamatorias y trombóticas. Dado su papel fundamental en la iniciación del rodamiento y atadura de los leucocitos al endotelio y las plaquetas, la P-selectina es una diana primaria para el desarrollo de agentes terapéuticos para tratar trastornos inflamatorios y trombóticos. Por ejemplo, la naturaleza transitoria de la fase aguda de la anemia de células falciformes acoplada con los efectos crónicos recurrentes del daño de los órganos y las complicaciones y morbilidad asociadas sugiere que una intervención terapéutica que muestre tanto el bloqueo inicial de la adhesión debida a la unión de la P-selectina y el PSGL-1 y la inducción de la disociación de la adhesión previa, en curso o preestablecida, tendría novedosa aplicación a esta y otras enfermedades inflamatorias y trombóticas. Los conceptos inventivos que aquí se revelan abarcan así un método de uso de un epítipo conformacional de unión a anticuerpo de P-selectina para tamizar e identificar anticuerpos de "doble función" contra la P-selectina que no solo bloquean la unión P-selectina-PSGL-1, sino que también causa la disociación del complejo preformado P-selectina/PSGL-1 (y por ende el complejo célula-célula) y el uso de tales anticuerpos para el tratamiento de enfermedades como, pero sin limitaciones, enfermedades inflamatorias y trombóticas.

[0132] Como se anotó arriba, se han descubierto novedosos epítopes conformacionales de unión de la P-selectina como queda aquí descrito. El descubrimiento de estos epítopes conformacionales de unión ha conducido además al descubrimiento de anticuerpos de doble función anti-P selectina (por ello, los anticuerpos se podrían denominar anticuerpos de "doble función") los cuales se unen con alta especificidad al epítipo conformacional y no solo bloquean la unión de la P-selectina y el PSGL-1, sino que también inducen la disociación de complejos preformados P-selectina/PSGL-1 (es decir, inducen la reversión de la unión P-selectina-PSGL-1) gracias a lo cual causan la disociación de complejos celulares como complejos leucocito/célula endotelial, leucocito/plaqueta, linfocito/célula endotelial, linfocito/plaqueta, eritrocito falciforme/célula endotelial o eritrocito falciforme/plaqueta.

[0133] Las regiones de unión para algunos anticuerpos contra P-selectina han sido previamente cartografiadas usando constructos de grandes dominios funcionales que abarcan lectina, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y regiones de repetición de consenso (CR) de la proteína nativa P-selectina en el ratón y los seres humanos (90, 70, 91-95). Estos resultados indican que las áreas primarias de unión para algunos anticuerpos de bloqueo de función contra P-selectina se encontraban en el dominio de unión de la lectina, una región que abarca los residuos de aminoácidos 1-120 de la proteína P-selectina nativa o en el dominio EGF que abarca los aminoácidos 121-154.

[0134] A continuación se dan algunos ejemplos. Sin embargo, los conceptos inventivos que aquí se revelan tienen que entenderse como no limitados a las aplicaciones de estos experimentos, resultados y procedimientos específicos de laboratorio. Antes bien,

32

los Ejemplos se dan simplemente como unas entre varias modalidades y su intención es ser ejemplares, no exhaustivos.

[0135] La presente revelación describe el descubrimiento de novedosos epítopes no lineales (p.ej., conformacionales) por el uso de quimeras ratón/humano que contienen los dominios de lectina, EGF, CR1 y CR2 de la P-selectina que fueron explorados con anticuerpos de bloqueo de función de prueba contra la P-selectina. Los trabajos previos han mostrado que, como mínimo, la expresión de los dominios de lectina y EGF se requiere para la plegadura conformación adecuadas de los constructos de P-selectina (91). Una comparación de las secuencias de aminoácidos de la P-selectina humana y la murina indicó que existe homología en el dominio de la lectina con un número específico de diferencias de residuos de aminoácido entre humano y ratón. Aquí, se usó la homología tridimensional (3-D) para comparar los dominios de lectina, EGF, CR1 y CR2 de la P-selectina de humano y de ratón (Fig. 1) para identificar diferencias de aminoácidos entre la P-selectina humana y la murina (secuencias y numeración de acuerdo con las proteínas maduras).

[0136] El método empleó modelos tridimensionales de P-selectina para comparar las posiciones de las diferencias en los aminoácidos entre la P-selectina humana y la murina sobre la superficie expuesta de la proteína y para identificar cúmulos de diferencias en aminoácidos entre humanos y ratón en los dominios de lectina y EGF que están situados sobre la superficie de la proteína plegada. Este método tridimensional representa cúmulos de diferencias en aminoácidos que resultan de la yuxtaposición de aminoácidos discontinuos puestos en proximidad entre sí por el plegamiento de la proteína. Por ejemplo, algunos aminoácidos formarán epítopes conformacionales por virtud de encontrarse sobre la misma superficie, p.ej. la cara, de estructuras helicoidales. La comparación de homología de esos cúmulos dio cabida a la selección de sustituciones de aminoácidos para poner a prueba el efecto de esos cambios sobre la unión de los anticuerpos de bloqueo de función (bloqueo de PSGL-1) contra la P-selectina humana.

[0137] El método además involucró la cartografía de sitios conservados de restricción en los marcos de lectura abiertos del ADNc para identificar una estrategia para construir proteínas quiméricas que abarcan los dominios de lectina, EGF, CR1 y CR2 y permitirían la sustitución de aminoácidos únicos o múltiples a sitios específicos en la P-selectina humana o murina para identificar aquellos aminoácidos que optimizan la unión del anticuerpo a la P-selectina humana. Las quimeras se construyeron con técnicas conocidas de clonación molecular, usando regiones N-terminales de la P-selectina humana y murina que abarcan los dominios ATG a CR2 dominio con un vector adecuado como pBluescript (pBS-hPsel y pBS-mPsel). Las quimeras se insertaron dentro de otro vector adecuado como pIG1 (pIG-hPsel y pIG-mPsel) en donde los constructos estaban fusionados a la región Fc de IgG1 humana que contiene la región de bisagra, CH2 y CH3. Estos constructos preservaron estructuras que concuerdan con la conformación nativa de la P-selectina. Así pues, los dominios que se expusieron sobre la superficie de la proteína nativa también estaban presentes en los constructos de quimera y por ello sirvieron como epítopes putativos para la unión de anticuerpos de prueba. Esos constructos podían transfectarse y exponerse transitoriamente

usando técnicas de expresión molecular y celular conocidas de las personas medianamente versadas en el estado de la técnica.

[0138] Usando este método, los anticuerpos de prueba, se pueden evaluar para determinar la unión a las quimeras humano/ratón usando un método como, pero sin limitaciones, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y resonancia de plasmones de superficie (BIAcore) conocidos de las personas medianamente versadas en el estado de la técnica. Se evaluaron los efectos de los cambios de aminoácidos en varias posiciones en los constructos de quimera por la sustitución de aminoácidos de ratón, por ejemplo, dentro de la secuencia humana, a la inversa o aminoácidos humanos dentro de la secuencia de ratón, por ejemplo, que abogaron o permitieron la unión de anticuerpos dirigidos contra P-selectina humana y así permitieron la identificación de aminoácidos particulares para que la unión sea óptima.

[0139] *Caracterización de Constructos de quimera*

[0140] Los aminoácidos de la P-selectina de ratón que han sido sustituidos dentro de la secuencia de la P-selectina humana están indicados en negrita en las quimeras que se describen a continuación. Los aminoácidos de la P-selectina humana que han sido sustituidos dentro de la secuencia de ratón están indicados en negrita y cursiva. La sustitución de glutamina por histidina está indicada en negrita subrayada.

[0141] **Constructos de proteína nativa**

[0142] SEQ ID NO:1

[0143] Dominios de lectina, EGF, CR1, CR2 de la P-selectina humana

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRyTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPYSSYYWIGIRKNNKTW
61

TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121

SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNMNCSHPLGNFS
181

FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKIPERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEEGFALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

[0144] SEQ ID NO:2

[0145] Dominios de lectina, EGF, CR1, CR2 de la P-selectina de ratón – Las diferencias con los aminoácidos humanos aparecen en negrita.

42 WTYNYSTKAYSWNNSRVFCRRHFTDLVAIQNKNEIAHLNDVIPFFNSYYWIGIRKINNKW
102

TWVGTNKTLTEEAENWADNEPNNKNNQDCVEIYIKSNSAPGKWNDHPCFKRKRALCYTA
162

SCQDMSCSNQGECIETIGSYTCSCYPGFYGPCEYVKECGKVNIPQHVLNMNCSHPLGEFS
222

FNSQCTFSCAEGYELDGPGEIQCLASGIWTNNPPKCDVQCQSLEAPPHGTMACMHPIAA
282 FAYDSSCKFECQPGYRARGSNLHCTGSGQWSEPLPTCEAIA

[0146] **Constructos de quimera Humano/Ratón**

3

[0147] SEQ ID NO:3

[0148] *Quimera-1*

[0149] (sustituciones de ratón en humano en el cúmulo A - $N_4N_{14}V_{17}F_{18}R_{20}R_{21}H_{22}F_{23}$)

1 WTYNYSTKAYSWNNSRVFCRRHFTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPYYSSYYWIGIRKNNKTW
61

TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121

SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNMNCSHPLGNFS
181

FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKIPERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEEFGALVGPEVVQCTASGWWTAPAPVCK---

[0150] SEQ ID NO:4

[0151] *Quimera-2*

[0152] (cúmulo A humano a I_{35} – ratón en lo sucesivo)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIAHLNDVIPFFNSYYWIGIRKINNKW
61

TWVGTNKTLTEEAENWADNEPNNKNNQDCVEIYIKSNSAPGKWNDPECFKRKRALCYTA
121

SCQDMSCSNQGECIETIGSYTCSCYPGFYGPCEYVKECGKVNIPQHVLNMNCSHPLGEFS
181

FNSQCTFSCAEGYELDGPGEQCLASGIWTNNPPKCDAVQCQSLEAPPHGTMACMHPIAA
241 FAYDSSCKFECQPGYRARGSNLHCTGSGQWSEPLPTCEAIA

[0153] SEQ ID NO:5

[0154] *Quimera-3*

[0155] (sustituciones en cúmulo A humano – a ratón $N_4N_{14}V_{17}F_{18}$)

1 WTYNYSTKAYSWNNSRVFCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPYYSSYYWIGIRKNNKTW
61

TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121

SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNMNCSHPLGNFS
181

FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKIPERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEEFGALVGPEVVQCTASGWWTAPAPVCK---

[0156] SEQ ID NO:6

[0157] *Quimera-4*

[0158] (sustituciones en cúmulo A humano – a ratón $R_{20}R_{21}H_{22}F_{23}$)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCRRHFTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPYYSSYYWIGIRKNNKTW
61

TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA

9

121

SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNCSHPLGNFS

181

FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKIPERGNMTCLHSAKA

241 FQHQSSCSFSCEEFGFALVGPEVVQCTASGWWTAPAPVCK---

[0159] SEQ ID NO:7

[0160] *Quimera-5*

[0161] (cambio de aminoácido único -H₄ de humano por N₄ de ratón)

1 WTYNYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPYYSSYYWIGIRKNNKTW

61

TWVGTTKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA

121

SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNCSHPLGNFS

181

FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKIPERGNMTCLHSAKA

241 FQHQSSCSFSCEEFGFALVGPEVVQCTASGWWTAPAPVCK---

[0162] SEQ ID NO:8

[0163] *Quimera-5Q*

[0164] (sustitución de Q por H₄ en el cúmulo A - elimina sitio putativo de glucosilación)

1 WTYQYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPYYSSYYWIGIRKNNKTW

61

TWVGTTKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA

121

SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNCSHPLGNFS

181

FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKIPERGNMTCLHSAKA

241 FQHQSSCSFSCEEFGFALVGPEVVQCTASGWWTAPAPVCK---

[0165] SEQ ID NO:9

[0166] *Quimera-6*

[0167] (secuencia humana a EGF - S₁₂₁ -EGF, CR1 y CR2 de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPYYSSYYWIGIRKNNKTW

61

TWVGTTKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA

121

SCQDMSCSNQGECIETIGSYTCSCYPGFYGPCEYVKECGKVNIPQHVLNCSHPLGEFS

181

FNSQCTFSCAEGYELDGPGELQCLASGIWTNNPPKCDVQCQSLEAPPHGTMACMHPIAA

241 FAYDSSCKFECQPGYRARGSNLHCTGSGQWSEPLPTCEAIA

[0168] SEQ ID NO:10

41

[0169] Quimera-7

[0170] (secuencia humana a G₁₇₇ – ratón en lo sucesivo)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPYYSSYYWIGIRKNNKTW
61
TWVGTTKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121
SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNMNCSHPLGEFS
181
FNSQCTFSCAEGYELDGPGEQCLASGIWTNNPPKCDVQCQSLEAPPHGTMACMHPIAA
241 FAYDSSCKFECQPGYRARGSNLHCTGSGQWSEPLPTCEAIA

[0171] SEQ ID NO:11

[0172] Quimera-7B

[0173] (secuencia humana a final de EGF – V₁₅₆ – ratón en lo sucesivo)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPYYSSYYWIGIRKNNKTW
61
TWVGTTKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121
SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVKECGKVNIPQHVLNMNCSHPLGEFS
181
FNSQCTFSCAEGYELDGPGEQCLASGIWTNNPPKCDVQCQSLEAPPHGTMACMHPIAA
241 FAYDSSCKFECQPGYRARGSNLHCTGSGQWSEPLPTCEAIA

[0174] SEQ ID NO:12

[0175] Quimera-8

[0176] (cambio de aminoácido único –I₁₄ de humano por N₁₄ de ratón)

1 WTYNYSTKAYSWNNSRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPYYSSYYWIGIRKNNKTW
61
TWVGTTKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121
SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNMNCSHPLGNFS
181
FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPLKIPERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEEGFALVGPEVVQCTASGWWTAPAPVCK---

[0177] SEQ ID NO:13

[0178] Quimera-9

[0179] (cambio de aminoácido único - K₁₇ de humano por V₁₇ de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRVYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPYYSSYYWIGIRKNNKTW
61
TWVGTTKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121
SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNMNCSHPLGNFS

2

181

FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKIPERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEEFGFALVGPEVVQCTASGWWTAPAPVCK---

[0180] SEQ ID NO:14

[0181] *Quimera-10*

[0182] (cambio de aminoácido único -Y₁₈ de humano por F₁₈ de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKFCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPYYSSYYWIGIRKNNKTW
61

TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121

SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNMNCSHPLGNFS
181

FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKIPERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEEFGFALVGPEVVQCTASGWWTAPAPVCK---

[0183] SEQ ID NO:15

[0184] *Quimera-11*

[0185] (cambio de aminoácido único -Q₂₀ de humano por R₂₀ de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCRNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPYYSSYYWIGIRKNNKTW
61

TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121

SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNMNCSHPLGNFS
181

FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKIPERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEEFGFALVGPEVVQCTASGWWTAPAPVCK---

[0186] SEQ ID NO:16

[0187] *Quimera-12*

[0188] (cambio de aminoácido único -N₂₁ de humano por R₂₁ de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQRRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPYYSSYYWIGIRKNNKTW
61

TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121

SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNMNCSHPLGNFS
181

FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKIPERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEEFGFALVGPEVVQCTASGWWTAPAPVCK---

[0189] SEQ ID NO:17

[0190] *Quimera-13*

[0191] (cambio de aminoácido único -R₂₂ de humano por H₂₂ de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNHYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPYYSSYYWIGIRKNNKTW

43

61
TWVGTTKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121
SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNCSHPLGNFS
181
FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPQCLAAQCPPLKIPERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEEGFALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

[0192] SEQ ID NO:18

[0193] *Quimera-14*

[0194] (cambio de aminoácido único -Y₂₃ de humano por F₂₃ de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRFTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPYSSYYWIGIRKNNKTW
61
TWVGTTKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121
SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNCSHPLGNFS
181
FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPQCLAAQCPPLKIPERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEEGFALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

[0195] SEQ ID NO:19

[0196] *Quimera-15*

[0197] (secuencia humana a cúmulo C2 - S₉₇ - ratón en lo sucesivo)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRFTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPYSSYYWIGIRKNNKTW
61
TWVGTTKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSNSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121

SCQDMSCSNQGECIETIGSYTCSCYPGFYGPCEYVKECGKVNIPQHVLNCSH
PLGEFS
181
FNSQCTFSCAEGYELDGPGLQCLASGIWTNPPKCDVQCQSLEAPPHGTMACMHPIAA
241 FAYDSSCKFECQPGYRARGSNLHCTGSGQWSEPLPTCEAIA

