Industria y Co
SUPERINTENDE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-004726- -00019-0000
Fecha: 2016-01-14 16:49:54 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: ~~116~~ 115

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 16-008135- -00000-0000
Fecha: 2016-01-14 16:49:54 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: ~~116~~ 115

DELEGATURA DE PROPIEDAD

División de Nuevas Creaciones

JV

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TÍTULO** ANTICUERPOS ANTI-PSGL-1 Y USOS DE LOS MISMOS

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** ABGENOMICS COÖPERATIEF U.A.

DOMICILIO Amsterdam Zuidoost, Holanda

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

22. **BOGOTÁ, D.C.,** _____

(FORMA P-10)

CAVELIER ABOGADOS
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 16-008135- -00000-0000
Fecha: 2016-01-14 16:49:54 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: ~~110~~ 115

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-004726- -00019-0000
Fecha: 2016-01-14 16:49:54 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: ~~110~~ 115

3-3

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Tramite

☐ **Conversión** ☒ **División** ☐ **Fusión**

☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

ABGENOMICS COÖPERATIEF U.A.

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número_____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Holanda	Herikerbergweg 238, Luna ArenA, 1101CM Amsterdam Zuidoost, Holanda	Zuidoost
Dirección electrónica	**No. Fax**	**Número telefónico**
clientes@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional
De Páez Luz Clemencia	C.C. 35.456.344	T.P.A. 23.555

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 4ª No. 72 –35		Bogotá
Dirección electrónica	**No. Fax**	**Número telefónico**
cavelier@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente_____ De: _____ A: _____	Expediente : **14.004.726** De: _____ A: _____	Expediente_____ De: _____ A: _____

5. Comprobante de pago No. 16-001299 Fecha: 08/01/2016

6. Anexos

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación solicitud por $80.000.
- [ ] Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por
- [x] El poder para solicitud divisional reposa en el expediente No. 14.004.726 correspondiente a la solicitud parental
- [x] Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- [ ] Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
Nombre y apellidos **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**	Firma Luz Clemencia de Páez
C.C. 35.456.344 de Usaquén	Tarjeta Profesional 23.555

GCH GCH\GCH\SDC\ID-AF285770\WPC17516

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. **14.004.726**. La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de la decisión proferida por ese Despacho por medio de la resolución No. **90439** del 23 de noviembre de 2015 notificado por fijación en lista del 01 de diciembre de 2015. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 13 de enero de 2014 y la prioridad que allí se reivindica el 13 de junio de 2011.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. **14.004.726**

ANTICUERPOS ANTI-PSGL-1 Y USOS DE LOS MISMOS

1. Solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la solicitud de patente provisional US 61/496.249, presentada el 13 de junio de 2011, con el título "Anticuerpos ANTI-PSGL-1 y usos de los mismos". Todas las enseñanzas y el contenido de la mencionada solicitud provisional se incorporan en esta memoria descriptiva por referencia.

2. CAMPO DE LA INVENCIÓN

En la presente memoria descriptiva se proveen anticuerpos que se unen específicamente al ligando-1 de glicoproteína P-selectina (PSGL-1, por su sigla en inglés), los polinucleótidos que codifican tales anticuerpos, los vectores de expresión que comprenden tales polinucleótidos, las células huésped que comprenden tales vectores de expresión y las composiciones relacionadas. También se proporcionan métodos para el tratamiento de un trastorno o un trastorno causado por, o asociado con, una mayor proliferación y/o número de células T activadas, tal como soriasis, por medio del uso de anticuerpos anti-PSGL-1.

3. ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las respuestas inflamatorias a una infección o lesiones son iniciadas por la adherencia de leucocitos a la pared vascular (McEver *et al.*, 1997, J. Clin. Invest., 100 (3): 485-492). Las selectinas representan una familia de glicoproteínas

que median las primeras interacciones entre células endoteliales - leucocito y plaquetas - leucocitos, durante la inflamación. La familia de las selectinas, que consta de L-selectina, E-selectina y P-selectina, comprende un dominio lectina NH_2-terminal, seguido por un dominio similar a EGF, una serie de repeticiones de consenso, un dominio de transmembrana y una corta cola citoplásmica. Los dominios de lectina de las selectinas interactúan con ligandos glicoconjugados específicos con el fin de facilitar la adhesión celular. La L-selectina, expresada en la mayoría de los leucocitos, se une a ligandos en algunas células endoteliales y otros leucocitos. La E-selectina, expresada en las células endoteliales activadas por citoquina, se une a ligandos en la mayoría de los leucocitos. La P-selectina, expresada en las plaquetas activadas y células endoteliales, también se une a ligandos en la mayoría de los leucocitos.

El ligando-1 de glicoproteína P-selectina ("PSGL-1") también conocido como SELPLG o CD162 (grupo de diferenciación 162) es un ligando de glicoproteína tipo mucina humana para las tres selectinas (Constantin, Gabriela, 2004, Drugs News Perspect, 17(9): 579-585; McEver *et al.*, 1997, J. Clin. Invest., 100 (3): 485-492). El PSGL-1 es un homodímero unido por disulfuro, con dos subunidades de 120 kD y se expresa en la superficie de los monocitos, linfocitos, granulocitos y en algunas células madre $CD34^+$. Es probable que el PSGL-1 contribuya al reclutamiento de leucocitos patológicos en muchos desórdenes inflamatorios, ya que facilita las interacciones adhesivas de las selectinas, lo que sugiere que los inhibidores de PSGL-1, tal como anticuerpos a PSGL-1, son medicamentos antiinflamatorios potencialmente útiles.

Se han desarrollado varios anticuerpos anti-PSGL-1 (véase, *por ejemplo*, la publicación de solicitud internacional No. WO 2005/110475, publicada el 24 de noviembre de 2005; la publicación de solicitud internacional No. WO 2003/013603, publicada el 20 de febrero de 2003; Constantin, Gabriela, 2004, Drugs News Perspect, 17(9): 579-585).

4. DESCRIPCION DE LA INVENCION

En un aspecto, aquí se proveen anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo que se unen específicamente a PSGL-1. En una modalidad, aquí se provee un anticuerpo monoclonal que se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 de humano, que comprende: (i) una región variable de cadena liviana ("VL") que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 3; (ii) una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada ("VH") que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 4; y (iii) una región constante de IgG4 humana que contiene una sustitución de Serina por Prolina en el aminoácido 228 de la cadena pesada enumerada de acuerdo al índice EU (inmunoglobulina gama-G1)(Véase, Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63(1): 78-85). En una modalidad específica, aquí se provee un anticuerpo monoclonal que se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 de humano que comprende: (i) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 1; y (ii) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2.En otra modalidad especifica, aquí se provee un anticuerpo monoclonal que se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 de humano que comprende: (i) una cadena pesada que consiste de la SEQ ID NO: 2; y (ii)una cadena liviana que

consiste de la SEQ ID NO: 1.En otra modalidad especifica, aquí se provee un anticuerpo monoclonal que se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 de humano que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2, y una cadena liviana complementaria. En una modalidad específica, cualquiera de los anticuerpos monoclonales antes indicados esta purificado.

En otro aspecto, aquí se provee una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos monoclonales y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una modalidad específica, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo monoclonal que esta purificada.

En una modalidad, aquí se provee una preparación farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores en una solución acuosa que comprende citrato de sodio, cloruro de sodio, y ácido cítrico monohidrato. En una modalidad específica, la preparación farmacéutica es una solución acuosa que comprende 9,1 mM citrato de sodio dihidrato, 150 mM de cloruro de sodio, y 0,9 mM de ácido cítrico. En otra modalidad especifica, el anticuerpo monoclonal está presente a una concentración de 0,267 mM en la preparación farmacéutica. En una modalidad específica, la preparación farmacéutica es una solución acuosa que comprende 2,676 g/L de sodio, 8,766 g/L de cloruro de sodio, 0,2 g/L de polisorbato 80, y 0,189 g/L de ácido cítrico. En otra modalidad específica, el anticuerpo monoclonal está presente a una concentración de 40 g/L en la preparación farmacéutica. En una modalidad especifica, todas las soluciones acuosas antes indicadas se encuentran a pH 6,0.

En otro aspecto, aquí se proporcionan polinucleótidos que codifican un anticuerpo descrito aquí o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En una modalidad específica, aquí se proporciona un polinucleótido aislado que codifica una cadena pesada de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 2. En una modalidad, un vector de expresión comprende al polinucleótido aislado antes indicado. En ciertas modalidades, el vector de expresión además comprende un polinucleótido que codifica una cadena liviana de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 1. En una modalidad específica, el vector de expresión es un vector de expresión de mamífero. En otro aspecto, aquí se proporciona una célula huésped que comprende al vector de expresión antes indicado. En una modalidad específica, la célula huésped comprende (a) un primer ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 2, funcionalmente unido a un promotor funcional en dicha célula huésped; y (b) un segundo ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 1 funcionalmente unido a un promotor funcional en dicha célula huésped. En otra modalidad específica, el primer y segundo ácidos nucleicos de la célula huésped se encuentran en el mismo vector de expresión o en vectores de expresión diferentes.

En otro aspecto, aquí se proporciona un método para producir cualquiera de los anticuerpos monoclonales arriba indicados que comprende cultivar a cualquiera de las células huésped arriba indicadas de tal modo que dichos primero y segundo ácidos nucleicos se expresan en dicha célula, y dichas cadenas liviana y pesada se ensamblan juntas para formar dicho anticuerpo.

En otro aspecto, aquí se provee una cadena pesada de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de

cadena pesada de anticuerpo que comprende los aminoácidos 1 a 228 de la SEQ ID NO: 2. En una modalidad especifica, aquí se provee una cadena pesada de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 2. En otra modalidad específica, aquí se provee un fragmento de cadena pesada de anticuerpo que comprende los aminoácidos 1 a 228 de la SEQ ID NO: 2. También se provee aquí el método para producir la cadena pesada antes indicada que comprende cultivar a cualquiera de las células huésped arriba indicadas de tal modo que dicha cadena pesada es expresada por la célula, y aislar dicha cadena pesada. En una modalidad especifica, un método para producir cualquiera de los anticuerpos arriba indicados comprende producir la cadena pesada de acuerdo al método arriba indicado para producir la cadena pesada, aislar dicha cadena pesada, y formar un complejo con dicha cadena pesada con una cadena liviana de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO:1.