[0198] SEQ ID NO:20

[0199] *Quimera-16*

[0200] (sustitución de H₄I₁₄K₁₇N₂₁R₂₂ de humano dentro de Cúmulo A de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKFRCRNRFTDLVAIQNKNEIAHLNDVIPFFNSYYWIGIRKINNKW
61
TWVGTTKALTNEAENWADNEPNNKNNQDCVEIYIKSNSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121
SCQDMSCSNQGECIETIGSYTCSCYPGFYGPCEYVKECGKVNIPQHVLNCSHPLGEFS
181
FNSQCTFSCAEGYELDGPGLQCLASGIWTNPPKCDVQCQSLEAPPHGTMACMHPIAA
242 FAYDSSCKFECQPGYRARGSNLHCTGSGQWSEPLPTCEAIA

44

[0201] SEQ ID NO:21
[0202] *Quimera-17*
[0203] (secuencia humana a Cúmulo B a I₃₅ –Cúmulo B de ratón a I₄₂ – humanos a CR1 a E₁₅₄ –CR1, CR2 de ratón)
1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIAHLNDVIPYYSSYYWIGIRKNNKTW
61
TWVGTTKALTNEAENWADNEPNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKH
ALCYTA
121
SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPECEYVKECGKVNIPQHVLNCSHPLGEFS
181
FNSQCTFSCAEGYELDGPGLQCLASGIWTNNPPKCDVQCQSLEAPPHGTMAC
MHPIAA
242 FAYDSSCKFECQPGYRARGSNLHCTGSGQWSEPLPTCEAIA

[0204] SEQ ID NO:22
[0205] *Quimera-17B*
[0206] (secuencia humana a Cúmulo B a I₃₅ –Cúmulo B de ratón a I₄₂ – humano en lo sucesivo)
1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIAHLNDVIPYYSSYYWIGIRKNNKTW
61
TWVGTTKALTNEAENWADNEPNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKH
ALCYTA
121
SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPECEYVRECGELELPQHVLNCSH
PLGNFS
181
FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKIPERGNMTCL
HSAKA
242 FQHQSSCSFSCEEGFALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

[0207] SEQ ID NO:23
[0208] *Quimera-18*
[0209] (secuencia humana con cúmulo C de ratón (C1, C2, C3) y CR1, CR2 de ratón)
1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPFNSYYWIGIRKNNKTW
61
TWVGTTKALTNEAENWADNEPNKRNNEDCVEIYIKSNSAPGKWNDHCLKKKR
ALCYTA
121
SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPECEYVKECGKVNIPQHVLNCSH
PLGEFS

45

181

FNSQCTFSCAEGYELDGPGEQCLASGIWTNNPPKCDVQCQSLEAPPHGTMAC

MHPIAA

242 FAYDSSCKFECQPGYRARGSNLHCTGSGQWSEPLPTCEAIA

[0210] SEQ ID NO:24

[0211] Quimera-18B

[0212] (secuencia humana con cúmulo C de ratón (C1, C2, C3)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPFNSYYWIGIRKNNKTW

61

TWVGTKKALTNEAENWADNEPNKRNNEDCVEIYIKSNSAPGKWNDHCLKKKR

ALCYTA

121

SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNCSH

PLGNFS

181

FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKIPERGNMTCL

HSAKA

242 FQHQSSECSFSCFEGFALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

[0213] SEQ ID NO:25

[0214] Quimera-19

[0215] (secuencia humana con Cúmulo D de ratón y CR1, CR2 de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPYSSYYWIGIRKINNKW

61

TWVGTKTLTEEAENWADNEPNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKH

ALCYTA

121

SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVKECGKVNIPQHVLNCSH

PLGEFS

181

FNSQCTFSCAEGYELDGPGEQCLASGIWTNNPPKCDVQCQSLEAPPHGTMAC

MHPIAA

242 FAYDSSCKFECQPGYRARGSNLHCTGSGQWSEPLPTCEAIA

[0216] SEQ ID NO:26

[0217] Quimera-19B

[0218] (secuencia humana con Cúmulo D de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPYSSYYWIGIRKINNKW

61

TWVGTKTLTEEAENWADNEPNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKH

ALCYTA

46

121

SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNCSH
PLGNFS

181

FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKIPERGNMTCL
HSAKA

242 FQHQSSECSFSCCEGFALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

[0219] SEQ ID NO:27

[0220] *Quimera-20*

[0221] (secuencia humana con Cúmulo E de ratón y CR1, CR2 de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPYSSYYWIGIRKNNKTW

61

TWVGTTKALTNEAENWADNEPNKRNNEDCVEIYKSPSAPGKWNDPCFKRKH

ALCYTA

121

SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVKECGKVNIPQHVLNCSH
PLGEFS

181

FNSQCTFSCAEGYELDGPGLQCLASGIWTNNPPKCDVQCQSLEAPPHGTMAC
MHPIAA

242 FAYDSSCKFECQPGYRARGSNLHCTGSGQWSEPLPTCEAIA

[0222] SEQ ID NO:28

[0223] *Quimera-20B*

[0224] (secuencia humana con Cúmulo E de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPYSSYYWIGIRKNNKTW

61

TWVGTTKALTNEAENWADNEPNKRNNEDCVEIYKSPSAPGKWNDPCFKRKH

ALCYTA

121

SCQDMSCSKQGECLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNCSH
PLGNFS

181

FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKIPERGNMTCL
HSAKA

242 FQHQSSECSFSCCEGFALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

[0225] SEQ ID NO:29

[0226] *Quimera-21*

[0227] (secuencia humana con Cúmulo F de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPPYSSYYWIGIRKNNKTW

49

61

TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKH
ALCYTA

121

SCQDMSCSNQGECIETIGSYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLMNCSH
PLGNFS

181

FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKIPERGNMTCL
HSAKA

242 FQHQSSCSFSCEEFGALVGPEVWQCTASGVWTAPAPVCK---

[0228] *Análisis FACS de anticuerpos anti-P selectina contra quimeras humano/ratón*

[0229] La unión del anticuerpo a quimeras humano/ratón de P-selectina se analizó usando análisis FACS en un sistema como BD BIOSCIENCES FACS ARIA CELL SORTER para medir la unión de los anticuerpos anti-P selectina a quimeras humano/ratón que estaban acopladas a perlas recubiertas con un anticuerpo Fc de cabra anti-humano. Esas perlas recubiertas con quimeras se incubaron con anticuerpos de prueba anti-P selectina que luego se detectaron con anti-Fc de ratón o anticuerpos específicos de isotipo rotulados con reportadores, como FITC, adecuados para ser detectados por el sistema FACS.

[0230] *Resonancia de plasmones de superficie en un paso (BIAcore)*

[0231] En un aspecto de los conceptos inventivos que aquí se revelan, se usaron chips BIAcore para capturar un anticuerpo anti-P-selectina de prueba. Las quimeras de P-selectina humana/murina aquí descritas se dispusieron sobre el chip y se añadieron los anticuerpos de prueba al chip preligado. La unión de las quimeras a los anticuerpos de prueba se midió por unidades de respuesta de resonancia.

[0232] *Análisis de resonancia de plasmones de superficie en dos pasos (BIAcore)*

[0233] En otro aspecto de los conceptos inventivos que aquí se revelan, un chip de captura, como un chip BIAcore fue provisto de un anticuerpos policlones de cabra Fc anti-IgG humana enlazados covalentemente a su superficie. Los constructos quiméricos de P-selectina humana/murina del dominio de lectina, EGF, CR1 y CR2 sobre un IgG Fc humana se inyectaron sobre el chip y se capturaron a concentraciones que alcanzan un nivel estandarizado de recubrimiento de superficie medido por la respuesta de resonancia. El nivel de respuesta de resonancia alcanzado después de cargar cada constructo de quimera de P-selectina se designó como un nuevo nivel "basal secundario". Los anticuerpos de prueba anti-P selectina (p.ej., anticuerpos monoclonales murinos o humanizados anti-P selectina, incluidos G1, G3, G4, G5 y hSel001) se inyectaron entonces sobre el chip BIAcore y se incubaron para lograr la unión al constructo de quimera de P-selectina ya capturado sobre la superficie. El método se podía modificar para probar anticuerpos humanizados mediante la creación de constructos de P-selectina sobre IgG Fc de ratón y capturándolos con anticuerpos policlones de cabra anti-IgG Fc de ratón y luego examinándolos con anticuerpos humanizados anti-P selectina de prueba. Los anticuerpos que se unen a la constructos de P-selectina causan un aumento del nivel de respuesta de resonancia a partir

48

del basal secundario. El aumento resultante en la respuesta de resonancia se puede medir como "unidades de resonancia sumadas (RUs)" y así indicar el nivel de unión al constructo de P-selectina previamente recubierto sobre el chip de captura del anticuerpo de prueba. Usando estos métodos, los requisitos óptimos para la unión de anticuerpos anti-P selectina a quimeras de P-selectina se cartografiaron con precisión a epítopes conformacionales particulares.

[0234] *Identificación de anticuerpos de doble función anti-P selectina (anticuerpos que tanto bloquean como disocian la unión de la P-selectina a PSGL-1)*

[0235] El análisis BIACORE también se usó para descubrir la doble funcionalidad de anticuerpos específicos anti-P selectina, es decir, como se discutió arriba, pueden tanto bloquear como disociar (revertir) las interacciones de unión entre P-selectina y PSGL-1. En este método, PSGL-1 o miméticos de molécula pequeña del epítipo de unión de PSGL-1 como un mimético glucosulfopéptido biotinilado (p.ej., GSP-6) o proteínas quiméricas que contienen el N-terminal de PSGL-1, se capturan sobre un chip BIACORE, como un chip de estreptavidina, usando métodos conocidos de las personas medianamente versadas en la técnica (GSP-6 es un péptido mimético glucosilado, sulfatado de 18 aminoácidos 42-60 del N-terminal expuesto de PSGL-1 descrito en detalle en la patente estadounidense No. 6.593.459, por ejemplo). Primero, para demostrar la capacidad de "bloqueo de función", en una modalidad, un anticuerpo anti-P-selectina se mezcla previamente con P-selectina soluble y se incuba un tiempo para permitir la formación del complejo P-selectina/anticuerpo. El complejo resultante anticuerpo anti-P-selectina/P-selectina se introduce sobre el chip u otro sustrato que porta el PSGL-1 (o mimético de PSGL-1) y se mide la unión al PSGL-1 o su mimético. Los anticuerpos anti-P selectina, que previenen la unión de la P-selectina al PSGL-1 o mimético de PSGL-1 sobre el chip, se designan aquí como anticuerpos de bloqueo de función.

[0236] Segundo, los anticuerpos anti-P selectina que han demostrado (por el método anterior u otro similar) ser anticuerpos de bloqueo de función (es decir, que bloquean la unión PSGL-1/P-selectina), se pueden examinar para determinar una función adicional, es decir, que tienen la capacidad de disociar (revertir) la unión entre complejo preformado P-selectina/PSGL-1. Estos anticuerpos se pueden examinar para definir sus propiedades de "doble función" usando el método de análisis BIACORE aquí discutido. En una modalidad, para demostrar la propiedad de doble función, el PSGL-1 o un mimético del mismo como GSP-6, se acopla a un chip BIACORE. Entonces se dispone la P-selectina sobre el chip y se permite su unión al PSGL-1 o mimético. Después de la unión de equilibrio de la P-selectina al PSGL-1 o al mimético, indicada por el sensograma, se introducen los anticuerpos de bloqueo de función anti-P selectina y la disociación de unión de la P-selectina al PSGL-1 o mimético se mide por cualquier método adecuado. Esos anticuerpos que se demuestra que disocian (es decir, revierten), la unión P-selectina/PSGL-1 se designan como "anticuerpos disociadores" y se caracterizan como anticuerpos de doble función, es decir, poseen propiedades tanto de bloqueo de función como de disociación para interrumpir la unión de la P-selectina al PSGL-1. Esos anticuerpos de doble función constituyen una modalidad

particularmente preferida de la invención porque son especialmente adecuados para aplicación terapéutica como tratamientos de enfermedades inflamatorias y trombóticas agudas y crónicas como se describe en otra parte de este documento.

[0237] *Descubrimiento de epítopes conformacionales*

[0238] La estructura tridimensional (3-D) de las proteínas maduras de la P-selectina humana y murina se analizó y comparó con respecto a las diferencias de aminoácidos en los dominios de lectina y EGF. Se identificaron seis cúmulos de diferencias conformacionales en aminoácidos sobre las superficies expuestas de las proteínas. Se designaron como los cúmulos A, B, C, D, E y F (Fig. 1). Los N-terminales de las P-selectinas humanas y murinas que abarcan los residuos 1-35 contienen 8 diferencias de aminoácidos. El cúmulo A se definió arbitrariamente por la unión de la primera diferencia de aminoácido (H₄) y la última diferencia de aminoácido (Y₂₃). El Cúmulo A contiene 20 aminoácidos y forma una hélice alfa rígida con un enlace de cisteína cerca del N-terminal de la proteína (Ver la región "1" en la Fig. 5). El Cúmulo B (Fig. 1) es un epítipo conformacional que abarca los residuos de aminoácidos 36-42 y contiene 4 diferencias en aminoácidos entre la P-selectina humana y la murina. Cuando se usa aquí, el término "epítipo conformacional" tiene por objeto referirse a un epítipo que no es reconocido en condiciones reductoras. Los Cúmulos C y E (Fig. 1) son conformacionales y discontinuos y son llevados a la proximidad por el pliegue de la proteína P-selectina nativa. El Cúmulo C tiene tres regiones conformacionales (C1, C2, C3) que contienen 5 diferencias de aminoácidos entre la P-selectina humana y la murina. El Cúmulo C1 está separado de C2 por 51 aminoácidos y el cúmulo C2 está separado de C3 por 15 aminoácidos. De manera parecida, el cúmulo E tiene dos epítopes conformacionales (E1, E2) que contienen cinco diferencias de aminoácidos entre la P-selectina humana y la murina en donde el cúmulo E1 está separado de E2 por 19 aminoácidos. Los Cúmulos A, B, C, D y E caen dentro del dominio de consenso de la lectina de la P-selectina (Fig. 1). El Cúmulo F reside en el dominio EGF y tiene 3 diferencias de aminoácidos de un total de 11 aminoácidos. Los Cúmulos C1, E1, C2, E2 y C3 abarcan residuos clave de contacto los cuales previamente se habían identificado por la interacción de la P-selectina con su ligando fisiológico PSGL-1 (Somers et al). Los Cúmulos A y B son distales a (corriente arriba) de estos residuos de contacto.

[0239] Los marcos de lectura abiertos de ADNcs para la P-selectina humana y la murina se analizaron para identificar sitios comunes de restricción que podrían usarse para ensamblar quimeras que abarcan los cúmulos. La síntesis de ADN por PCR y química se usó para generar ADNcs que codifican proteínas o constructos específicos de quimera como SEQ ID NO: 1-29 (se describió arriba y en el listado de secuencias). La clonación de restricción se usó para construir plásmidos que codifican las quimeras humano/ratón. Las quimeras se expresaron transitoriamente en células COS-7 y se usaron para análisis FACS y BIACORE. Las quimeras de P-selectina se examinaron para determinar su función de unión usando BIACORE analizando su unión a GSP-6 ligado a un chip BIACORE. Como se anotó arriba, GSP-6 es una molécula pequeña que simula el N-terminal del PSGL-1 humano. Todas las quimeras examinadas se ligaron al GSP-6 sobre el chip, aunque en grado

50

variable, porque la P-selectina de ratón tiene menor afinidad de unión al PSGL-1 humano que la P-selectina humana. Esto indicó que las quimeras habían conservado su función después de la expresión y purificación.