En otro aspecto, aquí se proporciona un kit que comprende un primer embase de cualquiera de los anticuerpos monoclonales arriba indicado. En una modalidad especifica, el primer embase es un frasco que contiene a dicho anticuerpo monoclonal como un cuerpo estéril liofilizado bajo vacio, y el kit, además comprende un segundo embase que comprende un fluido farmacéuticamente aceptable. Aquí también se proporciona un dispositivo para inyección que contiene a cualquiera de los anticuerpos monoclonales antes indicados. En una modalidad específica, el dispositivo para inyección es una jeringa.

En otro aspecto, aquí se proporcionan métodos para prevenir y/o tratar una enfermedad o desorden asociado con o provocado por (totalmente o en parte) un aumento y/o cantidades de células T activadas respecto de los individuos sanos o de

los individuos que no tiene la enfermedad o desorden particular. En una modalidad específica, aquí se proporciona un método para tratar un desorden inflamatorio, que comprende administrar a un individuo que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los anticuerpos monoclonales antes indicados. En otra modalidad específica, un método para tratar un desorden inflamatorio, comprende administrar a un individuo que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones farmacéuticas antes indicadas. En una modalidad específica, el desorden inflamatorio es una enfermedad autoinmune. En otra modalidad específica, el desorden inflamatorio es soriasis. En otra modalidad específica, el desorden inflamatorio es soriasis de placa. En otra modalidad específica, la soriasis de placa es moderada a severa. En otra modalidad específica, el desorden inflamatorio es soriasis eritrodérmica. En otra modalidad específica, el desorden inflamatorio es artritis soriatica. En otra modalidad específica, el desorden inflamatorio es artritis reumatoidea. En otra modalidad específica, el desorden inflamatorio es enfermedad de Crohn. En otra modalidad específica, el desorden inflamatorio es espondilitis anquilosante. En otra modalidad específica, el desorden inflamatorio es diabetes.

5. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1 presenta la electroforesis capilar en gel no reductora (CGE) para h15A7 y 15A7H. La flecha indica el pico para media molécula de anticuerpo.

Fig. 2 presenta la unión del anticuerpo 15A7H y el control a células TCD4+ humanas activadas. Los valores de EC50 (nM) se derivaron utilizando un modelo de ajuste de 4 parámetros de un sitio graficando la intensidad de fluorescencia media (MFI) versus la concentración de anticuerpo.

Fig. 3 presenta la respuesta a la dosis combinada del anticuerpo 15A7H en DTH *trans-vivo* en PBMC de 4 donantes. La media ± SEM combinada de los 4 donantes después del tratamiento con 0,03, 0,1, 0,3, 1 y 10 mg/kg de anticuerpo, o vehiculo. pbmc: solo PBMC, V: vehículo, 0,03, 0,1, 0,3, 1 y 10 mg/kg de anticuerpo 15A7H. Las inhibiciones porcentuales del grosor de la planta del pie en respuesta al tratamiento con 0,03, 0,1, 0,3, 1, y 10 mg/kg de anticuerpo 15A7H.

Fig. 4 presenta las concentraciones plasmáticas de 24 horas del anticuerpo 15A7H en ratones C57BL/6 luego de una única inyección intraperitoneal. Los niveles plasmáticos combinados de los dos anticuerpos (media ± SEM, n=4) en raza animales experimentales se grafican contra su porcentaje de inhibición del grosor de la planta del pie en el ensayo DTH trans-vivo.

Fig. 5 presenta las concentraciones plasmáticas de 15A7H versus el tiempo en ratones C57BL/6. Se dosificó 4 ratones satélites por vía intraperitoneal con 0,03, 0,1, 0,3, 1, y 10 mg/kg del anticuerpo 15A7H. Se recolectaron las muestras sanguíneas a las 1, 3, 5 y 24 hrs.

Fig. 6 presenta la actividad de los anticuerpos 15A7H y control, que fueron probados a distintas concentraciones (5, 0,5, 0,05, 0,005 y 0,0005 µg/ml).

Fig. 7A presenta la secuencia de aminoácido de la cadena pesada del anticuerpo 15A7H (SEQ ID NO: 2). La región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 4) se encuentra en letra negrita. Las CDR (CDR1 (SEQ ID NO: 8), CDR2 (SEQ ID NO: 9), y CDR3 (SEQ ID NO: 10)) se encuentran enmarcadas en cuadrado. Las regiones de marco (FR1 (SEQ ID NO: 17), FR2 (SEQ ID NO: 18), FR3 (SEQ ID NO: 19), y FR4 (SEQ ID NO: 20)) también se encuentran indicadas. Se encuentra indicada la región constante. La secuencia de aminoácido de la región de bisagra (SEQ ID NO: 12) se encuentra enmarcada. La prolina substituida en la posición de aminoácido 228 en la región de bisagra se encuentra en letra cursiva.

Fig. 7B presenta la secuencia de aminoácido de la cadena liviana del anticuerpo 15A7H (SEQ ID NO: 1). La región variable de cadena liviana (SEQ ID NO: 3) está en letra negrita. Las CDR (CDR1 (SEQ ID NO: 5), CDR2 (SEQ ID NO: 6), y CDR3 (SEQ ID NO: 7)) se encuentran enmarcadas. Las regiones de marco (FR1 (SEQ ID NO: 13), FR2 (SEQ ID NO: 14), FR3 (SEQ ID NO: 15), y FR4 (SEQ ID NO: 16)) también se encuentran indicadas. Se encuentra indicada la región constante.

Tabla 1: Lista de SEQ ID NO y sus secuencias correspondientes

SEQ ID NO.	Secuencia Correspondiente
SEQ ID NO: 1	secuencia de aminoácido de la Cadena liviana de 15A7H
SEQ ID NO: 2	secuencia de aminoácido de la Cadena pesada de 15A7H
SEQ ID NO: 3	secuencia de aminoácido de la Región Variable de Cadena liviana (VL) de 15A7H
SEQ ID NO: 4	secuencia de aminoácido de la Región Variable de Cadena pesada (VH) de 15A7H

SEQ ID NO: 5	secuencia de aminoácido de la CDR1 VL de 15A7H
SEQ ID NO: 6	secuencia de aminoácido de la CDR2 VL 15A7H
SEQ ID NO: 7	secuencia de aminoácido de la CDR3 VL 15A7H
SEQ ID NO: 8	secuencia de aminoácido de la CDR1 VH 15A7H
SEQ ID NO: 9	secuencia de aminoácido de la CDR2 VH 15A7H
SEQ ID NO: 10	secuencia de aminoácido de la CDR3 VH 15A7H
SEQ ID NO: 11	secuencia de aminoácido de largo completo de PSGL-1 humano
SEQ ID NO: 12	secuencia de aminoácido de la región de bisagra de IgG4
SEQ ID NO: 13	15A7H VL FR1
SEQ ID NO: 14	15A7H VL FR2
SEQ ID NO: 15	15A7H VL FR3
SEQ ID NO: 16	15A7H VL FR4
SEQ ID NO: 17	15A7H VH FR1
SEQ ID NO: 18	15A7H VH FR2
SEQ ID NO: 19	15A7H VH FR3
SEQ ID NO: 20	15A7H VH FR4
SEQ ID NO: 21	secuencia de aminoácido de la región de bisagra de IgG4 tipo silvestre

6. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Aquí se proveen anticuerpos que se unen específicamente a PSGL-1. También se proveen ácidos nucleicos aislados que codifican a dichos anticuerpos. Además se proveen vectores y células huésped que comprenden ácidos nucleicos que codifican a tales anticuerpos o a los fragmentos de unión antígenos de los mismos. También se proveen métodos para preparar a estos anticuerpos, células, *por ejemplo* células CHO, los anticuerpos producidos por estas células y la purificación de los anticuerpos producidos. También se proporciona aquí un método para tratar y/o prevenir un desorden o enfermedad descrito aquí (*por ejemplo*, una condición inflamatoria) que comprende administrar un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí, que se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1. En una modalidad específica, el

anticuerpo es el anticuerpo monoclonal IgG4 15A7H descrito en los Ejemplos 1-4, *infra*.

6.1 Anticuerpos

Aquí se proveen anticuerpos monoclonales, que se unen de manera inmunoespecífica ligando uno de la glicoproteína P-selectina humana ("PSGL-1"). En una modalidad especifica, aquí se proporciona un anticuerpo monoclonal que se une de manera inmunoespecifica a PSGL-1 de humano que comprende: (i) una región variable de cadena liviana ("VL") que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 3; (ii) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada ("VH") que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 4; y (iii) una región constante de IgG4 humana que contiene una sustitución de aminoácido Serina por Prolina en el aminoácido 228 de la cadena pesada enumerado de acuerdo al índice EU. Ejemplos no limitantes de regiones constantes humanas se describen en el arte, *por ejemplo*, véase Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242. Preferentemente, el anticuerpo se une a PSGL-1 e induce de manera selectiva la apoptosis de células T activadas (respecto de las otras células que expresan PSGL-1). En una modalidad especifica, la unión del anticuerpo a PSGL-1 no interfiere con la interacción de P-selectina con PSGL-1, una función asociada con PSGL-1 y un requisito para la localización eficaz de células T activadas y neutrofilos en los tejidos objetivos.

En una modalidad específica, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a PSGL-1 es una inmunoglobulina de clase 4 de largo completo (IgG4), y preferentemente comprende una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2, e incluso más preferentemente comprende una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 y una secuencia de cadena liviana la SEQ ID NO: 1 (siendo esto último el anticuerpo monoclonal 15A7H).

También se proporciona aquí los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo, que comprende las secuencias de región variable de la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y al menos una porción de una región constante de cadena pesada de humano que contiene a la región de bisagra de IgG4 de humano a lo largo e incluyendo una sustitución de Serina por Prolina en el aminoácido 228 de la cadena pesada de humano enumerado de acuerdo al índice EU. En una modalidad específica, un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo aquí es un fragmento $F(ab')_2$.

Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí preferentemente están aislados, mucho más preferentemente purificado.

Como se utiliza aquí y a menos que se especifique de otra forma, los términos "se une inmunoespecíficamente", "reconoce inmunoespecíficamente", "une específicamente" y "reconoce específicamente" son términos análogos en el contexto de los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo y se utilizan de manera intercambiable aquí, y se refieren a la unión de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo a través del sitio de combinación del antígeno con su epitope, como se entenderá por una persona experta en el arte. En una modalidad específica, un

anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo que se une específicamente a un antígeno también se puede unir a otros péptidos o polipéptidos, aunque generalmente con una menor afinidad como se determina, por ejemplo, mediante inmunoensayo, Biacore™, instrumento KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID), u otros ensayos conocidos en el arte. En una modalidad específica, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo que se une de manera inmunoespecífica a un antígeno se une al antígeno con una K_a que es al menos 2 logs, 2,5 logs, 3 logs, 4 logs o mayor que la K_a cuando el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo se une a otro antígeno. En otra modalidad específica, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo que se une de manera inmunoespecífica a un antígeno no reacciona de manera cruzada uniéndose con otras proteínas. En modalidades específicas, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí específicamente se une a una isoforma nativa o a una variante nativa de PSGL-1 (que es una isoforma que existe de manera natural o una variante de PSGL-1 en un animal que se puede aislar a partir de un animal, preferentemente un humano). En modalidades particulares, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí se une inmunoespecíficamente a PSGL-1 de humano o a un fragmento del mismo. En modalidades específicas, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí se une específicamente a PSGL-1 de humano y/o a PSGL-1 de cinomolgo o a un fragmento de lo mismo.

La secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 11 presenta a la PSGL-1 humana de largo completo, con numero de acceso en GenBank™ AAA74577.1, GI: 902797. En modalidades específicas, un anticuerpo descrito aquí se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 tal como se determina, *por ejemplo*, mediante ELISA o mediante otro ensayo de unión de antígeno conocido en el arte, o descrito aquí.

En aspectos específicos, aquí se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a PSGL-1 de humano y/o cinomolgo y que es una inmunoglobulina G (que tiene una región pesada-gama) de clase 4 (una IgG4) que es un tetrámero de dos dímeros idénticos unidos por disulfuro, donde cada uno comprende una cadena pesada y una cadena liviana. El anticuerpo preferentemente comprende una cadena pesada de la SEQ ID NO:2. Más preferentemente, el anticuerpo comprende una cadena pesada de la SEQ ID NO:2 y una cadena liviana de la SEQ ID NO:1. Con respecto a la cadena liviana, en una modalidad específica, la cadena liviana de un anticuerpo descrito aquí es una cadena liviana kappa.

En modalidades específicas, un anticuerpo descrito aquí comprende una cadena pesada que comprende o que consiste de la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:2. En modalidades específicas, un anticuerpo descrito aquí comprende una cadena liviana que comprende o que consiste de la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:1, y que comprende una cadena pesada que comprende o que consiste de la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:2. En modalidades específicas, un anticuerpo descrito aquí comprende una cadena liviana que comprende o que consiste de la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:1. En modalidades específicas, un anticuerpo descrito aquí comprende

una cadena pesada que comprende o que consiste de la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:2.

En una modalidad específica, los anticuerpos proporcionados aquí son anticuerpos monoclonales IgG4 que se unen específicamente a PSGL-1. Se sabe que los anticuerpos IgG4 sufren un proceso llamado intercambio de brazo Fab, también conocido como recambio de IgG4, en donde la susceptibilidad aumentada de los enlaces de disulfuro de la bisagra de IgG4 nativa a la reducción permiten que las cadenas pesadas se separen y se reasocien al azar para producir una población de moléculas IgG4 mixta con pares de cadenas pesadas y cadenas livianas randomizadas (Aalberse *et al.*, 1999. Int Arch Allergy Immunol 118:187-189; Labrijn, *et al.*, 2009, Nat Biotechnol 27:767-771; Schuurman *et al.*, 2001. Mol Immunol 38:1-8; van der Neut Kolfschoten *et al.*, 2007. Science 317:1554-1557).

Se ha demostrado que una mutación de Serina por Prolina en la posición 241 utilizando numeración de Kabat (Kabat *et al.* 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) o en la posición 228 utilizando el índice EU (Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63(1): 78-85) en la región de bisagra de la IgG4 de humano resulta en una reducción considerable de la formación de enlaces de disulfuro intracadena, resultando en la reducción de las moléculas "medio-anticuerpo" de IgG4 y con una heterogeneicidad/recambio reducido de las moléculas de IgG4 (Bloom *et al.* 1997, Protein Sci, 6:407-415; Angal *et al.*, 1993, Molecular Immunology, 30(1): 105-108)). También hay informes publicados de que esta mutación en la bisagra puede disminuir el recambio de IgG4 y aumentar la vida media de las moléculas

de IgG4 en *vivo* (Labrijn, *et al.*, 2009, Nat Biotechnol 27:767-771; Stubenrauch, *et al.*, 2010, Drug Metab Dispos 38:84-91). El autor Van der Neut Kolfschoten *et al.*, informó que el dominio C_H3 de IgG4 y no la bisagra del núcleo esta predominantemente involucrado de la reacción del intercambio del brazo Fab (véase Van der Neut Kolfschoten *et al*, 2007, Science, 317:1554-1557 ("Van der Neut Kolfschoten") at page 1555, col. 2). El autor Van der Neut Kolfschaten informó que intercambiando el dominio C_H3 de IgG1 por el dominio C_H3 de IgG4 activaba el intercambio del brazo Fab para la IgG1, mientras que intercambiando el dominio C_H3 de IgG4 anulaba el intercambio del brazo Fab para la IgG4 (Véase, p. 1555 y Figura 2D).

En una modalidad especifica, aquí se provee anticuerpos IgG4 o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se unen específicamente a PSGL-1, y que contienen una o más sustituciones de aminoácidos en la región de bisagra de IgG4, donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo retiene la unión específica a dicho PSGL-1 y donde el recambio de IgG4 es reducido respecto de un anticuerpo que comprende una región de bisagra de IgG4 que no comprende a dicha una mas sustituciones de aminoácidos. En una modalidad específica, la región de bisagra de IgG4 solamente comprende una única sustitución de aminoácido. Un ejemplo de una "región de bisagra de IgG4 humana", es la región en la cadena pesada de un anticuerpo IgG4 entre los dominios C_H1 y C_H2 que consisten de la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:12, tal como se define en Angal *et al.*, 1993, Molecular Immunology, 30(1): 105-108.

En una modalidad específica, una reducción en el recambio de IgG4 se determina detectando una menor cantidad de

medias moléculas de anticuerpo o del intercambio de brazo producido a partir de un anticuerpo aquí descrito que contiene una o más sustituciones de aminoácidos en la región de bisagra, comparado con la cantidad de medias moléculas de anticuerpo o del intercambio de brazo producido a partir de una molécula de IgG4 que contiene una región de bisagra de IgG4 que no comprende a dicha una o más sustituciones de aminoácidos. Se puede usar cualquier ensayo bien conocido en el arte para detectar la producción de medio anticuerpo y moléculas biespecíficas de anticuerpo. *Véase, por ejemplo,* Van der Neut Kolfschoten *et al*, 2007, Science, 317:1554-1557, para ejemplos de ensayos para detectar la producción de anticuerpos biespecíficos.

En una modalidad específica, aquí se provee anticuerpos monoclonales IgG4 que se unen específicamente a PSGL-1, que comprenden una sustitución de aminoácido Serina por Prolina en la posición de aminoácido 228 de la cadena pesada enumerado de acuerdo al índice EU.

En una modalidad específica, un anticuerpo descrito aquí comprende un cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:1 y una cadena pesada que comprende una Prolina en la posición 228 de la cadena pesada enumerado de acuerdo al índice EU.

En una modalidad específica, un anticuerpo monoclonal, que se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 de humano comprende: (i) una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:1; y (ii) una cadena pesada que comprende una región constante de IgG4 humana que contiene una o más sustituciones de aminoácidos en la región de bisagra IgG4, donde dicho anticuerpo retiene la unión específica a

dicho PSGL-1 y donde el recambio de IgG4 se reduce respecto de un anticuerpo que comprende una región de bisagra de IgG4 que no comprende a dicha una o más sustituciones de aminoácidos.

En una modalidad específica, un anticuerpo monoclonal, que se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 de humano comprende (i) una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:1; y (ii) una cadena pesada que comprende una región constante de IgG4 humana que comprende una sustitución de aminoácido Serina por Prolina en la posición de aminoácido 228 de la cadena pesada enumerado de acuerdo al índice EU o la posición 241 de acuerdo al sistema de numeración de Kabat (Kabat *et al.* 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; y Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63(1): 78-85).

En una modalidad específica, un anticuerpo monoclonal, que se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 de humano comprende: (i) una región VL de cadena que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:3; (ii) una región VH de cadena que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:4; y (iii) una región constante de IgG4 humana que contiene una región de bisagra de IgG4 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en la región de bisagra, donde dicho anticuerpo retiene la unión especifica a PSGL-1 y donde el recambio de IgG4 se reduce respecto de un anticuerpo que comprende una región de bisagra de IgG4 que no comprende a dicha una o más sustituciones de aminoácidos.

En una modalidad específica, un anticuerpo monoclonal que se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 de humano

comprende: (i) una cadena pesada que comprende una región VH de cadena que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:4, y (ii) una región constante de cadena pesada de a IgG4 humana que comprende una sustitución de aminoácido Serina por Prolina en la posición de aminoácido 228 de la cadena pesada enumerado de acuerdo al índice EU.

En una modalidad específica, un anticuerpo monoclonal, que se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 de humano comprende: (i) una región VL de cadena que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:3; (ii) una cadena pesada que comprende una región VH de cadena que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:4; y (iii) una región constante de cadena pesada de a IgG4 humana que comprende una sustitución de aminoácido Serina por Prolina en la posición de aminoácido 228 de la cadena pesada enumerado de acuerdo al índice EU.

En ciertas modalidades, un anticuerpo monoclonal IgG4 como se describe aquí comprende los CDR VH que tienen la secuencia de aminoácidos aquí descrita (*por ejemplo*, véase la Tabla 3) y los CDR VL que tienen la secuencia de aminoácidos descrita aquí (*por ejemplo*, véase la Tabla 2), donde el anticuerpo se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 y que tiene una mutación en la región de bisagra que reduce el recambio de IgG4 (*por ejemplo*, una sustitución de aminoácido Serina por Prolina en el aminoácido 228 de la cadena pesada enumerado de acuerdo al índice EU). En una modalidad específica, el anticuerpo monoclonal IgG4 se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 y comprende una cadena pesada que comprende (a) una región de cadena VH que comprende las SEQ ID NO: 8, 9 y 10; y (b) una región constante de cadena pesada de

IgG4 humana que contiene una sustitución de aminoácido de erina por Prolina en el aminoácido 228 de la cadena pesada enumerado de acuerdo al índice EU. Más preferentemente, el anticuerpo además comprende una cadena liviana que comprende una región de cadena VL que comprende las SEQ ID No: 5, 6, y 7.