[0240] *Análisis FACS*

[0241] Los resultados del análisis FACS de los anticuerpos anti-P selectina, usando los constructos o quimeras correspondientes a SEQ ID NOs.:1-29 se resumen en la Tabla 1. Cuatro anticuerpos anti-P-selectina de prueba (G1, G3, G4 y G5) fueron aislados de hibridomas generados por inmunización de ratones con una P-selectina humana recombinante que contiene los dominios de lectina y EGF (90 y datos sin publicar). Estos estudios habían mostrado que estos anticuerpos fueron específicos a la P-selectina humana y que G1, G3 y G4 son anticuerpos de bloqueo de función en tanto que G5 es de no bloqueo (90 y datos sin publicar). G1, G3 y G5 se analizaron mediante análisis FACS. Usando este método, G1, G3 y G5 todos se ligaron a la P-selectina humana (SEQ ID NO:1) pero no a la P-selectina de ratón (SEQ ID NO:2). Cuando los correspondientes ocho aminoácidos de ratón fueron sustituidos en el cúmulo A de la secuencia humana (Quimera 1, SEQ ID NO:3), la unión por G1 pero no G3 o G5 se abolió, lo cual indica que por lo menos uno o más de las correspondientes ocho posiciones de aminoácido en el cúmulo A fueron esenciales para la unión de G1 a la P-selectina y que la sustitución con los aminoácidos de "ratón" en esas una o más posiciones abolieron la unión. Para confirmar la importancia de estos residuos, los ocho diferentes aminoácidos humanos en las posiciones 1-23 fueron sustituidos en el cúmulo A de la secuencia de ratón (SEQ ID NO:4, quimera-2). Estas sustituciones confirieron a G1 unión a la proteína de ratón. Las quimeras que contienen el dominio de lectina de la P-selectina humana con sustituciones con aminoácidos de ratón en los dominios EGF, CR1 y CR2 (SEQ ID NO:9, quimera-6) y la secuencia humana a través del dominio EGF y dentro del dominio CR1 con secuencia de ratón en el resto del dominio CR1 y todo el dominio CR2 (SEQ ID NO:10, quimera-7), fueron ligados por G1 y G3 lo cual indica que los epítopes primarios de unión permanecieron intactos después de la sustitución de estos aminoácidos de ratón y que la conformación de los epítopes de unión del anticuerpo no resultó adversamente afectada. Estos datos confirmaron que los epítopes de unión para G1 y G3 residían en el dominio de la lectina.

[0242] Usando el método FACS, se demostró que el anticuerpo de prueba G3 se une a la P-selectina humana pero no a la P-selectina de ratón y en contraposición con G1, ligado a la SEQ ID NO:3 (quimera-1), lo cual indica que G3 se une a un epítope distinto del epítope ligado por G1. Los detalles específicos de la cartografía del epítope G3 se muestran en la Tabla 1.

[0243] El anticuerpo de prueba G5, del cual previamente se había demostrado que no era bloqueador, también se analizó usando este método. También se demostró que G5 se une a la P-selectina humana pero no a la P-selectina de ratón. El G5 se liga a la SEQ ID NO:3 y la SEQ ID NO:10 que abarca el dominio EGF e incluye la primera parte de CR1 a N₁₇₈, pero G5 no se ligó a la SEQ ID NO:9 que abarca un S₁₂₈. Estos resultados indican que el anticuerpo G5 se une a la primera parte del CR1 y requiere por lo menos los aminoácidos

51

R₁₂₈ a N₁₇₈.

52

[0244] Tabla 1. Resultados de la unión de varios anticuerpos (G1, G3, G4, G5, hSel001) a la P-selectina humana y murina y constructos de quimera de los mismos.

¹Por FACS, ²Por BIACORE 1 paso, ³Por BIACORE 2 pasos, ^wUnión débil

Quimeras humana/ratón								
SeqID	Dominios de ratón Insertados en la P-selectina humana	Humano	Ratón	G1	G3	G5	G4	hSel001
1	Ninguno	1-279	0	+ ^{1,2,3}	+ ^{1,2,3}	+ ^{1,3}	+ ³	+ ²
2	todos	0	1-282	- ^{1,2,3}	- ^{1,2,3}	- ^{1,3}	- ³	- ²
3	A _{4,14,17,18,20,21,22,23}	1-3, 24-279	4-23	- ^{1,2,3}	+ ^{1,3}	+ ¹	- ³	
4	B,C,D,E,F	1-35	36-282	+ ^{1,2,3}	- ³		+ ³	
5	A _{4,14,17,18}	19-279	1-18	- ²				
6	A _{20,23}	1-19, 24-279	20-23	- ²				
7	A ₄	1-3, 5-279	4	+ ^{2w,3w}	+ ³		+ ^{3w}	
8	ninguno	1-3, 5-279	0	+ ^{2,3}	+ ³		+ ³	
9	F, CR1, CR2	1-128	129-282	+ ^{1,2,3}	+ ^{1,3}	- ^{1,3}	+ ³	
10	CR1, CR2	1-177	178-282	+ ^{1,2,3}	+ ^{1,3}	+ ^{1,3}	+ ³	
11	CR1, CR2	1-156	157-282	+ ²	+ ²	- ²		
12	A ₁₄	1-13, 15-279	14	- ²				
13	A ₁₇	1-16, 18-279	17	- ²				
14	A ₁₈	1-17, 19-279	18	+ ²				
15	A ₂₀	1-19, 21-279	20	+ ²				
16	A ₂₁	1-20, 22-279	21	+ ^{2w}				
17	A ₂₂	1-21, 23-279	22	- ²				
18	A ₂₃	1-22, 24-270	23	+ ²				
19	C2,E2,C3, F,CR1,CR2	1-97	98-282	+ ^{2,3}	- ³		+ ³	
20	B,C,D,E,F	1-35 H/M híbrido	36-282	+ ^{2,3}	- ^{2,3}		+ ³	+ ²
21	B,CR1,CR2	1-35, 43-156	36-42, 157-282	+ ³	+ ³	- ³		
22	B	1-35, 43-279	36-42		+ ³	+ ³		
23	C1,C2,C3, CR1,CR2	1-43, 47-97, 99-113, 115-156	44-46, 98, 114, 157-282	+ ³	- ³	- ³		
24	C1,C2,C3	1-43, 47-97, 99-113, 115-279	44-46, 98, 114		- ³	+ ³		
25	D,CR1,CR2	1-55, 72-156	56-71, 157-282	+ ³	+ ³			
26	D	1-55, 72-279	56-71		+ ³	+ ³		
27	E1,E2,CR1,CR2	1-84, 89-107, 113-156	85-88, 108-112, 157-282	+ ³	+ ³			
28	E1,E2	1-84, 89-107, 113-279	85-88, 108-112		+ ³	+ ³		
29	F	1-128, 140-279	129-139		+ ³	+ ³		
			Posiciones críticas de aminoácido:	A (4,14,17,21,22)	C	Primer a parte de CR1 (157-164)	A (4,14,17,21,22)	A (4,14,17,21,22)

[0245] *Resonancia de plasmones de superficie de un paso (BIAcore)*

[0246] Para investigar más a fondo la importancia del dominio del cúmulo A (aminoácidos 4-23) a la unión del anticuerpo G1 a la P-selectina, se hicieron varios constructos quiméricos en los cuales aminoácidos de ratón únicos o múltiples se insertaron dentro de la secuencia de la P-selectina humana y la unión se analizó usando los métodos de resonancia de plasmones de superficie (BIAcore de “un paso”) aquí revelados. Los resultados de la unión BIAcore de un paso se presentan en la Tabla 1. El anticuerpo G1 de prueba se capturó en un chip BIAcore y la unión de varias quimeras se midió como unidades de respuesta. Un sensograma representativo que muestra la unión de G1 a los constructos de P-selectina humana (SEQ ID NO:1), P-selectina de ratón con cúmulo A humano (SEQ ID NO:4) y P-selectina de ratón (SEQ ID NO:2) se muestra en la Figura 2. Usando este método, se demostró que G1 se ligó a la P-selectina humana y a la SEQ ID NO:4 (en la cual los aminoácidos humanos fueron sustituidos en el cúmulo A de la P-selectina de ratón), pero no se ligó a la P-selectina de ratón (SEQ ID NO:2). Estos resultados demuestran que este método concuerda con los resultados FACS.

[0247] La P-selectina de ratón (SEQ ID NO:2) tiene un sitio putativo de glucosilación (N) en la posición 4 en tanto que la P-selectina humana (SEQ ID NO:1) no lo tiene. Para examinar la importancia de esta diferencia, la posición 4 de la P-selectina humana SEQ ID NO:1 fue sustituida con un N (formando la SEQ ID NO:7) o un Q (formando la SEQ ID NO:8) y se midió el efecto de estas sustituciones sobre la unión a G1 del anticuerpo. La inserción de asparagina (N) dentro de la P-selectina humana en la posición 4 disminuye la unión del G1 lo cual sugiere que la glucosilación en este sitio de la P-selectina humana interferiría con la unión del anticuerpo. La sustitución de la glutamina (Q) en esta posición no evitó la unión al G1.

[0248] Para identificar todavía más las posiciones amino en el cúmulo A que son óptimas o esenciales para la unión a G1 del anticuerpo, se hicieron sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de ratón dentro de la P-selectina humana (SEQ ID NO:1) y la unión de las quimeras resultantes a G1 se midió usando el método BIAcore de un paso aquí revelado (Tabla 1). Las quimeras examinadas (con las sustituciones específicas indicadas entre paréntesis) fueron: SEQ ID NO:7 (H₄N); SEQ ID NO:12 (I₁₄N); SEQ ID NO:13 (K₁₇V); SEQ ID NO:14 (Y₁₈F); SEQ ID NO:15 (Q₂₀R); SEQ ID NO:16 (N₂₁R); SEQ ID NO:17 (R₂₂H); y SEQ ID NO:18 (Y₂₃F). El anticuerpo G1 se ligó a la SEQ ID NO:14, 15 y 18, pero no a la SEQ ID NO:12, 13 y 17 y solo débilmente a la SEQ ID NO:7 y la SEQ ID NO:16. Este resultado indicó que cada una de las posiciones de aminoácido 4, 14, 17, 21 y 22 son posiciones individualmente requeridas para la unión G1. En una modalidad preferida, estos aminoácidos son H₄, I₁₄, K₁₇, N₂₁ y R₂₂, respectivamente.

[0249] Para confirmar que la forma humanizada de G1 (hSel001) mantenía la especificidad idéntica del epítipo del anticuerpo parental, la unión de hSel001 a la SeqID:1, 2 y 20 se examinó usando este método. El patrón de unión de hSel001 fue idéntico al de G1 lo cual confirma que la especificidad del epítipo se mantuvo durante el proceso de humanización.

[0250] *Resonancia de plasmones de superficie de dos pasos (BIAcore)*

[0251] Para valorar la unión de G1, G3, G4 y G5 (G5 es no bloqueador) a quimeras adicionales se usó el ensayo de resonancia de plasmones de superficie de dos pasos (BIAcore “de dos pasos”) aquí descrito. Los resultados de los ensayos de “dos pasos” para los anticuerpos de prueba se presentan en la Tabla 1 y en la Fig. 2. Usando este método, ninguno de los anticuerpos de

54

prueba investigados se ligó a la P-selectina de ratón y todos se ligaron a la P-selectina humana, lo cual demuestra su especificidad por la P-selectina humana. Todos los anticuerpos de prueba G1, G3, G4 y G5 se ligaron a la SEQ ID NO:10, lo cual indica todos se unen a una región que abarca el N-terminal a través de los dominios de lectina y EGF de la P-selectina humana. El anticuerpo no bloqueador G5 no se unió a la SEQ ID NO:9, pero sí a la SEQ ID NO:10 lo cual confirma que G5 se une al dominio CR1.

[0252] El análisis ulterior con el uso de este método mostró que G3 no se ligó a la SEQ ID NO:23, la cual tiene aminoácidos de ratón insertados en los cúmulos C1, C2, C3, CR1 y CR2, y tampoco se ligó a la SEQ ID NO:24, la cual tiene aminoácidos de ratón en C1, C2 y C3. G3 tampoco se ligó a otras quimeras que tenían secuencia de ratón en el cúmulo C, es decir, SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20. Estos resultados indican que el anticuerpo bloqueador G3 requiere el cúmulo C para la unión y demuestra el novedoso hallazgo de que los cúmulos de aminoácidos conformacionales puestos en proximidad por el plegamiento de la proteína pueden servir como dominios de unión (epítopes conformacionales) para anticuerpos anti-P selectina. El método también confirmó que G3 puede bloquear la unión de PSGL-1 y P-selectina y por ende tiene propiedades de bloqueo de función (Fig. 3). Con todo, el método también mostró que G3 no se ligó a ni disoció (revirtió) la unión del complejo P-selectina/PSGL-1 (Fig. 4) y por ello no tiene las propiedades de doble función de los anticuerpos preferidos de los conceptos inventivos que aquí se revelan.

[0253] Las posiciones de aminoácido que contribuyen a la unión de G1 y G4 a la P-selectina se identificaron mediante la generación de un híbrido humano/ratón en el cúmulo A. La quimera híbrida del cúmulo A (SEQ ID NO:20) contiene aminoácidos de P-selectina humana en las posiciones 4, 14, 17, 21 y 22 (H, I, K, N y R, respectivamente) y aminoácidos de P-selectina de ratón en las posiciones 18, 20 y 23 (Y, Q y Y, respectivamente). Como se indica en la Tabla 1, tanto G1 como G4 se unieron a la SEQ ID NO:20. Este resultado, cuando se toma en conjunto con los datos anteriores, indica que las posiciones de aminoácido 4, 14, 17, 21 y 22 comprenden posiciones cada una de las cuales se requieren son para que sea óptima la unión de G1, G4 y la forma humanizada de G1 (hSel001) a la P-selectina. Estos resultados comprenden un novedoso hallazgo de que un grupo de anticuerpos incluidos G1, G4 y hSel001 se unen al mismo epítipo o uno similar y que este epítipo se encuentra en la estructura helicoidal del cúmulo A que es distal a los residuos de contacto de la unión lectina-dominio ligando previamente identificados para la P-selectina (71). En una modalidad preferida los aminoácidos en las posiciones 4, 14, 17, 21 y 22 son H, I, K, N y R, respectivamente. El análisis tridimensional de este epítipo reveló una estructura helicoidal rígida en la cual los aminoácidos requeridos ocupan sitios en la misma cara de la hélice; así pues, el cúmulo A se designa como que comprende un epítipo conformacional (Fig. 5). El análisis BIACORE que se muestra en las Figs. 3 y 4 confirmó que G1, G4 y hSel001 pueden bloquear y también disociar la unión de la P-selectina y PSGL-1 y por ende que la unión del epítipo aquí descrito por este grupo de anticuerpos tiene las propiedades de doble función de las modalidades preferidas de los conceptos inventivos que aquí se revelan.

[0254] Estos resultados indican que los anticuerpos que se unen a un epítipo conformacional situado dentro de los aminoácidos 1-35 y más en particular dentro de los aminoácidos 4-23, de la SEQ ID NO:1, la cual es distal a la unión dominio lectina-ligando en la P-selectina humana, tendrán singulares propiedades de doble función. Sin atarse a la teoría, se contempla que los anticuerpos que

5

se unen a este epítipo actúan aportando fuerzas alostéricas que ejercen sobre la interfaz de unión lectina-ligando que inducen un cambio conformacional que disocia la unión de la P-selectina a PSGL-1. Así pues, G1 es capaz de ligar el epítipo distal al cúmulo A y bloquear y disociar el complejo al unirse e interrumpir las interacciones moleculares en el lugar de unión lectina-ligando en la P-selectina. En contraposición, anticuerpos como el G3, que se unen a un epítipo en la dominio de unión lectina-ligando de la P-selectina pueden bloquear la unión de la P-selectina a PSGL-1 por entorpecimiento alostérico, pero no pueden causar la disociación del complejo P-selectina/PSGL-1 porque el anticuerpo no se puede unir al epítipo conformacional del Cúmulo C cuando este está ocupado por el ligando. Se demostró que el anticuerpo de prueba G5 se ligó al cúmulo CR1 de la P-selectina y era no bloqueador (Fig. 3).

[0255] En resumen, los anticuerpos que se unen a la P-selectina han sido caracterizados como dotados de tres posibles actividades en lo que respecta a la interacción de la P-selectina y su ligando, PSGL-1.

[0256] Primero, los anticuerpos contra P-selectina se pueden unir a la P-selectina pero no interferir con la unión de PSGL-1 a la P-selectina ("no bloqueadores"). Por ejemplo, como se demuestra aquí, el anticuerpo G5 se une a los aminoácidos 157-164 y requiere R₁₅₇, E₁₆₁, L₁₆₂, E₁₆₃ y L₁₆₄ de CR1 para la unión pero esta unión no bloquea la unión de la P-selectina a PSGL-1.