La tabla 2, a continuación presenta, las CDR VL (en particular, CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL) de la secuencia de aminoácido de 15A7H. La tabla 3, a continuación presenta, las CDR VH (en particular, CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH) de la secuencia de aminoácido de 15A7H. En modalidades específicas, un anticuerpo aquí descrito que se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 de humano (SEQ ID NO: 11) comprende las secuencias CDR VL de la tabla 2. En modalidades específicas, un anticuerpo aquí descrito que se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 de humano (SEQ ID NO: 11), comprende las secuencias CDR VH seleccionadas de aquellas de la tabla 3.

Tabla 2: Secuencia de aminoácidos VL CDR

Ab	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
15A7H	RSSQSIVHNDGNTYFE (SEQ ID NO:5)	KVSNRFS (SEQ ID NO:6)	FQGSYVPLT (SEQ ID NO:7)

Tabla 3: Secuencia de aminoácidos VH CDR

Ab	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
15A7H	SFGMH (SEQ ID NO:8)	YINGGSSTIFYANAVKG (SEQ ID NO:9)	YASYGGGAMDY (SEQ ID NO:10)

En una modalidad específica, un anticuerpo aquí descrito que se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 humano y que comprende: (i) una región variable de cadena liviana ("VL") que comprende una CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, y

7, respectivamente; (ii) una región variable de cadena pesada ("VH") que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10, respectivamente; y (iii) una región constante de cadena pesada de IgG4 que contiene una región de bisagra de IgG que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en la región de bisagra, donde dicho anticuerpo retiene la unión específica a dicho PSGL-1 y donde el recambio IgG4 es reducido respecto de una anticuerpo que comprende una región de bisagra de IgG4 que no comprende a dichas una o más sustituciones de aminoácido.

En una modalidad específica, un anticuerpo aquí descrito que se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 humano y que comprende: (i) una región de cadena VL que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 3; (ii) una región de cadena VH que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10, respectivamente; y (iii) una región constante de cadena pesada de IgG4 humana que contiene una región de bisagra de IgG4 que comprende una o más sustituciones de aminoácido en la región de bisagra, donde dicho anticuerpo retiene la unión específica a dicho PSGL-1 y donde el recambio de IgG4 se reduce respecto de un anticuerpo que comprende una región de bisagra de IgG4 que no comprende a dichas una o más sustituciones de aminoácido.

En una modalidad específica, un anticuerpo aqui descrito que se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 humano y que comprende: (i) una región de cadena VL que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 3; (ii) una cadena pesada que comprende región VH de cadena que comprende una CDR1

VH, CDR2 VH, y CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10, respectivamente; y (iii) una región constante de cadena pesada de una IgG4 humana que comprende una sustitución de aminoácido Serina por Prolina en la posición de aminoácido 228 de la cadena pesada enumerado de acuerdo al índice EU.

En una modalidad específica, un anticuerpo aquí descrito que se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 de humano y que comprende: (i) una región VL de cadena que comprende una CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 7, respectivamente; (ii) una región VH de cadena que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 4; y (iii) una región constante de cadena pesada de IgG4 humana que contiene una región de bisagra de IgG4 que comprende una o más sustituciones de aminoácido en la región de bisagra, donde dicho anticuerpo retiene la unión específica a dicho PSGL-1 y donde el recambio IgG4 es reducido respecto de un anticuerpo que comprende una región de bisagra de IgG4 que no comprende a dichas una o más sustituciones de aminoácido.

En una modalidad específica, un anticuerpo aquí descrito que se une de manera inmunoespecífica a PSGL-1 humano y que comprende: (i) una región de cadena VL que comprende una CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 7, respectivamente; (ii) una cadena pesada que comprende una región de cadena VH que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 4; y (iii) una región constante de cadena pesada de una IgG4 humana que comprende una sustitución de aminoácido

Serina por Prolina en la posición de aminoácido 228 de la cadena pesada enumerado de acuerdo al índice EU.

En modalidades específicas, un anticuerpo descrito aquí, es el que se une inmunoespecíficamente a PSGL-1, *por ejemplo*, a un polipéptido PSGL-1 humano de la SEQ ID NO: 11, que comprende regiones marco (*por ejemplo*, regiones marco del dominio VL y del dominio VH). Ejemplos no limitantes de regiones marco de humano se describen en el arte, *por ejemplo*, véase Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

La tabla 4, a continuación, presenta la secuencia de aminoácidos del marco VL (FR) (en particular, las secuencias FR1 VL, FR2 VL, FR3 VL, y FR4 VL) del anticuerpo 15A7H. La tabla 5, a continuación, presenta la secuencia de aminoácidos FR VH (en particular, las secuencias FR1 VH, FR2 VH, FR3 VH, y FR4 VH) del anticuerpo 15A7H.

Tabla 4: Secuencia de aminoácidos VL FR

Ab	VL FR1	VL FR2	VL FR3	VL FR4
15A7H	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC (SEQ ID NO: 13)	WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 14)	GVPSRFSGSGSGTHFTLTISSLQ PEDFATYYC (SEQ ID NO: 15)	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 16)

Tabla 5: Secuencia de aminoácidos VH FR

Ab	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FR4
15A7H	EVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 17)	WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO:18)	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 19)	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 20)

En ciertas modalidades, los anticuerpos IgG4 arriba descritos que tienen una mutación en la región de bisagra que reduce el recambio de IgG4 comprende las FR VL que tienen la secuencia de aminoácido descrita aquí (véase tabla 4). En modalidades específicas, un anticuerpo descrito aquí comprende

una región de cadena VL que comprende FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4 de las tablas 1 y 3.

En ciertas modalidades, los anticuerpos IgG4 arriba descritos que tienen una mutación en la región de bisagra que reduce el recambio IgG4 comprenden a las FR VH que tienen la secuencia de aminoácido aquí descrita (véase tabla 5). En modalidades específicas, un anticuerpo comprende una región de cadena VH que comprende FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4, de las tablas 2 y 4.

En otra modalidad específica, un anticuerpo monoclonal IgG4 aquí descrito comprende (i) una región de cadena VL que comprende FR1 VL, FR2 VL, FR3 VL, y FR4 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, 14, 15, y 16, respectivamente; y (ii) una región VH de cadena que comprende FR1 VH, FR2 VH, FR3 VH, y FR4 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 18, 19, y 20, respectivamente, y que tiene una mutación en la región de bisagra que reduce el recambio IgG4. En una modalidad específica, un anticuerpo aquí descrito comprende una región VL de cadena que comprende FR1 VL, FR2 VL, FR3 VL, y FR4 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 13, 14, 15, y 16, respectivamente. En otra modalidad específica, un anticuerpo aquí descrito comprende una región de cadena VH que comprende FR1 VH, FR2 VH, FR3 VH, y FR4 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID No: 17, 18, 19, y 20, respectivamente.

En modalidades particulares, la glicosilación de la región constante de los anticuerpos aquí descrita se puede modificar. Por ejemplo, una región constante aglicosilada de una anticuerpo puede ser preparada (es decir, en la región

constante de anticuerpo carece de glicosilación) o se puede preparar una región constante de un anticuerpo que comprende una mutación o una sustitución en uno o más sitios de glicosilación para eliminar la glicosilación en el uno o más sitios de glicosilación.

La glicosilación puede ocurrir a través de una glicosilación unida a N o una glicosilación unida a O (o unida a asparragina). La glicosilación unida a N involucra la modificación del carbohidrato en el grupo NH_2 de la cadena lateral de un aminoácido de asparragina en un polipéptido. La glicosilación unida a O involucre una modificación de carbohidrato en el grupo hidroxilo en la cadena lateral de un aminoácido serina, treonina, o hidroxilisina.

En ciertas modalidades, los anticuerpos aglicosilados pueden ser producidos en células bacterianas que carecen de la maquinaria de glicosilación necesaria. Las células que tienen una maquinaria de glicosilación alterada han sido descritas en el arte y pueden ser utilizadas como células huésped en las cuales se expresen anticuerpos recombinantes aquí descritos para producir de este modo un anticuerpo con una glicosilación alterada. Véase, por ejemplo, Shields, R.L. *et al.* (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana *et al.* (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, así como, Patente Europea No: EP 1.176.195; Publicaciones PCT WO 03/035835; WO 99/54342.

En ciertas modalidades, una o más modificaciones can pueden ser realizadas a la región Fc de un anticuerpo aquí descrito, generalmente, para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como vida media sérica, fijación de complemento, unión del receptor Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Estas

modificaciones son conocidas en la técnica, y se describen por ejemplo, en la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional WO No. 2008/153926 A2. Ejemplos de tales modificaciones incluyen, pero no están limitadas a: 1) alterar el número de residuos de cisteína en la región de bisagra para facilitar el ensamblaje de las cadenas liviana y pesada o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo; 2) mutar uno o más aminoácidos en el dominio CH2-CH3 de la región de interface del fragmento Fc-bisagra e un anticuerpo para disminuir la vida media biológica del anticuerpo; 3) reemplazar uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácido 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 de acuerdo al índice EU de Kabat con un residuo de aminoácido diferente de tal modo que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero mantenga la capacidad de unirse a antígeno del anticuerpo parental; y/o 4) modificar uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 de acuerdo al índice EU de Kabat para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ. Aquí se proveen anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo que se unen de manera inmunoespecífica a PSGL-1 y que pueden modular la actividad PSGL-1. En ciertas modalidades, un anticuerpo y un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo

proporcionado aquí se unen inmunoespecíficamente a PSGL-1 sin inhibir la unión de PSGL-1 a P-selectina, e induce la apoptosis de células T activadas. La actividad PSGL-1 puede relacionarse con cualquier actividad de PSGL-1 conocida o descrita en el arte, *por ejemplo*, activación de células T durante una respuesta inflamatoria. La actividad PSGL-1 o a función PSGL-1 se utiliza de manera intercambiable aquí. En ciertos aspectos, la actividad PSGL-1 inducida por el ligando PSGL-1 (*por ejemplo*, P-selectina) que se une a PSGL-1.

En ciertas modalidades, un anticuerpo anti-PSGL-1 o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí no bloquea o inhibe la unión de P-selectina a PSGL-1.

En una modalidad específica, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí reduce el reclutamiento de leucocitos durante una respuesta inflamatoria.