[0257] Segundo, los anticuerpos contra la P-selectina se pueden unir a la P-selectina e interferir con la unión de PSGL-1 a P-selectina ("bloqueo de función"), pero no unirse a o disociar un complejo preformado P-selectina/PSGL-1. Por ejemplo, los resultados aquí descritos muestran que el anticuerpo G3 se une a cúmulos conformacionales en una parte diferente de la P-selectina que abarca el dominio de unión lectina-ligando. G3 se une al cúmulo C y requiere los aminoácidos de C1 Y₄₄, Y₄₅, S₄₆ y el aminoácido de C2 P₉₈ y el aminoácido de C3 H₁₁₄ y por ende requiere un epítipo conformacional. Este anticuerpo bloquea la interacción entre P-selectina y PSGL-1 pero no se puede unir a o disociar complejos preformados P-selectina/PSGL-1.

[0258] Tercero, hemos descubierto anticuerpos contra P-selectina con especificidad específica que se pueden unir a la P-selectina y no solo bloquear la unión de PSGL-1 a P-selectina (anticuerpo de bloqueo de función) sino que también pueden causar la reversión de complejos preformados de unión P-selectina/PSGL-1 (unión disociativa). Esos anticuerpos se denominan aquí anticuerpos de "doble función". Los resultados aquí revelados demuestran, por ejemplo, que G1 se une al epítipo conformacional en el cúmulo A y que esta unión tenía un requisito absoluto para un epítipo conformacional que comprende las posiciones de aminoácido 4, 14, 17, 21 y 22, que de preferencia se caracteriza porque esos aminoácidos son H, I, K, N y R, respectivamente. Como se discute en otra parte de este documento, la sustitución del aminoácido "humano" (H, I, K, N y R) en cualquiera de estas posiciones, respectivamente, por el correspondiente aminoácido de "ratón" (N, N, V, R y H) dará lugar a la anulación de la unión por los anticuerpos de doble función aquí descritos.

[0259] En otra modalidad de los conceptos inventivos que aquí se revelan, un clon previamente no caracterizado de anticuerpo monoclonal anti-P-selectina de ratón designado G4, generado usando métodos estándar de hibridoma, se examinó para determinar su unión al epítipo conformacional del cúmulo A y para definir sus capacidades de doble función usando los métodos aquí descritos. G4 se examinó para verificar la unión a las SEQ ID NOs. 1-4, 7-10, 19 y 20 de quimeras humano/ratón. Se demostró que G4 se unió a la SEQ ID NO:20 y tuvo una especificidad de

unión similar a la descrita para G1 (Ver la Tabla 1). Entonces se demostró que G4 bloquea la unión de la P-selectina a PSGL-1 (Fig. 3) y también a causa la disociación de complejos preformados P-selectina/PSGL-1 (Fig. 4), lo cual caracteriza a G4 como un anticuerpo anti-P-selectina de doble función que se une al epítipo (en el cúmulo A) que es distal al dominio de unión lectina-ligando de la P-selectina y bloquea y disocia la unión de P-selectina a PSGL-1. Así las cosas, los anticuerpos G1 y G4 se ligaron ambos a un epítipo en el cúmulo A y ambos demostraron propiedades de doble función. Este resultado también demuestra el uso del cúmulo A o posiciones específicas de unión o aminoácidos de las mismas como un epítipo que se puede usar para tamizar anticuerpos anti-P-selectina para verificar sus capacidades de doble función. Estos anticuerpos de doble función poseen propiedades singulares para aplicaciones terapéuticas en las cuales se puede tratar la iniciación de la adhesión mediada por P-selectina y/o la adhesión continuada mediada por P-selectina en escenarios agudos o crónicos. Con los métodos aquí descritos se pueden identificar otros anticuerpos que tienen propiedades de doble función usando el método de tamizaje que emplea el epítipo del cúmulo A o posiciones específicas o aminoácidos del mismo.

[0260] El anticuerpo IgG2 anti-P-selectina humanizado que carece de función efectora llamado hSel001 (anticuerpo humanizado de unión a la P-selectina que comprende CDRs de anticuerpo G1 de ratón injertadas dentro de regiones marco humanas como previamente se caracterizó en la Publicación No. WO 2008/069999) también se tamizó con el método de tamizaje aquí descrito. Un resumen de los datos (Tabla 1) muestra que el anticuerpo hSel001 se ligó a las mismas quimeras (SEQ ID NO:1 y 20) que el anticuerpo G1. La unión del hSel001 fue específica del epítipo conformacional aquí descrito situado dentro del cúmulo A. Los resultados mostraron que el anticuerpo hSel001 posee propiedades de doble función que le permiten tanto bloquear la unión de la P-selectina a PSGL-1 (Fig. 3) como disociar complejos preformados P-selectina/PSGL-1 (Fig. 4). Por tal razón, hSel001 es otro anticuerpo opcionalmente abarcado por los conceptos inventivos que aquí se revelan y se puede usar para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias y trombóticas aquí descritas y que se caracterizan porque se bloquea la unión de la P-selectina a PSGL-1 y se promueve la disociación del complejo preformado P-selectina/PSGL-1.

[0261] *Ensayos de rodamiento in vitro basados en células bajo flujo con neutrófilos humanos*

[0262] Para evaluar más a fondo las propiedades bloqueadoras y disociativas de los anticuerpos G1, G4 y hSel001, se llevaron a cabo ensayos de rodamiento *in vitro* basados en células con neutrófilos humanos recién aislados que se introdujeron bajo un flujo de $1,0 \text{ dyn/cm}^2$ en una cámara de flujo recubierta con niveles bajos y altos de P-selectina de membrana. La P-selectina de baja densidad se recubrió a $0,25 \mu\text{g/mL}$ y la P-selectina de alta densidad se recubrió a $2 \mu\text{g/mL}$. Las densidades del sitio se determinaron usando mAb G1 marcados con ^{125}I para ser 50 sitios/ mm^2 (baja) y 380 sitios/ mm^2 (alta). Sobre la P-selectina de baja densidad los neutrófilos rodaron a una velocidad promedio bien sea de $5 \mu\text{m/s}$ o $6,5 \mu\text{m/s}$. Sobre la P-selectina de alta densidad los neutrófilos rodaron a una velocidad promedio de $1 \mu\text{m/s}$. Los neutrófilos se introducen en amortiguador bajo flujo y se les permite comenzar a rodar y atarse. Una vez equilibrados, los anticuerpos de prueba (G1, G3, G4 y hSel001) se introdujeron en amortiguador libre de células bajo flujo. Existe un volumen muerto de cerca de un intervalo de 1 minuto antes de que el anticuerpo alcance la cámara. A intervalos de 1 minuto en lo sucesivo, las células que permanecían ligadas se contaron y expresaron como % de células ligadas. Los resultados se registraron en video microscopia durante aproximadamente 0-20

5

minutos y los datos se analizaron después de la corrida.

[0263] Los resultados en los paneles (A) y (C) de la Figura 6 muestran que los neutrófilos rodaron a velocidad más alta sobre la P-selectina de baja densidad. Así como el complejo P-selectina/PSGL-1 se liberó debido a cinética normal encendido/apagado de la unión lectina/ligando, los neutrófilos recorrieron mayores distancias a más alta velocidad hasta la siguiente sitio de unión de la P-selectina. A medida que el complejo se libera, la P-selectina previamente ocupada se torna disponible para la unión por anticuerpos anti-P selectina. Así pues, los cuatro anticuerpos, G1, G3, G4 y hSel001, mostraron funcionalidad equivalente de bloqueo en el curso de 1-4 minutos.

[0264] Los resultados de los paneles (B) y (D) de la Figura 6 sobre la P-selectina de alta densidad mostraron que los neutrófilos ruedan mucho más despacio ($1 \mu\text{m/s}$) porque un mayor número de sitios de unión de la P-selectina está disponible. Muchos neutrófilos llegan a detener su rodamiento sobre la P-selectina a esta densidad. En estas condiciones los anticuerpos murinos G1 y G4 y el anticuerpo humanizado hSel001 fueron capaces de liberar neutrófilos rodantes y atados al disociar el complejo P-selectina/PSGL-1 inmediatamente y en el curso de 1-8 minutos. En contraposición, el anticuerpo G3 anti-P-selectina requirió hasta 16-20 minutos para bloquear el rodamiento de los neutrófilos. Esto indicó que el anticuerpo G3 solo fue capaz de ligar sitios no ocupados de P-selectina y así bloquear complejos P-selectina/PSGL-1, pero no fue capaz de ligar y disociar el complejo preformado. Estos ensayos de unión celular bajo flujo confirman los resultados de BIACORE previamente informados aquí que demuestran que los anticuerpos murinos G1 y G4 y el anticuerpo humanizado hSel001 tienen propiedades de doble función que causan tanto el bloqueo como a disociación de los complejos preformados P-selectina/PSGL-1.

[0265] *hSel001 tiene una intensificación de la unión frente al anticuerpo G1 de ratón*

[0266] Las afinidades de unión a la P-selectina de G1 y hSel001 se analizaron *in vitro* y se compararon usando resonancia de plasmones de superficie (Biacore). La P-selectina humana soluble se enlazó de forma covalente a un chip Biacore CM5 y el anticuerpo G1 de ratón y el anticuerpo humanizado hSel001 se examinaron independientemente mediante introducción al chip.

[0267] Con el fin de valorar más a fondo la interacción de los anticuerpos anti-P selectina con la P-selectina (antígeno) se llevó a cabo un análisis cinético usando resonancia de plasmones de superficie (SensiQ). El anticuerpo monoclonal de ratón anti-P-selectina G1 y el anticuerpo humanizado hSel001 se analizaron por resonancia de plasmones de superficie sobre SensiQ. Para analizar la cinética de unión de estos dos anticuerpos, el chip sensor se funcionalizó enlazando de forma covalente la proteína recombinante G. El anticuerpo G1 de ratón se introdujo y capturó sobre el chip inyectando una solución 20nM durante 1 minuto. El anticuerpo humanizado hSel001 se introdujo y capturó sobre un canal separado funcionalizado de forma similar inyectando una solución 10nM durante 1 minuto. Se introdujeron concentraciones de P-selectina humana soluble (100nM-1,56nM) y la unión se midió como unidades de respuesta (RU). Los datos de unión de cada uno se analizaron usando software de análisis Qdat.

[0268] La Figura 7 muestra los resultados de unión de ambos anticuerpos a una única concentración de P-selectina.

[0269] Con base en estos resultados se midió la K_d (constante de disociación) de hSel001 en 5,89nM comparada con una K_d de 8,94nM para el anticuerpo G1 de ratón (Tabla 2). Esto representa una mejora de 34% en la afinidad de unión del anticuerpo humanizado anti-P-selectina hSel001 en

56

comparación con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-P-selectina G1. Además la K_a (constante de asociación) para hSel001 fue más alta en 64,7% que para G1, lo cual significa que hSel001 se une más rápido a la P-selectina. Estos resultados indican que el anticuerpo humanizado hSel001 tiene una mejora de la K_d (afinidad) y la K_a (velocidad de unión inicial) frente a G1.

Table 2 – Kinetic Constants para P-Selectina				
Antibody	k_a ($\times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d ($\times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$)	KD (nM)	Res. SD (RU)
G1	6.3 $\pm$ 2	5.6 $\pm$ 2	8.94 $\pm$ 3	3.39
hSel001	2.22 $\pm$ 1	1.306 $\pm$ 6	5.89 $\pm$ 2	4.48

[0270] Los anticuerpos de los conceptos inventivos que aquí se revelan proporcionados por cualquiera de los métodos arriba descritos se usan de preferencia en la manufactura de una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de una patología, que se caracteriza porque dicho tratamiento comprende administrar la composición farmacéutica para mitigar, revertir o inhibir una respuesta inflamatoria o trombosis u otra patología.

[0271] Un importante objetivo de los conceptos inventivos que aquí se revelan es usar los anticuerpos o fragmentos o variantes funcionalmente activos de los anticuerpos mencionados para la manufactura de una composición farmacéutica y su uso en la prevención y/o tratamiento de respuestas inflamatorias o enfermedades o trombosis como, pero sin limitaciones, las aquí descritas.

[0272] Por ejemplo, los conceptos inventivos que aquí se revelan en particular están dirigidos a, pero sin limitaciones, usar tales anticuerpos de doble función anti-P selectina o fragmentos de anticuerpo tal como están descritos e identificados aquí en el tratamiento de patologías o trastornos inflamatorios, trombóticos u otros en primates (incluidos los seres humanos) los cuales involucran la adhesión de plaquetas, eritrocitos falciformes, leucocitos, linfocitos y/o células endoteliales, que se caracteriza porque la patología o trastorno comprende o está asociada con (pero sin limitaciones) al menos uno de entre crisis de dolor vasooclusivo por células falciformes, enfermedad intestinal inflamatoria (p.ej., enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enteritis), artritis (p.ej., artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica), rechazo de injerto, enfermedad injerto contra huésped, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, psoriasis, dermatitis, sepsis, nefritis, lupus eritematoso, escleroderma, rinitis, anafilaxia, diabetes, esclerosis múltiple, aterosclerosis, trombosis, metástasis tumorales, reacciones alérgicas, tiroiditis, lesión isquémica por reperfusión (p.ej., debida a infarto de miocardio, ACV o trasplante de órganos) y patologías asociadas con traumatismos extensos o inflamación crónica, como por ejemplo, hipersensibilidad retardada de tipo IV, asociada por ejemplo con infección por bacilos tuberculosos o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o falla multisistémica. El término “primate” tal como se usa en este contexto se refiere a seres humanos, monos, incluidos babuinos y monos cangrejeros y simios, estos últimos incluidos chimpancés, gorilas, gibones y orangutanes, por ejemplo. Otras patologías no enumeradas aquí pero que se relacionan con problemas inflamatorios o trombóticos o revelaciones también se pueden tratar usando los anticuerpos y composiciones aquí descritos.

[0273] En la composición farmacéutica de un medicamento de acuerdo con los conceptos inventivos que aquí se revelan, los anticuerpos se pueden formular por cualquiera de los métodos establecidos de formulación de composiciones farmacéuticas como, p.ej., los descritos en la última

edición de Pharmaceutical Sciences de Remington o los descritos en otra parte de este documento. La composición típicamente puede estar en una forma adecuada para inyección o infusión local o sistémica y puede, en este sentido, formularse con agua estéril o una solución isotónica salina o de glucosa. Las composiciones se pueden esterilizar por técnicas convencionales de esterilización, bien conocidas del estado de la técnica. Las soluciones acuosas resultantes pueden ser empacadas para usar o filtradas en condiciones asépticas y liofilizadas, combinando la preparación liofilizada con la solución acuosa estéril antes de su administración. La composición pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, como agentes amortiguadores, agentes de ajuste de tonicidad y similares como, por ejemplo acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc. La concentración de proteínas puede variar ampliamente como, por ejemplo, de menos de cerca de 0,01% hasta tanto como 15-20% o más por peso. Una unidad de dosificación de la composición puede contener por ejemplo de cerca de 1 μg a cerca de 1000 mg de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

[0274] Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de los conceptos inventivos que aquí se revelan se pueden administrar tópicamente o en inyección. Las dosificaciones son prescritas por el médico de acuerdo con la patología particular y el individuo particular que se va a tratar. Las dosificaciones y la frecuencia se adaptan y ajustan con cuidado de acuerdo con parámetros determinados por el médico a cargo. Las vías preferidas de administración pueden ser oral, inhalada, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratraqueal, intravesical o intraperitoneal y se pueden dar durante 24 a 48 horas o por semana, cada 14 días, cada 4 semanas por ejemplo en el intervalo de 0,01-1000 mg, especialmente 0,1 mg a 100 mg, en particular 1-10 mg por kg de peso corporal. Las dosis se pueden administrar de forma continua a través de un catéter o en bolos individuales. El anticuerpo de la invención se puede administrar en una cantidad eficaz como, pero sin limitaciones, los intervalos entre 1 ng/kg a 1 $\mu\text{g/kg}$, 0,01 $\mu\text{g/kg}$ a 50 $\mu\text{g/kg}$, 0,1 $\mu\text{g/kg}$ a 1 $\mu\text{g/kg}$, 1 $\mu\text{g/kg}$ a 5 $\mu\text{g/kg}$, 5 $\mu\text{g/kg}$ a 10 $\mu\text{g/kg}$, 10 $\mu\text{g/kg}$ a 50 $\mu\text{g/kg}$, 50 $\mu\text{g/kg}$ a 100 $\mu\text{g/kg}$, 100 mg/kg a 1 mg/kg, 1 mg/kg a 10 mg/kg o 10 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal.

[0275] Las composiciones farmacéuticas que se usan en los conceptos inventivos que aquí se revelan que comprenden los anticuerpos aquí descritos además se pueden complementar con otros compuestos terapéuticos habitualmente prescritos por el médico de acuerdo con la patología en particular y el individuo en particular que se van a tratar como un medicamento antiinflamatorio, que se caracteriza porque esos medicamentos son prescritos por el médico de acuerdo con la patología en particular y el individuo en particular que se van a tratar.

[0276] Como se anotó en otra parte de este documento, el fenómeno de la unión P-selectina/PSGL-1 tiene importancia funcional en las interacciones de los eritrocitos falciformes, células endoteliales, leucocitos y plaquetas, y/o adhesión de microvesículas, rodamiento, reclutamiento, agregación de los leucocitos; secreción de citocinas por los leucocitos; promoción de la coagulación; y otros aspectos de inflamación, trombosis, coagulación, respuesta inmunitaria y transducción de señales incluidas, pero sin limitaciones, crisis de dolor vasooclusivo por células falciformes, enfermedad intestinal inflamatoria (p.ej., enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enteritis), artritis (p.ej., artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica), rechazo de injerto, enfermedad injerto contra huésped, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, psoriasis,

15

dermatitis, sepsis, nefritis, lupus eritematoso, escleroderma, rinitis, anafilaxia, diabetes, esclerosis múltiple, aterosclerosis, trombosis, metástasis tumorales, reacciones alérgicas, tiroiditis, lesión isquémica por reperfusión (p.ej., debida a infarto de miocardio, ACV o trasplante de órganos) y patologías asociadas con traumatismos extensos o inflamación crónica, como por ejemplo, hipersensibilidad retardada de tipo IV, asociada por ejemplo con infección por bacilos tuberculosos o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o falla multisistémica. Un anticuerpo neutralizador (o fragmento de los mismos) contra la P-selectina como el aquí descrito inhibirá una o más de estas actividades en un paciente como mediada a través de la unión P-selectina/receptor PSGL-1 (o en el caso de los eritrocitos falciformes, unión P-selectina/receptor similar al PSGL-1), *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo. Así, la inhibición de la unión P-selectina/PSGL-1 por un anticuerpo neutralizador (o fragmento de los mismos) aquí descrito es útil en el tratamiento de un paciente que padece varias condiciones y trastornos que incluyen, pero sin limitaciones, los aquí descritos.

[0277] Los anticuerpos específicos contra P-selectina o fragmentos de unión aquí descritos vincularse a otra molécula. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden vincular a otro péptido o proteína, toxina, radioisótopo, agentes citotóxicos o citostáticos. Los anticuerpos pueden vincularse con enlaces covalentes o por enlaces cruzados químicos o por métodos recombinantes. Los anticuerpos también pueden vincularse a uno de entre una variedad de polímeros no proteínicos, p.ej., polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, en la forma estipulada en las patentes estadounidenses Nos. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192; o 4.179.337. Los anticuerpos pueden modificarse químicamente por conjugación covalente a un polímero, por ejemplo, para aumentar su estabilidad o vida media. Los polímeros y métodos ejemplares para fijarlos también se muestran en las patentes estadounidenses Nos. 4.766.106; 4.179.337; 4.495.285; y 4.609.546.

[0278] Los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) también pueden ser etiquetados con un rótulo detectable. Un rótulo detectable es una molécula que, por su naturaleza química, proporciona una señal analíticamente identificable que permite la detección de una interacción molecular. Una proteína, incluido un anticuerpo, tiene un rótulo detectable si está ligada de forma covalente o no covalente ligado a una molécula que puede ser detectada directamente (p.ej., por medio de un cromóforo, fluoróforo o radioisótopo) o indirectamente (p.ej., catalizando una reacción que arroja un producto coloreado, luminescente o fluorescente). Los rótulos detectables incluyen un radiomarcador como ^{131}I o ^{99}Tc , un metal pesado o un sustrato fluorescente, como Europio, por ejemplo, los cuales también se pueden fijar a los anticuerpos usando química convencional. Los rótulos detectables también incluyen rótulos enzimáticos como peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina. Los rótulos detectables además incluyen grupos funcionales químicos como la biotina, los cuales pueden ser detectados mediante la unión a un grupo funcional cognato específico detectable, p.ej., avidina marcada.

[0279] Los conceptos inventivos que aquí se revelan también van dirigidos a un método de tamizaje para anticuerpos anti-P selectina y fragmentos de unión de los mismos los cuales bloquean tanto la unión P-selectina/PSGL-1 y/o los cuales causan disociación de los complejos preformados P-selectina/PSGL-1.

[0280] Como se anotó arriba, los conceptos inventivos que aquí se revelan están dirigidos a anticuerpos contra P-selectina, células huésped que producen tales anticuerpos anti-P selectina, vectores que contienen ADN que codifica la expresión de ese anticuerpo anti-P-selectina y métodos

61

de tamizaje para identificar anticuerpos anti-P selectina los cuales bloquean la unión P-selectina/PSGL-1 y en otra modalidad has una "doble función" de causar también la disociación del complejo preformado P-selectina/PSGL-1. Así las cosas, en una modalidad los conceptos inventivos que aquí se revelan están dirigidos a un método para identificar anticuerpos anti-P selectina que específicamente se unen a un epítipo conformacional en los aminoácidos 1-35 y más de preferencia en los aminoácidos 4-23 de la P-selectina humana (SEQ ID NO:1) (como el epítipo conformacional aquí descrito) y los cuales bloquean PSGL-1 o miméticos de los mismos, de la unión a la P-selectina y que pueden revertir dicha unión, mostrando así una doble función en el bloqueo de la adhesión mediada por la selectina debida a la unión P-selectina/PSGL-1 y en la disociación de los complejos preformados P-selectina/PSGL-1.

[0281] El método de tamizaje en las modalidades preferidas comprende ensayos *in vitro* basados en fluido y/o basados en sustrato que se pueden usar para identificar anticuerpos anti-P selectina o fragmentos de los mismos que inhiben o anulan la unión P-selectina/PSGL-1 y de preferencia también causan la disociación de los complejos preformados P-selectina/PSGL-1. Los anticuerpos de prueba se pueden tamizar para verificar si tienen la capacidad de doble función con una serie de ensayos como, pero sin limitaciones, los aquí descritos que identificarán aquellos anticuerpos que se unen a un epítipo conformacional dentro de los aminoácidos 1-35 y más en particular dentro de los aminoácidos 4-23 de la P-selectina y que bloquean la unión del ligando PSGL-1 a la P-selectina y que de preferencia causan la disociación de los complejos preformados P-selectina/PSGL-1. Hasta el presente no se había demostrado que los anticuerpos anti-P selectina tuvieran la capacidad tanto de bloquear la unión de PSGL-1 a P-selectina como de causar la disociación de os complejos preformados P-selectina/PSGL-1. Cuando se usa aquí, el término "anticuerpo de prueba" se refiere a anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpos. El anticuerpo de prueba puede ser un miembro de una biblioteca (p.ej. fago, levadura o bacteria) o un fragmento de anticuerpo en una biblioteca. La biblioteca podría sustraerse eliminando todos los miembros que ligan epítopes no deseados.

[0282] En una primera etapa del método de tamizaje, por ejemplo, los anticuerpos de prueba generados contra la P-selectina se examinan para determinar su capacidad de bloquear la unión de PSGL-1 a P-selectina. Los anticuerpos de prueba que bloquean la unión de PSGL-1 a P-selectina se tamizan para determinar su capacidad de causar la disociación de los complejos preformados P-selectina/PSGL-1. Los anticuerpos de prueba identificados como dotados de doble función de bloqueo tanto de la unión de PSGL-1 a P-selectina como de disociación del complejo P-selectina/PSGL-1 comprenden en particular modalidades preferidas de los conceptos inventivos que aquí se revelan y se pueden usar en los métodos de los conceptos inventivos que aquí se revelan. Algunos ejemplos de modalidades de los ensayos basadas en fluidos incluyen, pero sin limitaciones, (1) ensayos FACS basados en células con leucocitos o HL60/plaquetas activadas que miden agregados celulares que han o no han sido expuestos a un anticuerpo capaz de ligar una P-selectina (p.ej., hSel001) o a un anticuerpo de prueba para demostrar la disociación del complejo PSGL-1/P-selectina, (2) un ensayo a base de líquido con base en un complejo P-selectina/GSP-6-estreptavidina-biotina que ha sido o no expuesto a un anticuerpo capaz de ligar una P-selectina (p.ej., hSel001) o a un anticuerpo de prueba y medido con SEC (cromatografía de exclusión de tamaño) y (3) uso de una perla AlphaLisa como sustrato pero usada en un ensayo a base de líquido.

2
6

[0283] En una modalidad del método, los anticuerpos de prueba que bloquean la unión de PSGL-1 a P-selectina se identifican primero usando un ensayo de tamizaje. Por ejemplo, en una modalidad preferida del ensayo de tamizaje, se proporciona el PSGL-1 o un mimético sintético de PSGL-1 como GSP-6 o una porción epítipo terminal de PSGL-1 capaz de ligar una P-selectina (opcionalmente ligado a un sustrato de soporte como un chip BIACORE), en un método conocido de las personas medianamente versadas en el estado de la técnica. El PSGL-1 (o el mimético de PSGL-1) (los cuales pueden estar ligados al sustrato) se expone entonces a un complejo anticuerpo anti-P-selectina de prueba/P-selectina. Entonces se evalúa el grado de unión del complejo al sustrato PSGL-1. Si el complejo anticuerpo de prueba/P-selectina no se liga al PSGL-1, el anticuerpo de prueba se identifica como un anticuerpo de "bloqueo de función". El GSP-6 o mimético de PSGL-1, en una modalidad, está ligado a biotina. El complejo GSP-6/mimético-biotina mismo puede estar ligado a un recubrimiento de estreptavidina sobre el sustrato, por ejemplo.

[0284] En otra modalidad del ensayo de tamizaje se proporciona una P-selectina o una porción de la misma que mantiene la integridad del epítipo conformacional e, igual que arriba, opcionalmente está ligada al sustrato de soporte. Por ejemplo, una porción de P-selectina que mantiene el epítipo conformacional incluye, pero sin limitaciones, la secuencia que comprende los dominios de unión de lectina y EGF de la P-selectina (p.ej., aminoácidos 1-153 de la SEQ ID NO:1). En esta modalidad, la P-selectina o porción de la misma con el epítipo conformacional se expone al anticuerpo de prueba, el cual se une para formar el complejo P-selectina-anticuerpo. Entonces un PSGL-1 o un mimético del mismo de alto peso molecular como un complejo GSP-6/biotina/avidina, se expone al complejo P-selectina/anticuerpo de prueba y se evalúa el grado de unión al mismo del PSGL-1 (o el mimético). Un anticuerpo que previene o inhibe la unión de PSGL-1 al complejo P-selectina/anticuerpo se identifica como un anticuerpo de "bloqueo de función".

[0285] En otra modalidad del ensayo de tamizaje, bien sea PSGL-1 o un mimético del mismo es ligado, como se describió arriba, a un sustrato de soporte (como una perla o chip BIACORE). Entonces se aplica la P-selectina al PSGL-1/sustrato para formar el complejo P-selectina/PSGL-1 (o mimético). Entonces se aplica el anticuerpo de prueba y se mide la disociación del complejo como una reducción de la masa o como Unidades de respuesta (RU) dado que la P-selectina se está disociando. Un anticuerpo de bloqueo de función anti-P-selectina, que induce la disociación del complejo P-selectina/PSGL-1, se designa como un anticuerpo anti-P-selectina de doble función.

[0286] En una modalidad alterna de este ensayo de tamizaje, la P-selectina o una porción de P-selectina que comprende un epítipo conformacional se puede ligar a un sustrato de soporte en vez de al PSGL-1. El PSGL-1 o un mimético de alto peso molecular del mismo como un complejo GSP-6/biotina/avidina se expone entonces a la P-selectina sobre el sustrato de soporte y se le permite formar un complejo PSGL-1/P-selectina. El complejo PSGL-1/P-selectina se expone entonces a un anticuerpo de bloqueo de función anti-P-selectina y la disociación del complejo se evalúa, por ejemplo usando un método BIACORE como el descrito en otra parte de este documento.

[0287] Todavía en otra modalidad del ensayo, el anticuerpo anti-P-selectina mismo está ligado al sustrato de soporte y un complejo P-selectina/PSGL-1 se expone a él y la disociación se mide como se explicó arriba.

[0288] Aunque los conceptos inventivos que aquí se revelan y las ventajas de los mismos han sido descritos en detalle, debe entenderse que se pueden hacer varios cambios, sustituciones y

63

alteraciones sin apartarse del espíritu y el alcance de los conceptos inventivos que aquí se revelan. Más aún, el alcance de la presente solicitud no tiene por objeto limitarse a las modalidades particulares del proceso, artículos de manufactura, composiciones de materia, medios, métodos y etapas descritos en la especificación. Como lo apreciará fácilmente la persona medianamente versada en la técnica a partir de la presente revelación, los procesos, artículos de manufactura, composiciones de materia, medios, métodos o etapas, que existen en el presente o que se desarrollen en el futuro que cumplan sustancialmente la misma función o alcancen sustancialmente el mismo resultado que las modalidades correspondientes aquí descritas se pueden utilizar de acuerdo con los conceptos inventivos que aquí se revelan. Según esto, la invención aquí descrita tiene por objeto incluir dentro de su alcance esos procesos, artículos de manufactura, composiciones de materia, medios, métodos o etapas.

[0289] Cada una de las referencias, patentes o publicaciones que aquí se citan, incluidos, pero sin limitaciones, los Nos. de serie estadounidenses 12/974.539; 12/974.739; 12/516.987; y WO 2008/069999, se incorporan expresamente a la presente mediante referencia en su integridad.

[0290] Referencias citadas

- [0291]** 1. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 1994. 76:301–314. PubMed: 7507411.
- [0292]** 2. McEver RP, Moore KL, Cummings RD. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem.*, 1995. 12;270(19):11025-8. Review. PMID: 7538108.
- [0293]** 3. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Adhesion and signaling in vascular cell--cell interactions. *J Clin Invest.*, 1996. 15;98(8):1699-702. No abstract available. PMID: 8878418.
- [0294]** 4. Frenette PS. Sick cell vasoocclusion: heterotypic, multicellular aggregations driven by leukocyte adhesion. *Microcirculation*, 2004. 11(2):167-77. Review. PMID: 15280090.
- [0295]** 5. Weyrich AS, Ma XY, Lefer DJ, Albertine KH, Lefer AM. In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest.*, 1993. 91(6):2620-9. PMID: 7685773.
- [0296]** 6. Lefer DJ. Pharmacology of selectin inhibitors in ischemia/reperfusion states. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 2000. 40:283-94. Review. PMID: 10836137.
- [0297]** 7. Singbartl K, Green SA, Ley K. Blocking P-selectin protects from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure. *FASEB J.*, 2000. 14(1):48-54. PMID: 10627279.
- [0298]** 8. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature*, 1992. 29;359(6398):848-51. PMID: 1279433.
- [0299]** 9. Burger PC, Wagner DD. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood*, 2003. 1;101(7):2661-6. Epub 2002 Dec 12. PMID: 12480714.
- [0300]** 10. Théorêt JF, Bienvenu JG, Kumar A, Merhi Y. P-selectin antagonism with recombinant p-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL-Ig) inhibits circulating activated platelet binding to neutrophils induced by damaged arterial surfaces. *J Pharmacol Exp Ther.*, 2001. 298(2):658-64. PMID: 11454928.
- [0301]** 11. Kumar A, Villani MP, Patel UK, Keith JC Jr, Schaub RG. Recombinant soluble form of PSGL-1 accelerates thrombolysis and prevents reocclusion in a porcine model. *Circulation*, 1999. 16;99(10):1363-9. PMID: 10077522.
- [0302]** 12. Romano SJ. Selectin antagonists: therapeutic potential in asthma and COPD. *Treat Respir Med.*, 2005. 4(2):85-94. Review. PMID: 15813660.
- [0303]** 13. Grober JS, Bowen BL, Ebling H, Athey B, Thompson CB, Fox DA, Stoolman LM. Monocyte-endothelial adhesion in chronic rheumatoid arthritis. In situ detection of selectin and integrin-dependent interactions. *J Clin Invest.*, 1993. 91(6):2609-19. PMID: 7685772.
- [0304]** 14. Friedrich M, Bock D, Philipp S, Ludwig N, Sabat R, Wolk K, Schroeter-Maas S, Aydt E, Kang S, Dam TN, Zahlten R, Sterry W, Wolff G. Pan-selectin antagonism improves psoriasis manifestation in mice and man. *Arch Dermatol Res.*, 2006. 297(8):345-51. Epub 2005 Dec 16. PMID: 16362415.
- [0305]** 15. Johnson BA, Haines GK, Harlow LA, Koch AE. Adhesion molecule expression in human synovial tissue. *Arthritis Rheum*, 1993. 36(2):137-46. PMID: 7679271.
- [0306]** 16. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest.*, 1993. 91(2):379-87. Review. PMID: 7679406.