En ciertos aspectos, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí reduce o inhibe la sobrevida de células que expresan PSGL-1 y responde a la señalización de actividad PSGL-1 (por ejemplo, células que proliferan en respuesta a la estimulación de ligando PSGL-1, señalización PSGL-1 o unión a selectina), *por ejemplo*, induce la apoptosis en células T activadas. Ensayos de sobrevida celular se describen en el arte y se pueden realizar fácilmente por un experto en el arte. Por ejemplo, se puede evaluar la viabilidad celular usando tinción de azul tripan y otros marcadores de muerte o de viabilidad celular conocidos en el arte (*por ejemplo*, Anexina-1, yodo propidio (PI) o 7-AAD, véase Gerber A, Bohne M, Rasch J, Struy H, Ansorge S, Gollnick H., 2000. Investigation of annexin V binding to lymphocytes after

extracorporeal photoimmunotherapy as an early marker of apoptosis. Dermatology. 2000;201(2):111-7, Coder, D. M. 2001. Assessment of Cell Viability. Current Protocols in Cytometry. 9.2.1-9.2.14, y Muppidi, J., Porter, M. and Siegel, R. M. 2004. Measurement of Apoptosis and Other Forms of Cell Death. Current Protocols in Immunology. 59:3.17.1-3.17.36.).

En modalidades especificas, los anticuerpos aquí descritos se unen especificamente a PSGL-1 e inhiben (*por ejemplo*, inhiben parcialmente o completamente) la sobrevida de células T activadas ensayadas a través de métodos descritos aquí o conocidas por un experto en el arte (*por ejemplo*, ensayo de exclusión de azul de tripan, véase Coder, D. M. 2001. Assessment of Cell Viability. Current Protocols in Cytometry. 9.2.1-9.2.14). En algunas modalidades, el término "inhibe" o "inhibición" representa la reducción o prevención de la sobrevida de células T activadas. La sobrevida de células T activadas se puede reducir en alrededor de 10%, alrededor de 20%, alrededor de 30%, alrededor de 40%, alrededor de 50%, alrededor de 60%, alrededor de 70%, alrededor de 80%, alrededor de 90%, alrededor de 100%, alrededor de 125%, alrededor de 150% o más comparados con un control (por ejemplo, sobrevida de células T en ausencia de los anticuerpos descritos aquí o en presencia de un anticuerpo no especifico).

En ciertos aspectos, un anticuerpo anti-PSGL-1 descrito aquí es capaz de inducir la apoptosis (es decir, muerte celular programada) de células T activadas que expresan PSGL-1. Los ensayos de apoptosis se describen en el arte y se pueden realizar fácilmente por un experto en el arte (Véase, por ejemplo, Muppidi, J., Porter, M. and Siegel, R. M. 2004. Measurement of Apoptosis and Other Forms of Cell Death. Current

Protocols in Immunology. 59:3.17.1-3.17.36). El término "induce" o "que induce" representa el inicio de o un aumento de la apoptosis por sobre un nivel control. La apoptosis de células T activadas puede ser inducido en alrededor de 10%, alrededor de 20%, alrededor de 30%, alrededor de 40%, alrededor de 50%, alrededor de 60%, alrededor de 70%, alrededor de 80%, alrededor de 90%, alrededor de 100%, alrededor de 125%, alrededor de 150% o más comparado con un control (por ejemplo apoptosis de células T activadas en ausencia de anticuerpos aquí descritos o en presencia de un anticuerpo no específico).

Las células T y las líneas de células T que son adecuadas para ser usadas en los ensayos descritos aquí que se refieren a la actividad de PSGL-1 están fácilmente disponibles (*por ejemplo*, ARR, DU.528, Jurkat, H-SB2, RPMI 8402, CML-T1, Karpas 45, KE-37/SKW-3, SUP-T1, SUP-T3, MOLT 3/4, P12-Ichikawa, PF-382, CCRF-CEM, HPB-ALL, K-T1, TALL-1, MOLT 16/17, TALL-104, DND-41, Loucy, MOLT 13, Peer/Be13, HUT 78/H9, HUT 102, MT-1, DEL, JB6, Karpas 299, SU-DHL1, 12H5, 3DO54.8, 3DO11.10, 8DO51.15, o 3DO18.3) o pueden ser fácilmente identificadas utilizando métodos conocidos en el arte (Véase, *por ejemplo*, Thornton, A. M. 2003. Fractionation of T and B Cells Using Magnetic Beads. Current Protocols in Immunology. 55:3.5A.1-3.5A.11., Hathcock, K. 2001. T Cell Enrichment by Cytotoxic Elimination of B Cells and Accessory Cells. Current Protocols in Immunology. 00:3.3.1-3.3.5., Horgan, K., Shaw, S. and Boirivant, M. 2009. Immunomagnetic Purification of T Cell Subpopulations. Current Protocols in Immunology. 85:7.4.1-7.4.9., and Kanof, M. E. 2001. Purification of T Cell Subpopulations. Current Protocols in Immunology. 00:7.3.1-7.3.5). En modalidades particulares, las células o líneas de

células para ser usadas en ensayos de proliferación celular pueden expresar PSGL-1, ya sea endógenamente o recombinantemente. Las células o líneas celulares para ser usadas en los ensayos de viabilidad celular pueden expresar PSGL-1, endógenamente o recombinantemente, y ejercer cambios en la viabilidad celular en respuesta al ligando PSGL-1 o a la unión de anticuerpo anti-PSGL-1. Las células o líneas celulares para ser usadas en los ensayos de apoptosis pueden expresar PSGL-1, ya sea endógenamente o recombinantemente, y ejercer cambios en la apoptosis en respuesta a la unión del ligando PSGL-1 o del anticuerpo anti-PSGL-1. Preferentemente las células o líneas celulares son de humano (por ejemplo ARR, DU.528, Jurkat, H-SB2, RPMI 8402, CML-T1, Karpas 45, KE-37/SKW-3, SUP-T1, SUP-T3, MOLT 3/4, P12-Ichikawa, PF-382, CCRF-CEM, HPB-ALL, K-T1, TALL-1, MOLT 16/17, TALL-104, DND-41, Loucy, MOLT 13, Peer/Be13, HUT 78/H9, HUT 102, MT-1, DEL, JB6, Karpas 299, o SU-DHL1).

Los métodos para determinar la unión inmunoespecifica de un anticuerpo a su antígeno objetivo están fácilmente disponibles y descritos en el estado del arte. Por ejemplo, las afinidades y las propiedades de un anticuerpo por su antígeno objetivo, pueden ser determinadas por una diversidad de métodos de ensayo *in vitro* (ensayos basados en bioquímica o inmunología) conocidos en el arte tales como métodos de equilibrio (*por ejemplo*, ensayo inmuno-absorvente de enzima unida (ELISA), o radioimmunoensayo (RIA)), o cinética (*por ejemplo*, análisis Biacore™), y otros métodos tales como ensayos de unión indirecta, ensayos de unión competitiva, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), inmunoprecipitación, inmunoforesis en gel y cromatografía (*por*

ejemplo, filtración en gel). Estos y otros métodos pueden utilizar un marcador en uno o más de los componentes que se están examinando y/o utilizar una variedad de métodos de detección que incluye pero no están limitados a marcas cromo génicas, fluorescentes, luminiscentes, o isotópicas. En ciertas modalidades, el uso de marcas no es necesario, por ejemplo, los sistemas Biacore™ utilizan el fenómeno natural de resonancia de plasma de superficie (SPR) para entregar datos en tiempo real, sin el uso de marcadores.

En una modalidad especifica, los anticuerpos aquí descritos están aislados. En una modalidad especifica, los anticuerpos aquí descritos están purificados. En una modalidad particular, un anticuerpo descrito aquí es un anticuerpo monoclonal recombinante.

En una modalidad particular, aquí se provee un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo que ha sido modificado de una manera adecuada para fabricación a gran escala. Esto puede involucrar clonar secuencias de poli nucleótido que codifican los dominios necesarios de un anticuerpo anti-PSGL-1, de tal modo que uno o más CDR o FR, en un vector de expresión adecuado que también contiene las secuencias de poli nucleótido, que codifican regiones constantes adecuadas, de modo que se produce un anticuerpo completo. La secuencia de poli nucleótido proporcionada por los vectores de expresión son secuencias de nucleótido que pueden ser optimizadas para maximizar el rendimiento del anticuerpo y la estabilidad para las condiciones de fabricación en el cultivo celular y para los procesos de purificación.

6.2 Polinucleótidos

En ciertos aspectos, aquí se proveen polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo aquí descrito que se une de manera inmunoespecífica a un antígeno PSGL-1, y los vectores que comprenden a estos polinucleótidos recombinantes para las células huésped (*por ejemplo*, organismos microbianos, tales como *E. coli* y células de mamífero, tales como células de hibridoma murino, células CHO, y fibroblastos 3T3). Aquí se proveen polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótido que codifican a cualquiera de los anticuerpos o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo de los mismos que se proporcionan aquí, así como vectores que comprenden a tales secuencias de poli nucleótido, *por ejemplo*, vectores de expresión para su expresión eficiente en células huésped, *por ejemplo*, células de mamífero. En una modalidad específica, el poli nucleótido que comprende secuencias de nucleótido que codifican a cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo descritos aquí se aíslan o se purifican.

En aspectos particulares, proporcionados aquí se encuentran los polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótido que codifican anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo, que se unen de manera inmunoespecifica a PSGL-1 y que comprenden una secuencia de aminoácido como aquí se ha descrito.

En modalidades específicas, un poli nucleótido descrito aquí codifica para una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2.

Los polinucleótidos pueden comprender secuencias de nucleótido que codifican una cadena pesada que comprende a los FR VH y a los CDR de los anticuerpos aquí descritos (Véase, *por ejemplo*, tablas 2 y 4) y además comprende una mutación en la región de bisagra que reduce el recambio de IgG4.

También se proporcionan aquí polinucleótidos que codifican una cadena pesada de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 2, que se han optimizado, *por ejemplo*, mediante optimización de codón/ARN, reemplazo con secuencia señal heterólogas, y eliminación de elementos de inestabilidad de ARNm. También se provee aquí polinucleótidos que codifican una cadena liviana de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 1, el cual está optimizado, *por ejemplo*, mediante optimización de codón/ARN, reemplazo con secuencia señal heterólogas, y eliminación de los elementos de ARNm de inestabilidad. Os métodos para generar ácidos nucleicos optimizados que codifican un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo para la expresión recombinante introduciendo los cambios de codón y/o eliminando las regiones inhibidoras en el ARNm pueden ser realizadas adaptando los métodos de optimización descritos en, *por ejemplo*, Las patentes U.S. Nos. 5.965.726; 6.174.666; 6.291.664; 6.414.132; y 6.794.498, consecuentemente. Por ejemplo, los sitios de corte potenciales y los elementos de inestabilidad (*por ejemplo*, elementos ricos en A/T o A/U) dentro del ARN se pueden mutar sin alterar los aminoácidos codificados por la secuencia de nucleótidos para aumentar la estabilidad del ARN para la expresión recombinante. Las alteraciones utilizan la degeneración del código genético, *por ejemplo*, usando un codón alternativo para un aminoácido idéntico. En algunas modalidades, puede ser deseable alterar

uno o más codones para codificar una mutación conservadora, *por ejemplo*, un aminoácido similar con una estructura química similar y propiedades y/o funciones similares respecto del aminoácido original. Estos métodos pueden aumentar la expresión de un anticuerpo anti-PSGL-1 o de un fragmento de unión a antígeno del mismo respecto de la expresión de un anticuerpo anti-PSGL-1 codificado por los polinucleótidos que no han sido optimizados. Además, la secuencia de poli nucleótido pueden ser diseñadas para coincidir con el uso del codón preferido en la célula huésped, por ejemplo uso de codón en E. coli o uso de codón en CHO.