- 63
- [0307]** 17. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest.*, 1989. 84(1):92-9. PMID: 2472431.
- [0308]** 18. Sickle cell disease: screening, diagnosis, management, and counseling in newborns and infants. Clinical Practice Guideline No. 6. AHCPR Pub. No. 93-0562. Rockville, MD: Agency for Health Care Policy and Research, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services. April 1993 [cited; Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=hstat6.chapter.16946.
- [0309]** 19. Nietert, PJ, Silverstein MD, Abboud MR. Sickle cell anaemia: epidemiology and cost of illness. *Pharmacoeconomics*, 2002. 20(6): p. 357-66. PMID: 12052095.
- [0310]** 20. Bookchin, RM and Lew VL. Pathophysiology of sickle cell anemia. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1996. 10(6): p. 1241-53. PMID: 8956013.
- [0311]** 21. NHLBI. [cited; Available from: www.nhlbi.nih.gov/health/dci/Diseases/Sca/SCA_WhatIs.html.
- [0312]** 22. NHLBI, The Management of Sickle Cell Disease. NIH Publication No.022117.
- [0313]** 23. FDA Approves Droxia for Sickle Cell Anemia, in FDA Talk Paper. 1998. p. T98-11.
- [0314]** 24. NIH, Hydroxurea Treatment for Sickle Cell Disease February 25-27 2008. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement, February 27 2008.
- [0315]** 25. Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Grover R, Pegelow CH, Vichinsky E. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*, 1995. 86(2): p. 776-83. PMID: 7921116.
- [0316]** 26. Ashley-Koch A, Yang Q, and Olney RS. Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, 2000. 151(9): p. 839-45. PMID: 10797557.
- [0317]** 27. Thomas PW, Higgs DR, and Serjeant GR. Benign clinical course in homozygous sickle cell disease: a search for predictors. *J Clin Epidemiol*, 1997. Feb;50(2): p. 121-6. PMID: 9120504.
- [0318]** 28. National Newborn Screening Status Report Updated 03/04/08.
- [0319]** 29. Rice-Evans C, Omorphos SC, and Baysal E. Sickle cell membranes and oxidative damage. *Biochem J*, 1986. 237(1): p. 265-9. PMID: 3800879.
- [0320]** 30. Wethers, D.L., Sickle cell disease in childhood: Part II. Diagnosis and treatment of major complications and recent advances in treatment. *Am Fam Physician*. 2000 Sep 15;62(6):1309-14. PMID: 11011859.
- [0321]** 31. Gladwin MT, Sachev V, Jison ML, Shizukuda Y, Plehn JF, Minter K, Brown B, Coles WA, Nichols JS, Ernst I, Hunter LA, Blackwelder WC, Schechter AN, Rodgers GP, Castro O, Ognibene FP, Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med*, 2004. 350(9): p. 886-95. PMID: 14985486.
- [0322]** 32. Saborio P and Scheinman JI, Sickle cell nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 1999. 10(1): p. 187-92. PMID: 9890326.

- 66
- [0323]** 33. Charache S, Eye disease in sickling disorders. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1996. 10(6): p. 1357-62. PMID: 8956022.
- [0324]** 34. Kaul, DK, Liu XD, Fabry ME, Nagel RL. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in transgenic sickle mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. 278(6): p. H1799-806. PMID: 10843875.
- [0325]** 35. Nolan, VG, Adewoye A, Baldwin C, Wang L, Ma Q, Wyszynski DF, Farrell JJ, Sebastiani P, Parrer LA, Steinberg MH. Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF-beta/BMP pathway. *Br J Haematol*, 2006. 133(5): p. 570-8. PMID: 1661647.
- [0326]** 36. Nolan, VG, Wyszynski DF, Farrer LA, Steinberg MH. Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. *Blood*, 2005. 106(9): p. 3264-7. PMID: 15985542.
- [0327]** 37. Gladwin MT and Kato GJ. Cardiopulmonary complications of sickle cell disease: role of nitric oxide and hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2005: p. 51-7. PMID: 16304359.
- [0328]** 38. Yale, SH, Nagib N, and Guthrie T. Approach to the vaso-occlusive crisis in adults with sickle cell disease. *Am Fam Physician*, 2000. 61(5): p. 1349-56, 1363-4. PMID: 10735342.
- [0329]** 39. Heegaard, ED and Brown KE. Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev*, 2002. 15(3): p. 485-505. PMID: 12097253.
- [0330]** 40. Ballas, SK and Mohandas N. Pathophysiology of vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1996. 10(6): p. 1221-39. PMID: 8956012.
- [0331]** 41. Embury, SH. The not-so-simple process of sickle cell vasoocclusion. *Microcirculation*, 2004. 11(2): p. 101-13. PMID: 15280086.
- [0332]** 42. Conran N and Costa FF. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clin Biochem*, 2009. 42(18): p. 1824-38. PMID: 19580799.
- [0333]** 43. Chiang EY and Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2005. 19(5): p. 771-84, Review. PMID: 16214643.
- [0334]** 44. Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(5): p. 3047-51. PMID: 1180644.
- [0335]** 45. Hebbel RP, Osarogiagbon R, and Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation*, 2004. 11(2): p. 129-51. Review. PMID: 15280088.
- [0336]** 46. Okpala I, Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. *Curr Opin Hematol*, 2006. 13(1): p. 40-4. Review. PMID: 16319686.
- [0337]** 47. Matsui NM, Borsig L, Rosen SD, Yaghmai M, Varki A, Embury SH P-selectin mediates the adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. *Blood*, 2001. 98(6): p. 1955-62. PMID: 11535535.
- [0338]** 48. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, Klug PP. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*, 1994. 330(23): p. 1639-44. PMID: 7993409.

6X

- [0339]** 49. Smith JA. Bone disorders in sickle cell disease. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1996. 10(6): p. 1345-56. Review. PMID: 8956021.
- [0340]** 50. Platt OS. Prevention and management of stroke in sickle cell anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2006: p. 54-7. Review. PMID: 17124040.
- [0341]** 51. Maitre B, Habibi A, Roudot-Thoraval F, Bachir D, Belghiti DD, Galacteros F, Godeau B. Acute chest syndrome in adults with sickle cell disease. *Chest*, 2000. 117(5): p. 1386-92. PMID: 1087826.
- [0342]** 52. Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, Nickerson B, Orringer E, McKie V, Bellevue R, Daeschner C, Mancini EA. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. *N Engl J Med*, 2000. 342(25): p. 1855-65. PMID: 10861320.
- [0343]** 53. Serjeant GR, Ceulaer CD, Lethbridge R, Morris J, Singhal A, Thomas PW. The painful crisis of homozygous sickle cell disease: clinical features. *Br J Haematol*, 1994. 87(3): p. 586-91. PMID: 7993801.
- [0344]** 54. Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, Kinney TR. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med*, 1991. 325(1): p. 11-6. PMID: 1710777.
- [0345]** 55. Health Advances, LLC. Application of Selexys Technologies to Inflammatory and Thrombotic Diseases. In Private Study. 2004.
- [0346]** 56. McClish DK. Health related quality of life in sickle cell patients: the PiSCES project. *Health Qual Life Outcomes*, 2005. 3: p. 50. PMID: 16129027.
- [0347]** 57. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, McMahon RP, Bonds DR. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med*, 1995. 332(20): p. 1317-22. PMID: 7715639.
- [0348]** 58. Patient Information Leaflet: Droxia. Bristol-Myers Squibb Company, 2006.
- [0349]** 59. NIH. NIH State-of-the-Science Conference Statement on Hydroxyurea Treatment for Sickle Cell Disease. NIH Consensus and State-of -the Science Statements; February 27-29, 2008. 25(1):1-30. PMID: 18309362.
- [0350]** 60. Hydroxyurea for the Treatment of Sickle Cell Disease, Agency for Healthcare Research and Quality; AHRQ Publication No. 08-E007. Feb. 2008.
- [0351]** 61. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, Koopmeiners L, Key NS, Hebbel RP. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*, 2003. 102(7): p. 2678-83. PMID: 12805058.
- [0352]** 62. Solovey A, Gui L, Key NS, Hebbel RP. Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. *J Clin Invest*, 1998. 101(9): p. 1899-904. PMID: 9576754.
- [0353]** 63. Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med*, 1997. 337(22): p. 1584-90. PMID: 9371854.

- 68
- [0354]** 64. Kaul DK and Hebbel RP. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest*, 2000. 106(3): p. 411-20. PMID: 10930444.
- [0355]** 65. Matsumoto S, Okabe Y, Setoyama H, Takayama K, Ohtsuka J, Funahashi H, Imaoka A, Okada Y, and Umesaki Y. Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. *Gut*, 1998. 43:71-78. PMID: 9771408.
- [0356]** 66. Kosiewicz MM, Nast CC, Krishnan A, Rivera-Nieves J, Moskaluk CA, Matsumoto S, Kozaiwa K, and Cominelli F. Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease. *J. Clin. Invest.*, 2001 107:695-702. PMID: 11254669.
- [0357]** 67. Rivera-Nieves J, Burcin TL, Olson TS, Morris MA, McDuffie M, Cominelli R and Ley K. Critical role of endothelial P-selectin glycoprotein ligand 1 in chronic murine ileitis. *JEM*, 2006. 203 (4): 907-917. PMID: 16567389.
- [0358]** 68. Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DF, Cummings RD, Varki A, McEver RP. Identification of a specific glycoprotein ligand for P- selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol*, 1992;118:445-456. PMID: 1378449.
- [0359]** 69. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest*, 1997;100:S97-103. PMID: 9413410.
- [0360]** 70. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*, 1996;88:3259-3287. PMID: 8896391.
- [0361]** 71. Somers WS, Tang J, Shaw GD, Camphausen RT. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell*, 2000. Oct 27;103(3):467-79. Erratum in: *Cell*, 2001. Jun 29;105(7):971. PMID: 11081633.
- [0362]** 72. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell*, 1993. Aug 13;74(3):541-54. PMID: 7688665.
- [0363]** 73. Xia L, Sperandio M, Yago T, McDaniel JM, Cummings RD, Pearson-White S, Ley K, McEver RP. P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow. *J Clin Invest*, 2002. 109:939-950. PMID: 11927621.
- [0364]** 74. Yang J, Hirata T, Croce K, Merrill-Skoloff G, Tchernychev B, Williams E, Flaumenhaft R, Furie BC, Furie B. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J Exp Med*, 1999. Dec 20;190 (12):1769-82. PMID: 10601352
- [0365]** 75. Walcheck B, Moore KL, McEver RP, and Kishimoto TK. Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation on P-selectin in vitro. *J. Clin. Invest.*, 1996. 98:1081-1087. PMID: 8787668.
- [0366]** 76. Bargatze RF, Kurk S, Butcher EC, Jutila MA. Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J Exp Med.*, 1994. Nov 1;180(5):1785-92. PMID: 7525838.
- [0367]** 77. Jung U and Ley K. Mice Lacking Two or All Three Selectins Demonstrate

Overlapping and Distinct Functions for Each Selectin. J. Immunol., 1999. 162: 6755-6762. PMID: 10352295.

[0368] 78. Antibody Engineering, 2nd edition., Borrebaeck CA, Ed., Oxford University Press (1995).

[0369] 79. Sambrook J and Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

[0370] 80. Bodansky M and Bodansky A. The Practice of Peptide Synthesis, 2nd edition., Springer-Verlag, Berlin. 1995.

[0371] 81. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol., 1990. 215:403-410 PMID: 2231712.

[0372] 82. Needleman SB, Wunsch CD. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J. Mol. Biol., 1970. 48(3):444-453 PMID: 5420325.

[0373] 83. Meyers EW and Miller W. Optimal alignments in linear space. Comput. Appl. Biosci., 1988. 4(1):11-17. PMID: 3382986.

[0374] 84. Tatusova TA and Madden TL. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. FEMS Microbiol. Lett., 1999. 174(2):247-250. PMID: 10339815.

[0375] 85. Kohler G and Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 1975. 256(5517): 495-7. PMID: 1172191.

[0376] 86. Ausubel FM. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989).

[0377] 87. Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R. Biochemical transfer of single-copy eukaryotic genes using total cellular DNA as donor. Cell, 1978. 14(3):725-31. PMID: 210957.

[0378] 88. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. EMBO, 1982. J. 1(7):841-5. PMID: 6329708.

[0379] 89. Harlow E and Lane D. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1988.

[0380] 90. Geng JG, Moore KL, Johnson AE, McEver RP. Neutrophil recognition requires a Ca²⁺-induced conformational change in the lectin domain of GMP-140. J. Biol. Chem., 1991. 266(33): 22313-22318. PMID: 1718992.

[0381] 91. Mehta P, Patel KD, Laue TM, Erickson HP, McEver RP. Soluble monomeric P-selectin containing only the lectin and epidermal growth factor domains binds to P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocytes. Blood, 1997. Sep. 15; 90(6): 2381-9. PMID: 9310489.

[0382] 92. Hirose M, Kawashima H, Miyasaka M. A functional epitope on P-selectin that supports binding of P-selectin to P-selectin glycoprotein ligand-1 but not to sialyl Lewis X oligosaccharides. Int. Immunol., 1998. May; 10(5): 639-49. PMID: 9645612.

[0383] 93. Ruchaud-Sparangano MH, Malaud E, Gayet O, Chignier E, Buckland R, McGregor JL. Mapping the epitope of a functional P-selectin monoclonal antibody (LYP20) to a short complement-like repeat (SCR 4) domain: use of human-mouse chimera and homologue-replacement mutagenesis. Biochem. J., 1998. 1;332(Pt2):309-14. PMID: 9601057.

[0384] 94. Chestnut, RW, Polley, MJ, Paulson, JC, Hones, T, Saldanha, JW, Bendig, MM,

10

Kriegler, M. Perez, C, Bayer, R Nunn, M. Antibodies to P-selectin and Their Uses. US Patent No. 5,800,815. Sep. 1, 1998.

[0385] 95. Berg EL, Fromm C, Melrose J, Tsurushita N. Antibodies cross-reactive with E- and P-selectin block both E- and P-selectin functions. Blood, 1995. Jan 1;85(1):31-7. PMID: 7528571.

[0386] 96. Leppanen A, Mehta P, Ouyang YB, Ju T, Helin J, Moore KL, van Die I, Canfield WM, McEver RP, Cummings RD. 1999. A novel glycosulfopeptide binds to P-selectin and inhibits leukocyte adhesion to P-selectin. J Biol Chem Aug 27;274(35):24838-48. PMID: 10455156.

Lo que se reivindica es:

1. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión del mismo el cual específicamente se une a un epítoto conformacional de la P-selectina, que se caracteriza porque el epítoto conformacional está dentro de las posiciones de aminoácido 1-35 de la SEQ ID NO:1.
2. El anticuerpo o fragmento de unión aislado de la reivindicación 1, que se caracteriza porque el epítoto conformacional está dentro de los aminoácidos 4-23 de la SEQ ID NO:1.
3. El anticuerpo o fragmento de unión aislado de la reivindicación 2 que se caracteriza porque el epítoto conformacional comprende las posiciones de aminoácido 4, 14, 17, 21 y 22 de la SEQ ID NO:1.
4. El anticuerpo o fragmento de unión aislado de la reivindicación 3 que se caracteriza porque los aminoácidos en las posiciones de aminoácido 4, 14, 17, 21 y 22 son H, I, K, N y R, respectivamente.
5. El anticuerpo o fragmento de unión aislado de la reivindicación 4 que se caracteriza porque la unión se anula cuando una o más cualesquiera de las posiciones de aminoácido 4, 14, 17, 21 o 22 es sustituida con N, V, R o H, respectivamente.
6. El anticuerpo o fragmento de unión aislado de la reivindicación 1, que comprende la capacidad de bloquear la unión del ligando 1 de la glucoproteína P-selectina (PSGL-1) a la P-selectina.
7. El anticuerpo o fragmento de unión aislado de la reivindicación 1, que además comprende la capacidad de causar la disociación de un complejo preformado P-selectina-PSGL-1.
8. El anticuerpo o fragmento de unión aislado de la reivindicación 1, que comprende la capacidad de bloquear la función de P-selectina inhibiendo la unión de células endoteliales activadas a leucocitos, linfocitos, eritrocitos falciformes, y/o plaquetas.
9. El anticuerpo o fragmento de unión aislado de la reivindicación 1, que comprende la capacidad de bloquear la función de la P-selectina inhibiendo la unión de las plaquetas activadas a leucocitos, linfocitos, eritrocitos falciformes, y/o plaquetas.
10. El anticuerpo o fragmento de unión aislado de la reivindicación 1, que comprende la capacidad de causar la disociación de la unión célula-célula entre las células endoteliales activadas y leucocitos, linfocitos, eritrocitos falciformes, y/o plaquetas.
11. El anticuerpo o fragmento de unión aislado de la reivindicación 1, que comprende la capacidad de causar la disociación de la unión célula-célula entre las plaquetas activadas y leucocitos, linfocitos, eritrocitos falciformes, y/o plaquetas.
12. El anticuerpo o fragmento de unión aislado de la reivindicación 1, que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento del mismo es monoclonal.
13. El anticuerpo o fragmento de unión aislado de la reivindicación 1, que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento del mismo es quimérico, humano o humanizado.
14. El anticuerpo o fragmento de unión aislado de la reivindicación 1, que comprende una inmunoglobulina seleccionada de entre la clase compuesta por IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.
15. El anticuerpo o fragmento de unión aislado de la reivindicación 14 que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento de unión aislado del mismo es una IgG seleccionada de entre un isotipo compuesto por IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o una quimera IgG2/G4.

- 22
16. El fragmento de unión de la reivindicación 1, que comprende por lo menos uno de entre un fragmento Fab, Fab', F(ab)2 o scFv.
 17. El anticuerpo o fragmento de unión aislado de la reivindicación 1, el cual se une al epítipo conformacional con una $K_d \leq 1000$ nM, una $K_d \leq 500$ nM, una $K_d \leq 100$ nM, una $K_d \leq 50$ nM, una $K_d \leq 25$ nM, una $K_d \leq 10$ nM, una $K_d \leq 5$ nM, una $K_d \leq 1$ nM o una $K_d \leq 0,1$ nM.
 18. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, el cual es designado como el anticuerpo monoclonal derivado del hibridoma que tiene Designación ATCC No. PTA 12154 o un anticuerpo humanizado que comprende las CDRs del mencionado anticuerpo monoclonal.
 19. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión aislado de la reivindicación 1, dispuesto dentro de un transportador, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
 20. Una línea celular que expresa el anticuerpo o fragmento de unión de la reivindicación 1.
 21. La línea celular de la reivindicación 20 que comprende el hibridoma que tiene Designación ATCC No. PTA 12154.
 22. Un anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma de la reivindicación 21.
 23. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 22 que se caracteriza porque el anticuerpo monoclonal se designa como G4.
 24. Un anticuerpo humanizado aislado que comprende las CDRs del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma de la reivindicación 21.
 25. Un método para tratar o inhibir una patología o trastorno inflamatorio o trombótico en un sujeto que tiene necesidad de dicha terapia, que comprende: Administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o fragmento de unión del mismo el cual específicamente se une a un epítipo conformacional de la P-selectina el cual se encuentra dentro de las posiciones de aminoácido 1-35 de la SEQ ID NO:1.
 26. El método de la reivindicación 25 que se caracteriza porque el epítipo conformacional está dentro de las posiciones de aminoácido 4-23 de la SEQ ID NO:1.
 27. El método de la reivindicación 25 que se caracteriza porque el epítipo conformacional comprende las posiciones de aminoácido 4, 14, 17, 21 y 22 de la SEQ ID NO:1.
 28. El método de la reivindicación 27 que se caracteriza porque los aminoácidos en las posiciones de aminoácido 4, 14, 17, 21 y 22 son H, I, K, N y R, respectivamente.
 29. El método de la reivindicación 28 que se caracteriza porque la unión se anula cuando una o más cualesquiera de posiciones de aminoácido 4, 14, 17, 21 o 22 es sustituida con N, V, R o H, respectivamente.
 30. El método de la reivindicación 25 que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento de unión del mismo comprende la capacidad de bloquear la unión del ligando 1 de la glucoproteína P-selectina (PSGL-1) a la P-selectina.
 31. El método de la reivindicación 25 que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento de unión del mismo además comprende la capacidad de causar la disociación de un complejo preformado P-selectina-PSGL-1.
 32. El método de la reivindicación 25 que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento de unión de la reivindicación 1, comprende la capacidad de causar la disociación de la unión célula-célula entre células endoteliales activadas y leucocitos, linfocitos, eritrocitos falciformes,

- y/o plaquetas.
33. El método de la reivindicación 25 que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento de unión de la reivindicación 1, comprende la capacidad de causar la disociación de la unión célula-célula entre plaquetas activadas y leucocitos, linfocitos, eritrocitos falciformes, y/o plaquetas.
 34. El método de la reivindicación 25 que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento de unión del mismo comprende la capacidad de bloquear la función de la P-selectina inhibiendo la unión de células endoteliales activadas a leucocitos, linfocitos, eritrocitos falciformes y/o plaquetas.
 35. El método de la reivindicación 25 que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento de unión del mismo comprende la capacidad de bloquear la función de la P-selectina inhibiendo la unión de las plaquetas activadas a leucocitos, linfocitos, eritrocitos falciformes y/o plaquetas.
 36. El método de la reivindicación 25 que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento de unión del mismo es monoclonal.
 37. El método de la reivindicación 25 que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento del mismo es quimérico, humano o humanizado.
 38. El método de la reivindicación 25 que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento de unión del mismo comprende una inmunoglobulina seleccionada de entre la clase compuesta por IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.
 39. El método de la reivindicación 38 que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento de unión del mismo es una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o una quimera IgG2/G4.
 40. El método de la reivindicación 25 que se caracteriza porque el fragmento de unión comprende por lo menos uno de entre un fragmento Fab, Fab', F(ab)2 o scFv.
 41. El método de la reivindicación 25 que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une al epítipo conformacional con una $K_d \leq 1000 \mu\text{M}$, una $K_d \leq 500 \text{ nM}$, una $K_d \leq 100 \text{ nM}$, una $K_d \leq 50 \text{ nM}$, una $K_d \leq 25 \text{ nM}$, una $K_d \leq 10 \text{ nM}$, una $K_d \leq 5 \text{ nM}$, una $K_d \leq 1 \text{ nM}$ o una $K_d \leq 0,1 \text{ nM}$.
 42. El método de la reivindicación 25 que se caracteriza porque la patología inflamatoria, trombótica u otro padecimiento o trastorno está relacionada con por lo menos uno o más de plaqueta, eritrocito falciforme, leucocito, linfocito o célula endotelial adhesión, vasooclusiva célula falciforme crisis de dolor, trombosis, aterosclerosis, metástasis tumorales, reacciones alérgicas, tiroiditis, psoriasis, dermatitis, nefritis, lupus eritematoso, escleroderma, sepsis, rinitis, anafilaxia, diabetes, esclerosis múltiple, rechazo de injerto, graft vs. huésped enfermedad, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad intestinal inflamatoria, artritis y lesión isquémica por reperfusión, patologías asociadas con traumatismos extensos o inflamación crónica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y falla multisistémica.
 43. El método de la reivindicación 42 que se caracteriza porque la lesión isquémica por reperfusión es causada por al menos uno de entre infarto de miocardio, ACV y trasplante de órganos.
 44. El método de la reivindicación 25 que se caracteriza porque el mencionado anticuerpo se le

24

- administra al sujeto por vía parenteral, intramuscular, intraperitoneal, epidural u oral, intravenosa, subcutánea o nebulizada.
45. El método de la reivindicación 25 que se caracteriza porque el mencionado anticuerpo o fragmento de unión se le administra al sujeto en cantidad de 1 ng/kg a 100 mg/kg.
 46. El método de la reivindicación 25 que se caracteriza porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal designado aquí como G1, hSel001, G4 o un anticuerpo humanizado que comprende las CDRs del mencionado anticuerpo monoclonal.
 47. Un método para bloquear la unión célula-célula del ligando 1 de la glucoproteína P-selectina (PSGL-1) a la P-selectina, que comprende: Administrar a plaquetas activadas, leucocitos, linfocitos, y/o eritrocitos falciformes un anticuerpo o fragmento de unión del mismo el cual específicamente se une a un epítipo conformacional de P-selectina que se encuentra dentro de las posiciones de aminoácido 1-35 de la SEQ ID NO:1.
 48. El método de la reivindicación 47 que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento de unión del mismo además comprende la capacidad de causar la disociación de un complejo preformado P-selectina-PSGL-1.
 49. El método de la reivindicación 47 que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento de unión de la reivindicación 1, comprende la capacidad de causar la disociación de la unión célula-célula entre células endoteliales activadas y leucocitos, linfocitos, eritrocitos falciformes, y/o plaquetas.
 50. El método de la reivindicación 47 que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento de unión de la reivindicación 1, comprende la capacidad de causar la disociación de la unión célula-célula entre plaquetas activadas y leucocitos, linfocitos, eritrocitos falciformes, y/o plaquetas.
 51. El método de la reivindicación 47 que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento de unión del mismo comprende la capacidad de bloquear la función de la P-selectina inhibiendo la unión de las células endoteliales activadas a leucocitos, linfocitos, eritrocitos falciformes y/o plaquetas.
 52. El método de la reivindicación 47 que se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento de unión del mismo comprende la capacidad de bloquear la función de la P-selectina inhibiendo la unión de plaquetas activadas a leucocitos, linfocitos, eritrocitos falciformes y/o plaquetas.
 53. El método de la reivindicación 47 que se caracteriza porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal designado aquí como G1, hSel001, G4 o un anticuerpo humanizado que comprende las CDRs del mencionado anticuerpo monoclonal.
 54. Un método de tamizaje, que comprende: Exponer un epítipo conformacional de P-selectina a un anticuerpo de prueba capaz de ligar al epítipo conformacional, formar un complejo epítipo-anticuerpo de prueba; exponer el complejo epítipo-anticuerpo de prueba a un PSGL-1 o un mimético de PSGL-1 capaz de ligar la P-selectina; y concluir que el anticuerpo de prueba bloquea la unión de PSGL-1 a P-selectina cuando el PSGL-1 o mimético de PSGL-1 no es capaz de ligar el complejo epítipo-anticuerpo de prueba.
 55. El método de tamizaje de la reivindicación 54 que se caracteriza porque el epítipo conformacional está dentro de los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO:1.
 56. El método de tamizaje de la reivindicación 54 que se caracteriza porque el epítipo

75

- conformacional está dentro de los aminoácidos 4-23 de la SEQ ID NO:1.
57. El método de tamizaje de la reivindicación 54 que se caracteriza porque el epítoto conformacional comprende las posiciones de aminoácido 4, 14, 17, 21 y 22 de la SEQ ID NO:1.
 58. El método de tamizaje de la reivindicación 57 que se caracteriza porque el epítoto conformacional además comprende las posiciones de aminoácido 20 y 23 de la SEQ ID NO:1.
 59. El método de tamizaje de la reivindicación 57 que se caracteriza porque los aminoácidos en las posiciones de aminoácido 4, 14, 17, 21 y 22 de la SEQ ID: NO:1 son H, I, K, N y R, respectivamente.
 60. El método de tamizaje de la reivindicación 54 que se caracteriza porque el epítoto conformacional se proporciona como un componente de una proteína intacta de P-selectina que está ligado al sustrato.
 61. El método de tamizaje de la reivindicación 54 que se caracteriza porque el epítoto conformacional se proporciona como un componente de una porción de la proteína de P-selectina que está ligado al sustrato.
 62. El método de tamizaje de la reivindicación 54 que se caracteriza porque el epítoto conformacional está ligado a un sustrato de soporte.
 63. El método de tamizaje de la reivindicación 54 que se caracteriza porque el PSGL-1 o mimético de PSGL-1 está ligado a un sustrato de soporte.
 64. Un método para caracterizar un anticuerpo anti-P-selectina, que comprende: Proporcionar un complejo preformado P-selectina/PSGL-1 que comprende una proteína de PSGL-1 intacta, un fragmento de PSGL-1 o un mimético de PSGL-1 que está ligado a una proteína de P-selectina o fragmento de la misma que comprende un epítoto conformacional al cual se puede unir un anticuerpo de bloqueo de función anti-P-selectina; exponer el complejo preformado P-selectina/PSGL-1 al anticuerpo anti-P-selectina en condiciones adecuadas para permitir que el anticuerpo anti-P-selectina se una al epítoto conformacional; y caracterizar el anticuerpo anti-P-selectina con respecto a su capacidad de causar la disociación del complejo preformado P-selectina/PSGL-1.
 65. El método de la reivindicación 64 que se caracteriza porque el epítoto conformacional está dentro de los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO:1.
 66. El método de la reivindicación 64 que se caracteriza porque el epítoto conformacional está dentro de los aminoácidos 4-23 de la SEQ ID NO:1.
 67. El método de la reivindicación 64 que se caracteriza porque el epítoto conformacional comprende las posiciones de aminoácido 4, 14, 17, 21 y 22 de la SEQ ID NO:1.
 68. El método de la reivindicación 67 que se caracteriza porque los aminoácidos en las posiciones de aminoácido 4, 14, 17, 21 y 22 son H, I, K, N y R, respectivamente.
 69. El método de la reivindicación 67 que se caracteriza porque el epítoto conformacional además comprende las posiciones de aminoácido 20 y 23 de la SEQ ID NO:1.
 70. El método de la reivindicación 64 que se caracteriza porque la proteína de P-selectina o fragmento de la misma que comprende el epítoto conformacional está ligada a un sustrato de soporte.
 71. El método de la reivindicación 64 que se caracteriza porque la proteína PSGL-1 intacta, el

26

fragmento PSGL-1 de la misma o el mimético de PSGL-1 están ligados a un sustrato de soporte.

72. Un sustrato de prueba que comprende un sustrato de soporte y un epítoto conformacional ligado al sustrato de soporte y en el cual se puede unir el epítoto conformacional al anticuerpo de bloqueo de función anti-P-selectina, que se caracteriza porque el epítoto conformacional está dentro de los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO:1.
73. El sustrato de prueba de la reivindicación 72 que se caracteriza porque el epítoto conformacional está dentro de los aminoácidos 4-23 de la SEQ ID NO:1.
74. El sustrato de prueba de la reivindicación 72 que se caracteriza porque el epítoto conformacional comprende las posiciones de aminoácido 4, 14, 17, 21 y 22 de la SEQ ID NO:1.
75. El sustrato de prueba de la reivindicación 72 que se caracteriza porque el epítoto conformacional además comprende las posiciones de aminoácido 20 y 23 de la SEQ ID NO:1.
76. El sustrato de prueba de la reivindicación 72 que se caracteriza porque los aminoácidos en las posiciones de aminoácido 4, 14, 17, 21 y 22 de la SEQ ID: NO:1 son H, I, K, N y R, respectivamente.
77. El sustrato de prueba de la reivindicación 72 que se caracteriza porque el epítoto conformacional se proporciona como un componente de una proteína intacta de P-selectina la cual está enlazada al sustrato de soporte.
78. El sustrato de prueba de la reivindicación 72 que se caracteriza porque el epítoto conformacional se proporciona como un componente de una porción de la proteína de P-selectina la cual está enlazada al sustrato de soporte.



1.

RESUMEN

2. Se revelan anticuerpos que se unen específicamente a la P-selectina, bloquean la unión del PSGL-1 a la P-selectina y causan la disociación de los complejos preformados P-selectina/PSGL-1. La revelación identifica un dominio de unión del anticuerpo (un epítoto conformacional) de la P-selectina hasta ahora desconocido, cercano al N-terminal, al cual se unen los anticuerpos (los cuales, por ejemplo, pueden ser anticuerpos quiméricos, humanos o humanizados). Se revelan anticuerpos que se unen al epítoto conformacional de la P-selectina y que tienen una doble función de bloqueo de la unión de PSGL-1 a P-selectina y de disociación de los complejos preformados P-selectina/PSGL-1. Tales anticuerpos anti-P selectina de doble función y los fragmentos de unión de los mismos se pueden usar en el tratamiento de una variedad de patologías y trastornos inflamatorios y trombóticos agudos y crónicos. También se revelan métodos de tamizaje para identificar y caracterizar esos anticuerpos.