Una secuencia de polinucleótido optimizada que codifica un anticuerpo o de un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrita aquí puede hibridarse con una secuencia de polinucleótido no optimizada que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí. En modalidades específicas, una secuencia de nucleótido optimizada que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrita aquí hibridiza bajo condiciones de alta rigurosidad con una secuencia de polinucleótido no optimizada que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrita aquí. En una modalidad específica, una secuencia de nucleótido optimizada que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo hibridiza bajo condiciones de hibridación de alta rigurosidad, de rigurosidad intermedia o baja con una secuencia de nucleótido no optimizada que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrita aquí. La información respecto a condiciones de hibridación ha sido descrita, véase, *por ejemplo*,

publicación de la solicitud de patente US No. 2005/0048549 (*por ejemplo*, párrafos 72-73), la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Los polinucleótidos se pueden obtener, y la secuencia de nucleótido de los polinucleótidos puede ser determinada, por cualquier método conocido en el arte. Las secuencias de nucleótido que codifican anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo descritos aquí, y las versiones modificadas de estos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo pueden ser determinadas usando métodos bien conocidos en el arte, es decir, codones de nucleótidos que se sabe que codifican aminoácidos particulares son ensamblados de tal modo que generen un ácido nucleico que codifique al anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo. Un polinucleótido como este que codifica el anticuerpo puede ser ensamblado a partir de oligonucleótidos químicamente sintetizados (*por ejemplo*, como se describe en Kutmeier *et al.*, 1994, BioTechniques 17:242), lo cual, por ejemplo, involucra la síntesis de oligonucleótidos que se sobreponen, los que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que se hibrida y liga a aquellos oligonucleótidos, y luego la amplificación de los oligonucleótidos ligados a través de PCR. Diversos métodos para generar genes sintéticos a partir de oligonucleótidos son conocidos en el estado del arte.

Alternativamente, un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí puede ser generado a partir del ácido nucleico proveniente de una fuente adecuada (*por ejemplo*, un

hibridoma) usando métodos bien conocidos en el arte (*por ejemplo*, por métodos como PCR y otros métodos de clonamiento molecular). Por ejemplo, la amplificación por PCR que usa partidores sintéticos hibridizables a los extremos 3' y 5' de una secuencia conocida pueden ser llevados a cabo utilizando ADN genómico obtenido de células que producen el anticuerpo de interés, por ejemplo células de hibridoma. Dichos métodos de amplificación por PCR pueden ser utilizados para obtener ácidos nucleicos que comprenden la secuencia que codifica la cadena liviana y/o cadena pesada de un anticuerpo. Dichos métodos de amplificación por PCR se pueden usar para obtener ácidos nucleicos que comprenden la secuencia que codifica la región variable de cadena liviana y/o la región variable de cadena pesada de un anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados se pueden clonar en vectores para la expresión en células huésped y para un clonamiento posterior, por ejemplo, para generar anticuerpos quiméricos y humanizados. La cadena constante generalmente es kappa o lambda para la cadena liviana del anticuerpo, para la cadena pesada de anticuerpo esta puede ser, sin limitación, de cualquier isotipo de IgG (por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas) o de otras inmunoglobulinas, incluyendo variantes alélicas.

Si no se encuentra disponible un clon que contenga un ácido nucleico que codifique un anticuerpo particular, pero sea conocida la secuencia de la molécula de anticuerpo, entonces se puede sintetizar por vía química un ácido nucleico que codifique a la inmunoglobulina y clonarlo en vectores de clonamiento replicables utilizando un método bien conocido en el arte.

El ADN que codifica anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo descritos aquí puede ser fácilmente aislado y secuenciado utilizando procedimientos convencionales (*por ejemplo*, utilizando sondas de oligonucleótido que sean capaces de unirse específicamente a ácidos nucleicos que codifican las cadenas liviana y pesada de los anticuerpos). Una vez aislado, el AND se puede colocar en vectores de expresión, los cuales luego son transfectados a células huésped procariotas o eucariotas tales como células de *E. coli*, de levadura (Pichia, Saccharomyces) células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), células de mieloma (NS0), células de insecto o vegetales que de otra forma no producen la proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo en las células huésped recombinantes.

6.3 Células huésped y expresión recombinante de los anticuerpos

En ciertos aspectos, aquí se proporcionan células huésped que expresan de manera recombinante los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo descritos aquí y los vectores de expresión relacionados. Aquí se proporcionan vectores de expresión que comprenden polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo descritos aquí para la expresión recombinante en células huésped procariotas y eucariotas, preferentemente en células de mamífero. También se proporciona aquí las células huésped que comprenden a tales vectores de

expresión para expresar de manera recombinante los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo descritos aquí. En un aspecto particular, aquí se proporcionan métodos para producir un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí, que comprende expresar dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo a partir de una célula huésped.

La expresión recombinante de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí que se une de manera inmunoespecífica a un antígeno PSGL-1 involucra la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo. Una vez que el polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí ha sido obtenido, el vector para la producción del anticuerpo del fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo puede ser producido mediante tecnología de ADN recombinante utilizando técnicas bien conocidas en el arte. Por lo cual, los métodos para preparar un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo expresando un polinucleótido que contiene un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo que codifica la(s) secuencia(s) de nucleótido se describen aquí. Se pueden utilizar métodos que son bien conocidos por aquellos expertos en el arte para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican al anticuerpo o secuencias que codifican al fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo y señales de control transcripcional y traduccional adecuadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de AND recombinante *in vitro*,

técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. También se proporcionan vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótido que codifica un anticuerpo descrito aquí, una cadena pesada o liviana de un anticuerpo, un dominio variable de cadena pesada o liviana de un anticuerpo, o un fragmento de unión antígeno derivado del anticuerpo, funcionalmente unido a un promotor, en particular, a un promotor que proporciona expresión en una célula de mamífero. Estos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótido que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (Véase, *por ejemplo*, Publicaciones internacionales Nos. WO 86/05807 y WO 89/01036; y patente US No. 5.122.464) y dominio variable del anticuerpo se puede clonar en este vector para la expresión de la cadena pesada completa, la cadena liviana completa, o ambas cadenas liviana y pesada completas . Los vectores de expresión incluyen plasmidios, retrovirus, cósmidos, episomas derivados de EBV, cromosomas artificiales y similares. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se seleccionan para ser compatibles con la célula huésped. El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de las cadenas de anticuerpo a partir de una célula huésped. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina, un péptido heterólogo proveniente de una proteína que no es inmunoglobulina o un péptido artificial.

El vector de expresión es transferido a una célula huésped a través de técnicas convencionales conocidas en el arte (por ejemplo transfección mediada por liposoma, transfección mediada por policatión, fusión de protoplasto, microinyecciones, precipitación con fosfato de calcio,

electroporación, transferencia por vectores virales) y luego se cultivan las células transfectadas a través de técnicas convencionales para producir un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí. Por lo cual, aquí se proveen células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí, funcionalmente unido a un promotor heterólogo. En ciertas modalidades para la expresión of anticuerpos de doble cadena, se pueden co-expresar los vectores que codifican a ambas las cadenas liviana y pesada en la célula huésped para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla más adelante. En ciertas modalidades, una célula huésped contiene un vector que comprende un polinucleótido que codifica a ambas la cadena pesada y la cadena liviana de un anticuerpo descrito aquí, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En modalidades específicas, una célula huésped contiene dos vectores diferentes, un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada de un anticuerpo descrito aquí, o un fragmento del mismo (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno del mismo), y un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena liviana de un anticuerpo descrito aquí, o un fragmento del mismo (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno del mismo). En otras modalidades, una primera célula huésped comprende un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada de un anticuerpo descrito aquí, o un fragmento del mismo, y una segunda célula huésped comprende un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena liviana de un anticuerpo descrito aquí.

Se pueden utilizar una variedad de sistemas de expresión huésped - vector para expresar moléculas de anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo descritos aquí (Véase, *por ejemplo,* la patente US No. 5.807.715 y la patente US No. 7.604.800). Tales huésped-sistemas de expresión representan vehículos mediante los cuales se pueden producir las secuencias codificantes de interés y ser posteriormente purificadas, pero también representa las células que pueden, cuando son transformadas o transfectadas con las secuencias de nucleótido codificante adecuadas, expresar *in situ* una molécula de anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí. Estos incluyen pero no están limitados a microorganismos tales como bacteria (*por ejemplo, E. coli* y *B. subtilis*) transformados con ADN recombinante de bacteriófago, ADN plasmidial o ADN cosmidial vectores de expresión que contienen secuencias de anticuerpo codificantes o secuencias codificantes de fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo; levadura (*por ejemplo, Saccharomyces, Pichia*) transformada con vectores de expresión recombinantes de levadura que contienen secuencias de anticuerpo codificantes o secuencias codificantes de fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo; sistemas de célula de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (*por ejemplo,* baculovirus) que contiene secuencias de anticuerpo codificantes o secuencias codificantes de fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo; sistemas de célula vegetal (*por ejemplo,* de alga verde tal como *Chlamydomonas reinhardtii*) infectadas con vectores de expresión recombinantes de virus (*por ejemplo,* virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o

transformados con vectores de expresión plasmidio recombinantes (*por ejemplo,* plasmidio Ti) que contiene secuencias de anticuerpo codificantes o secuencias codificantes de fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo; o sistemas de célula de mamíferos (*por ejemplo,* células COS, CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa, y NIH 3T3) que portan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores y/o mejoradores derivados del genoma de células de mamíferos (*por ejemplo,* promotor de metalotioneina, promotor de inmunoglobulina, promotor de actina) o de virus de mamíferos (*por ejemplo,* el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7.5K del virus vaccinia, CMV, Virus Simio 40). Otros elementos reguladores para la expresión en células eucarióticas son las señales de poliadenilación tales como BGH polyA, SV40 tardío o temprano poliA. Alternativamente, se pueden usar señales de poliadenilación de inmunoglobulina u otros genes. En otra modalidad específica, las células eucarióticas, especialmente para la expresión de un anticuerpo monoclonal IgG4 descrito aquí, se usan para la expresión de un anticuerpo descrito aquí o fragmento de unión a antígeno del mismo. Por ejemplo, células de mamífero tales como células de ovario de hamster Chino (CHO), en conjunto con un vector tal como el principal elemento promotor del gen intermedio temprano de citomegalovirus humano es un Sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking *et al.*, 1986, Gene 45:101; and Cockett *et al.*, 1990, Bio/Technology 8:2). En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos aquí son producidos por células CHO o células NS0. En una modalidad específica, la expresión de las secuencias de nucleótido que codifican anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno derivados de

anticuerpo descritos aquí que se unen inmunoespecíficamente a un antígeno PSGL-1 es regulada por un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor específico de tejido.

En sistemas bacterianos, un número de vectores de expresión se pueden seleccionar de manera ventajosa dependiendo del uso que se pretende dar a la molécula de anticuerpo que está siendo expresada. Por ejemplo, cuando se ha de producir una gran cantidad de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo o de un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que son fácilmente purificados.

Además, una cepa de célula huésped puede ser seleccionada, la cual modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto del gen en la forma específica deseada. Tales modificaciones (*por ejemplo*, glicosilación) y el procesamiento de los productos de proteína puede ser importante para la función de la proteína. Células huésped diferentes poseen características y mecanismos específicos para el procesamiento post-traduccional y la modificación de proteínas y de productos génicos. Las líneas celulares o células huésped adecuadas se pueden elegir para asegurar la correcta modificación y procesamiento o que la proteína externa sea expresada. Para este propósito, se pueden usar células huésped eucarióticas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcripto primario, la glicosilación, y la fosforilación del producto génico. Tales células huésped de mamífero incluyen pero no

están limitadas a células CHO, VERO, BHK, Hela, COS, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produce alguna cadena de inmunoglobulina de manera endógena), CRL7030 y HsS78Bst. En ciertas modalidades, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo descritos aquí se producen en células de mamífero, tales como células CHO.

A largo plazo, se prefiere la expresión estable en la producción de alto rendimiento de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo recombinantes. Por ejemplo, es posible modificar por ingeniería genética líneas celulares de mamífero que expresan de maneta estable la molécula de anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación viral, es posible transformar células huésped con ADN controlado con elementos de control de expresión adecuados (por ejemplo, secuencias de promotor, de mejoradores, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Luego de la introducción del ADN extraño, es posible permitir que las células modificadas se cultiven por 1 a 2 días en medio no selectivo, y luego cambiarlas a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plasmidio recombinante confiere Resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plasmidio en sus cromosomas. Después del clonamiento de célula única, se expanden las células a líneas de producción celular. Este método se puede usar ventajosamente para modificar las líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo. Dichas líneas celulares modificadas pueden ser

particularmente útiles en la selección y la evaluación de composiciones que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Se pueden usar un número de sistemas de selección, incluyendo pero no limitado a, timidina quinasa de virus herpes simplex (Wigler et al., 1977, Cell 11:223), hipoxantinaguanina fosforibosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., 1980, Cell 22:8-17) genes que se pueden usar en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. También es posible usar Resistencia antimetabolito como la base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglicosido G-418 (Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; y Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; Mayo, 1993, TIB TECH 11(5):155-2 15); e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre et al., 1984, Gene 30:147). Se pueden aplicar de manera rutinaria métodos de tecnología de ADN recombinante que son comúnmente conocidos en el arte para seleccionar el clon recombinante deseado, y tales métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (eds.), Current Protocols in Human Genetics,

John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1, los cuales se incorporan como referencia aquí en su totalidad.

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo se pueden aumentar por medio de amplificación por vector (para una revisión, véase Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification para la expresión of cloned genes in mammal cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema del vector que expresa el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Debido a que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, también aumentará la producción del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

La célula huésped puede ser co-transfectada con dos o más vectores de expresión descritos aquí, el primer vector que codifica un polipéptido derivado de cadena pesada y el segundo vector codifica un polipéptido derivado de cadena liviana. Los dos vectores pueden contener marcadores de selección seleccionables idénticos o diferentes los cuales permiten la expresión suficiente de polipéptidos de cadena pesada y de cadena liviana. Las células huésped pueden ser co-transfectadas con cantidades diferentes de los dos o más vectores de expresión.

Alternativamente, se puede usar un único vector el cual codifica, y es capaz de expresar, ambos polipéptidos de cadena pesada y de cadena liviana. Las secuencias codificantes para las cadenas liviana y pesada puede comprender ADNc o ADN genómico. El vector de expresión puede ser monocistrónico o multicistrónico. Por ejemplo una construcción de ácido nucleico bicistrónica puede comprender en el siguiente orden un promotor, la cadena pesada de un anticuerpo descrito aquí), and una cadena liviana de un anticuerpo descrito aquí. En un vector de expresión como tal, la transcripción de ambas cadenas puede ser dirigida por el promotor, mientras que la traducción del ARNm desde la cadena pesada puede ocurrir a través de un mecanismo de barrido dependiente de "cap" y la traducción del ARNm desde la cadena liviana puede ser a través de un mecanismo de barrido independiente de "cap", por ejemplo, a través de IRES.

En algunas modalidades, las moléculas de anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo son producidas cultivando las células huésped por un período de tiempo suficiente para permitir la alta expresión de las moléculas en las células huésped. En algunas modalidades las moléculas son expresadas en células de mamífero, por ejemplo en células CHO en medio libre de suero o en un medio definido del punto de vista químico. En algunas modalidades, las moléculas de anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo son recuperados desde el medio de cultivo como un polipéptido secretado o puede ser recuperado desde lisados de la célula huésped si por ejemplo se expresa sin una señal secretora.

Una vez que una molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí se ha producido por medio de expresión recombinante, se puede purificar por cualquier método conocido en el arte para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por medio de cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, particularmente de afinidad por el antígeno específico luego de Proteína A, y por medio de cromatografía en columna de exclusión de tamaño), por centrifugación, solubilidad diferencial, precipitación, filtración, HPLC de fase reversa, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de las proteínas para obtener preparaciones de las moléculas sustancialmente homogéneas y biológicamente activas. Además, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo descritos aquí se pueden fusionar a secuencias de polipéptido heterólogas para facilitar la purificación.

En modalidades específicas, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí es aislado o purificado. Por ejemplo, en una modalidad particular, una preparación de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo descrito aquí se encuentra sustancialmente libre de material celular, componentes del medio y/o precursores químicos. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo en el cual el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo es separado de los componentes celulares de las células de las cuales es aislado o producido de manera recombinante. Cuando el

anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo es producido de manera recombinante, este también por lo general se encuentra sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de alrededor de 20%, 10%, 2%, 1%, 0.5%, o 0,1% del volumen de la preparación de proteína. Cuando se produce el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo por medio de síntesis química, por lo general está sustancialmente libre de precursores químicos o de otros productos químicos, es decir, es separado de los precursores químicos o de otros productos químicos que están involucrados en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, tales preparaciones del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo poseen menos de alrededor de 30%, 20%, 10%, 5% (en peso seco) de precursores químicos o de compuestos diferentes del anticuerpo de interés o del fragmento de unión a antígeno derivado del anticuerpo de interés.

6.4 Composiciones farmacéuticas

En la presente descripción se proveen composiciones, composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En aspectos particulares, las composiciones que aquí se describen se pueden aplicar en usos *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. En modalidades específicas, en la presente descripción se provee una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo. Tal como

que aquí se describen, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones terapéuticas que contienen un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que aquí se proveen, se pueden preparar para su almacenamiento, al mezclar el anticuerpo, que tiene el grado de pureza deseado, con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales, fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington: The Science y Practice of Pharmacy, 21st ed. (2006) Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD), en la forma de formulaciones o soluciones acuosas liofilizadas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores, a las dosis y las concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, citrato de sodio dihidrato y de otros ácidos orgánicos; y/o surfactantes no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Las composiciones, tal como aquéllas que se describen en la presente memoria descriptiva, también pueden contener más de un compuesto activo (por ejemplo, moléculas, como ejemplo, anticuerpo o anticuerpos, tal como se describe en la presente memoria descriptiva) necesarios para la indicación particular que se está tratando. En ciertas modalidades, las formulaciones comprenden un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se provee aquí, y uno o más compuestos activos con actividades complementarias, que no se ven adversamente afectados entre sí. Tales moléculas se encuentran apropiadamente presentes en combinación, en cantidades que son eficaces para el objetivo perseguido. Por

ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como aquí se describe, se puede combinar con uno o más agentes terapéuticos. Dicha terapia combinada se puede administrar al paciente en serie o simultánea o secuencialmente.

Las composiciones que se utilizan en la administración *in vivo* pueden ser estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de, por ejemplo, membranas estériles de filtración.

En aspectos específicos, las composiciones farmacéuticas que aquí se proveen contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como aquí se proporcionan, y, opcionalmente, uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones farmacéuticas son útiles en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno o enfermedad, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, tal como soriasis, o uno o más de sus síntomas. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad que es segura y suficiente para prevenir o tratar una enfermedad. Tal como se utiliza en la presente descripción, el término "tratar", "tratado," "tratando" o "tratamiento" se utiliza en la presente descripción para referirse a la provisión de un resultado clínico benéfico o deseado, en un paciente con una enfermedad. Los resultados clínicos benéficos o deseados incluyen, pero no se limitan a, el alivio de síntomas, disminución del alcance de la enfermedad, estabilizar (es decir, no empeorar) el estado de la enfermedad, retrasar o desacelerar la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad, y

remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la sobrevida en comparación con la sobrevida esperada si no se recibe tratamiento.

Los vehículos farmacéuticos adecuados para la administración de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se provee aquí, incluyen cualquier vehículo conocido por aquellos expertos en el arte, por ser adecuado para la forma de administración particular. En una modalidad, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo se formula en preparaciones farmacéuticas adecuadas, tal como soluciones o suspensiones estériles para administración parenteral.

Además, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que aquí se describe, puede estar formulado como el único ingrediente farmacéuticamente activo en la composición o se puede combinar con otros ingredientes activos (tal como uno o más agentes terapéuticos o profilácticos).