78

Human/Mouse P-selectin

	A	Lectin Domain		B	C1	D
Human 1	WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNR	YTDLVAIQNKNEI	IDLNKLVP	PYYSSYYWIGIRK	NNKTW	
Mouse 1	WTYNYSTKAYSWNNSRVFCRRHF	YTDLVAIQNKNEI	AHLNDVIP	PFNSYYWIGIRK	IINNKW	
	D	E1	C2	E2	C3	
Human 61	TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRN	NEDCVEIYIKSP	SAPGKWND	EHCLKKK	HALCYTA	
Mouse 61	TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRN	NEDCVEIYIKSP	SAPGKWND	EHCLKKK	HALCYTA	
	F	EGF Domain		CR1		
Human 121	SCQDMSCSKQGECL	ETIGN	YTCSCYPGFYGP	CEYVRECGE	LELPQHVL	MNC
Mouse 121	SCQDMSCSKQGECL	ETIGS	YTCSCYPGFYGP	CEYVRECGE	LELPQHVL	MNC
				CR2		
Human 181	FNSQCSFHCTDGYQVNG	PSKLECLASGIW	TNKP	QCLAAQCPPLK	IPERGNMTCL	LHSAKA
Mouse 181	FNSQCTFS	CAEGYELDGP	GELQCLASGIW	TNPPKCD	AVQCQSLEAP	PHGTMACMHPIAA
Human 241	FQHQSSCSFSCEEG	FALVGPEVVQ	TASGVWT	A	PAPVCK---	
Mouse 241	FAYDSSCKFECQ	PGYRARGSNTL	HCTGSGQWSE	PLPTCE	AIA	

Figure 1

Biacore 2-Step Binding

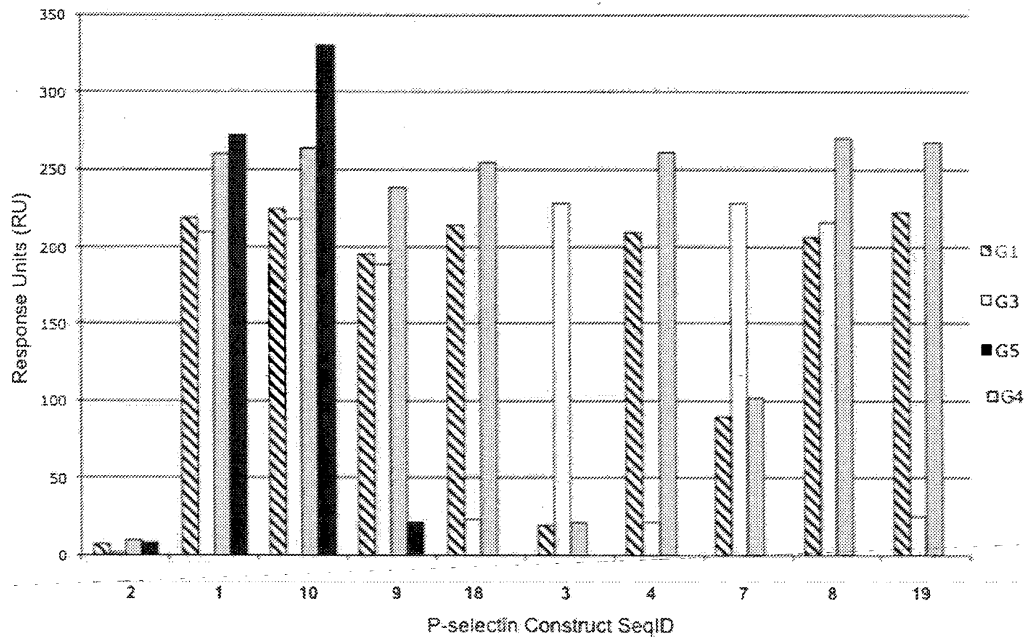


Figure 2

29

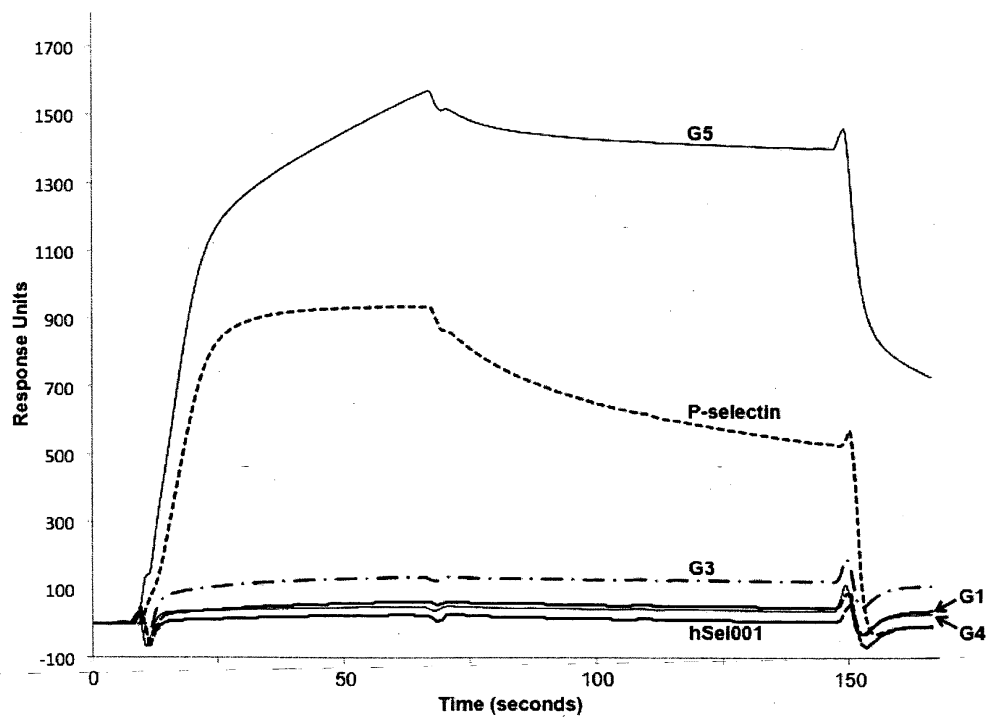


Figure 3

58

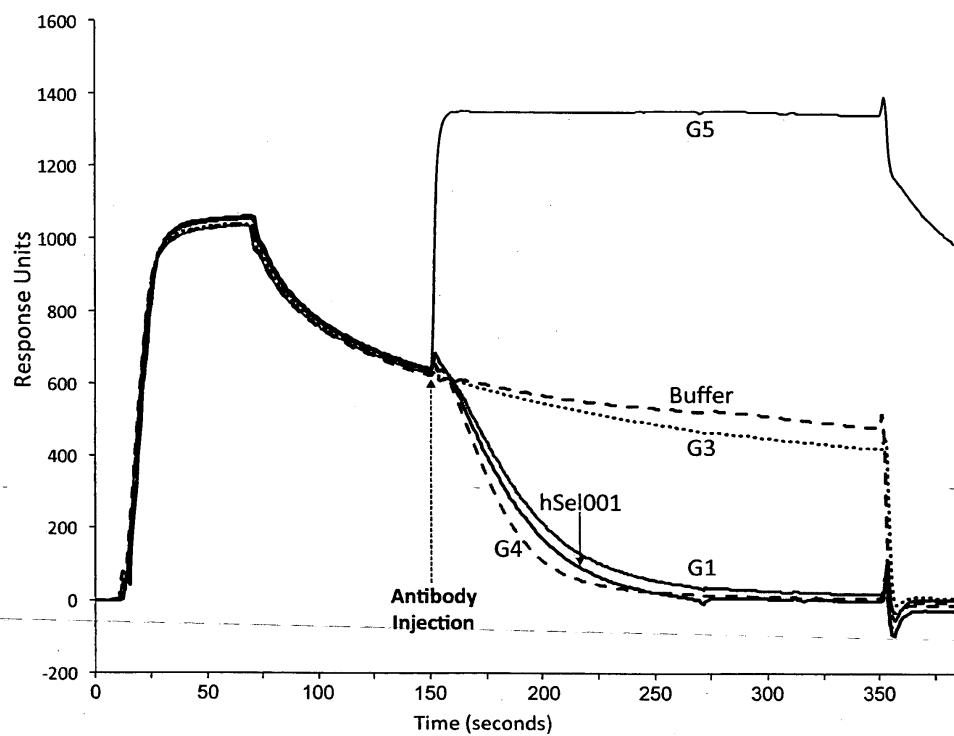


Figure 4

58

5/7

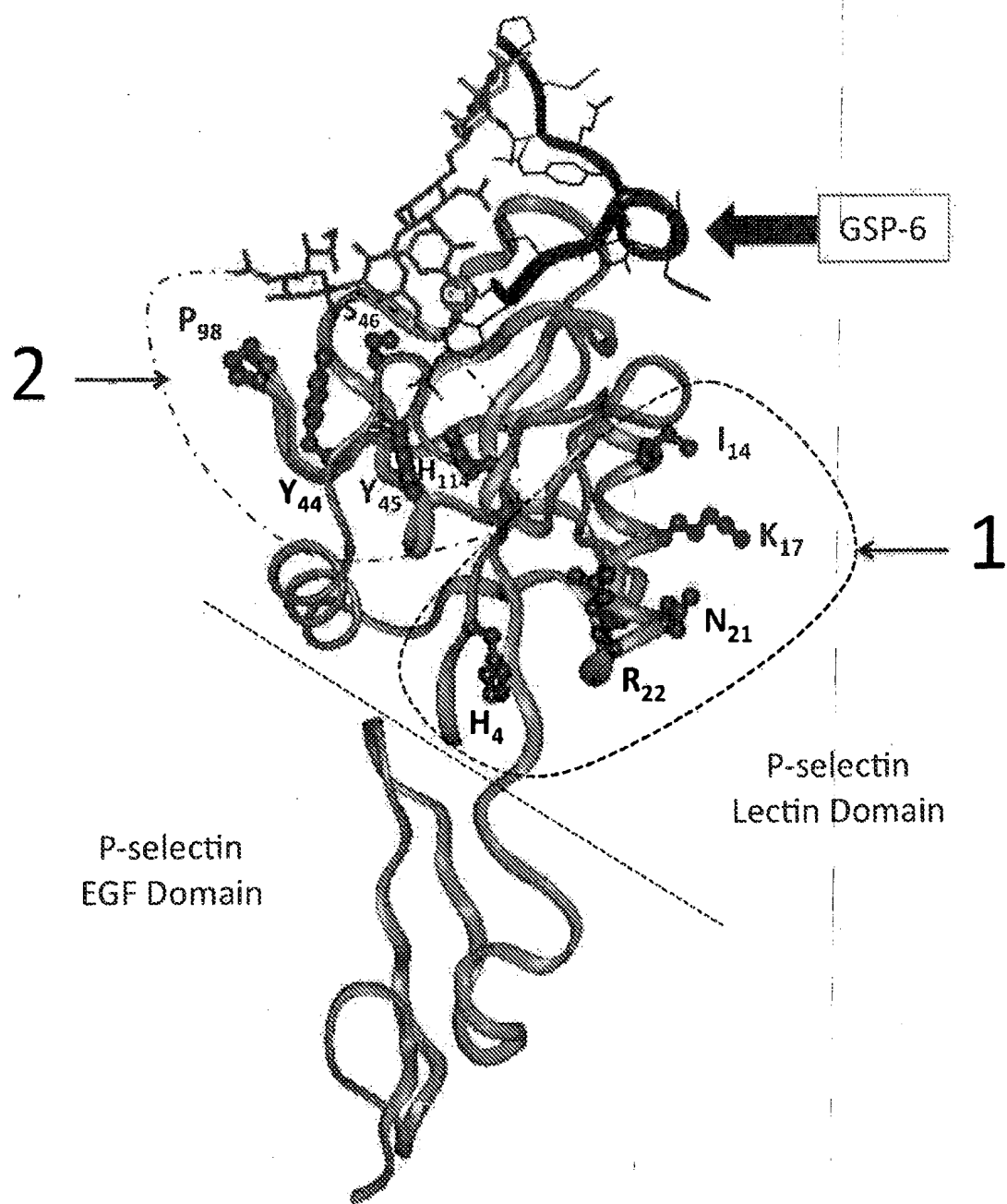


Figure 5

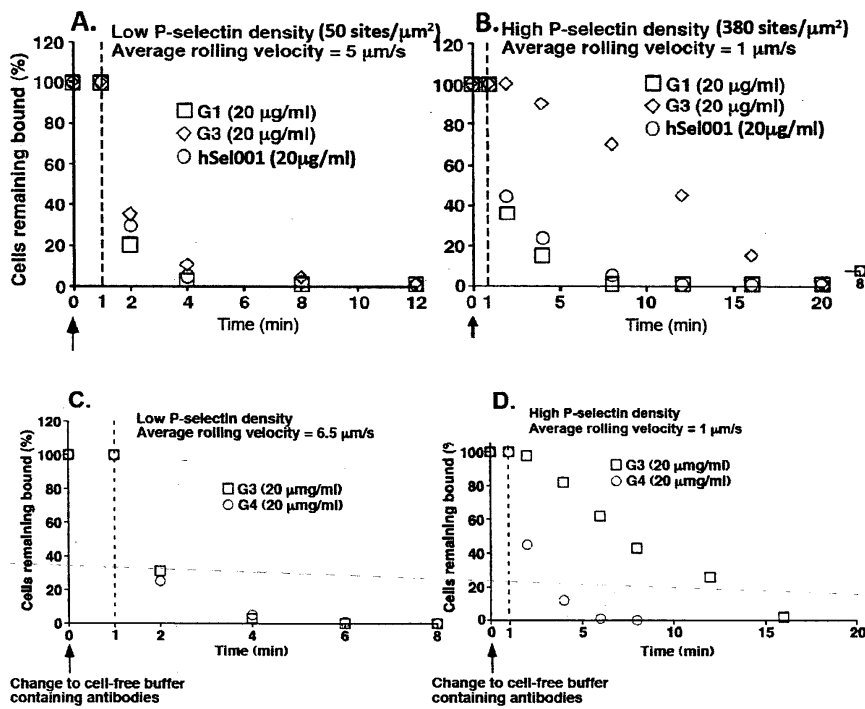


Figure 6

82

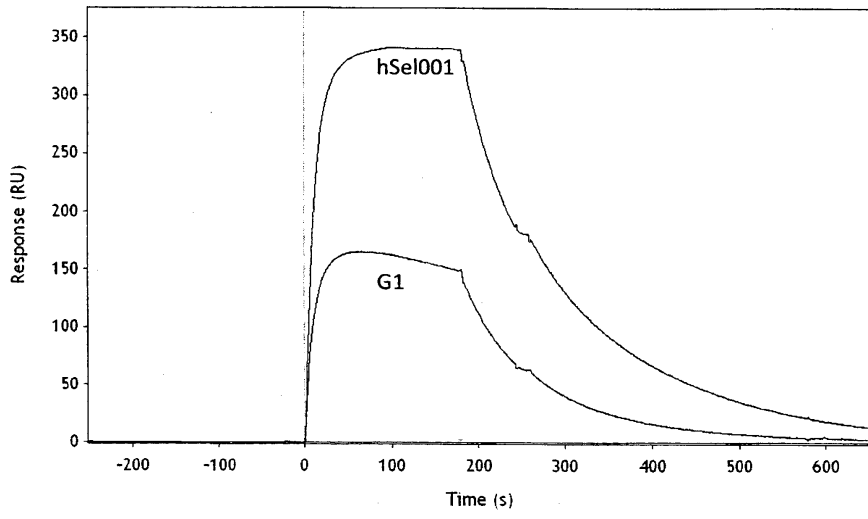


Figure 7

✓
fy

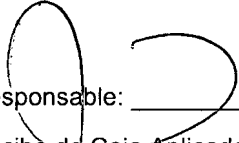
85

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0071157
		Bogotá D.C., Julio 17 de 2013 - 14:33:56

RECIBIDO DE : CASTILLO GRAU & ASOCIADOS LTDA.					NI 800.098.704
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	524773513	17/07/2013	500.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00
=====				

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

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-169462- -00000-0000
Fecha: 2013-07-17 14:52:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85



No. 13-169462- 00000-0000

Fecha: 2013-07-17 14:52:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

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

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