En las composiciones, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se provee aquí se mezcla con un vehículo o portador farmacéutico adecuado. Las concentraciones del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo en las composiciones puede, por ejemplo, ser eficaz para el suministro de una cantidad, después de su administración, que previene y/o trata un trastorno o enfermedad, tal como las que aquí se describen (por ejemplo, un desorden inflamatorio) o su síntoma.

En una modalidad, las composiciones están formuladas para administración de dosis única. Para formular una

composición, la fracción en peso del compuesto se disuelve, suspende, dispersa o se mezcla de otro modo, en un vehículo seleccionado, a una concentración eficaz, de tal manera que el trastorno se alivia, se trata o uno o más síntomas se mejoran.

En ciertos aspectos, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se provee en la presente descripción, está incluido en el vehículo farmacéuticamente aceptable, en una cantidad eficaz, suficiente para generar un efecto terapéuticamente útil en la ausencia de, o con mínimos o insignificantes efectos secundarios en el paciente tratado. Una concentración terapéuticamente eficaz se puede determinar empíricamente al probar los compuestos en sistemas *in vitro* e *in vivo*, por medio del uso de métodos de rutina y luego extrapolar las dosis en humanos a partir de ellos.

La concentración del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo en la composición farmacéutica dependerá, por ejemplo, de las características fisicoquímicas del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, el horario de las dosis y la cantidad administrada, así como de otros factores conocidos por aquellos expertos en el arte.

Las composiciones farmacéuticas, en otra modalidad, proveen una dosis de alrededor de 0,001 mg a alrededor de 100 mg de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, por kilo de peso corporal, diariamente. Las formas de dosis unitarias farmacéuticas se pueden preparar para proporcionar de alrededor de 0,001 mg a alrededor de 100 mg y/o una combinación de otros ingredientes esenciales opcionales, por forma de dosis unitaria. En una modalidad específica, el

anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo se formula con una concentración de 40 mg/mL.

El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo se puede administrar de una sola vez o se puede dividir en un número de dosis más pequeñas, para ser administradas a intervalos de tiempo. Se entiende que la dosis precisa y la duración del tratamiento es una función de la enfermedad o el trastorno que se tratan y que aquí se describen y se pueden determinar empíricamente, por medio del uso de protocolos de prueba conocidos o por extrapolación de los datos de los ensayos *in vivo* o *in vitro*. Cabe señalar que los valores de las concentraciones y las dosis también pueden variar con la severidad de la enfermedad o el trastorno a aliviar. Ha de entenderse, además, que para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosis específicas se pueden ajustar en el tiempo, según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas se proveen para su administración a humanos y animales, en formas de dosis unitarias, tal como soluciones o suspensiones parenterales estériles que contienen cantidades adecuadas de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en este documento. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, en una modalidad, se formula y administra en formas de dosis unitaria o formas de dosis múltiples. Las formas de dosis unitaria, tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a unidades físicamente discretas, adecuadas para pacientes animales y humanos, y envasados individualmente, como se conoce

en el arte. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno derivado del anticuerpo, suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, junto con el vehículo, portador o diluyente farmacéutico requerido. Ejemplos de formas de dosis unitaria incluye ampollas y jeringas. Las formas de dosis unitaria se pueden administrar en fracciones o varias de ellas. Una forma de dosis múltiples es una pluralidad de formas de dosis unitaria, envasadas en un solo recipiente, para ser administradas en forma de dosis unitaria segregada. Ejemplos de formas de dosis múltiples incluyen frascos, o botellas de medio litro o de galones. Por lo tanto, la forma de dosis múltiples corresponde a una multiplicidad de dosis unitarias que no están segregadas en el envase.

En ciertas modalidades, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo que aquí se describe se encuentra en una composición farmacéutica líquida. Las composiciones líquidas farmacéuticamente administrables pueden, por ejemplo, prepararse disolviendo, dispersando o, de otro modo, mezclando un anticuerpo que aquí se describe en un portador o vehículo, tal como por ejemplo, agua, una solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, glicoles, etanol, y similares, para formar de esta manera una solución o una suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica que se administrará también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes solubilizantes, agentes amortiguadores de pH y similares.

Métodos actuales de preparación de tales formas de dosis son conocidos o serán evidentes para los expertos en este

arte; por ejemplo, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington: The Science y Practice of Pharmacy, 21st ed. (2006) Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Se pueden preparar formas de dosis o composiciones que contengan un anticuerpo en el rango de 0,005% a 99,9%, donde el resto es un vehículo no tóxico. Métodos para la preparación de estas Composiciones son conocidos para los expertos en el arte.

La administración parenteral, en una modalidad, se caracteriza por la inyección, ya sea por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa, que también se contempla en la presente descripción. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para soluciones o suspensión en líquido, antes de la inyección, o como emulsiones. Las soluciones y emulsiones inyectables también contienen uno o más excipientes. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, una solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas a administrar también pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes taponamiento de una solución de pH, estabilizantes, agentes potenciadores de la solubilidad y otros agentes similares. Otras vías de administración pueden incluir la administración entérica, la administración intracerebral, la administración nasal, la administración intrarterial, administración intracardiaca, infusión intraósea, administración intratecal, infusión intravenosa, implantación subcutánea o inyección, la administración intramuscular,

administración intrarrectal administración intravaginal, administración intragástrica, administración intratraqueal, administración intraperitoneal y la administración intrapulmonar.

Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para inyección, productos solubles estériles y secos, tal como polvos liofilizados, listos para combinarse con un solvente, justo antes de su uso, y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser acuosas o no acuosas.

Si se administra por vía intravenosa, los vehículos adecuados incluyen una solución salina fisiológica o tampón fosfato salino (PBS), agua y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, tal como glucosa, polietilenglicol, polipropilénglicol y sus mezclas.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables utilizados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, soluciones tampón, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersión, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables. Los vehículos farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, propilénglicol de polietilenglicol para vehículos miscibles en agua; e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajustar el pH.

De forma ilustrativa, la infusión intravenosa o intraarterial de una solución acuosa estéril que contiene un anticuerpo es una forma eficaz de administración. Otra modalidad es una solución o suspensión acuoso u oleosa estéril,

que contiene un material activo inyectado, en caso necesario, para producir el efecto farmacológico deseado.

En una modalidad específica, una preparación farmacéutica comprende citrato de sodio, cloruro de sodio, ácido cítrico, polisorbato 80 y agua. En una modalidad específica, una preparación farmacéutica comprende citrato de sodio, cloruro de sodio, y ácido cítrico. En una modalidad específica, una preparación farmacéutica comprende 9,1 mM de citrato de sodio, 150 mM de cloruro de sodio y 0,9 mM de ácido cítrico. En una modalidad específica, una preparación farmacéutica comprende un anticuerpo o conjugado, que aquí se describen, con una concentración de 0,267 mM. En una modalidad específica, una preparación farmacéutica comprende 2,676 g/L de citrato de sodio, 8,766 g/L de cloruro de sodio, 0,2 g/L de polisorbato 80 y 0,189 g/L de ácido cítrico. En una modalidad específica, una preparación farmacéutica comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo que aquí se describe con una concentración de 40 g/L. Preferentemente, las anteriores preparaciones farmacéuticas tienen un pH de 6.0.

En otras modalidades, las composiciones farmacéuticas son polvos liofilizados, que se pueden reconstituir para su administración como soluciones, emulsiones y otras mezclas. También pueden ser reconstituidos y formulados como sólidos o geles.

El polvo liofilizado se prepara al disolver un anticuerpo, tal como el que se provee aquí, en un solvente adecuado. En algunas modalidades, el polvo liofilizado es estéril. El solvente puede contener un excipiente, que mejora la estabilidad, u otro componente farmacológico del polvo o de

la solución reconstituida, que se prepara a partir del polvo. Los excipientes que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, dextrosa, sorbital, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado. El solvente también puede contener una solución tampón, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otras solución tampón, conocida por aquellos expertos en el arte, donde en una modalidad, se encuentra a alrededor de un pH neutro. La posterior filtración estéril de las soluciones, seguida de la liofilización bajo condiciones estándares, conocidas por aquellos expertos en el arte, proporciona la formulación deseada. En una modalidad, las soluciones resultantes se repartirán en frascos para liofilización. Cada frasco contendrá una sola dosis o dosis múltiples del compuesto. El polvo liofilizado puede almacenarse en condiciones apropiadas, como de alrededor de 4°C a temperatura ambiente.

La reconstitución de este polvo liofilizado con agua para inyección proporciona una formulación para uso en administración parenteral. Para la reconstitución, se añade el polvo liofilizado a agua estéril u otro vehículo adecuado. La cantidad precisa depende del compuesto seleccionado. Tal cantidad puede determinarse empíricamente.

6.5 Métodos terapéuticos

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo que aquí se describen son útiles para tratar trastornos y enfermedades asociados con, o causados por (total o parcialmente) la mayor proliferación y/o número de células T activadas, en relación con la proliferación y/o el número de células T activadas que se encuentran en individuos

sanos o individuos que no padecen trastorno o enfermedad en particular. Tales enfermedades y trastornos son conocidos para un experto en el arte o pueden ser determinados por un técnico en el arte. En una modalidad específica, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo que aquí se describen son útiles para tratar una enfermedad o trastorno inflamatorio. En una modalidad, la enfermedad inflamatoria es una enfermedad autoinmune. En una modalidad específica, la enfermedad o trastorno inflamatorio es soriasis, soriasis en placas, artritis soriática, artritis reumatoidea, enfermedad de Crohn y espondilitis anquilosante.

Ejemplos no limitantes o no restrictivos de trastornos y enfermedades que se pueden tratar por medio del uso de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo, que aquí se describen incluyen soriasis, enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante , artritis (incluyendo artritis reumatoidea, artritis reumatoidea juvenil, osteoartritis y artritis soriática), diabetes mellitus, esclerosis múltiple, encefalomielitis, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmune, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica y dermatitis eczematosa), síndrome de Sjogren, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, diabetes tipo I, enfermedades inflamatorias del intestino, colitis ulcerosa, asma, asma alérgica, lupus eritematoso cutáneo, esclerodermia, vaginitis, proctitis, erupciones por medicamentos, reacciones de reversión de lepra, eritema nodoso leproso, uveítis autoinmune, encefalomielitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, pérdida de audición bilateral idiopática progresiva neurosensorial, anemia aplásica, anemia

pura de glóbulos rojos, trombocitopenia idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, síndrome de Stevens -Johnson, esprue idiopático, liquen plano, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveítis posterior, fibrosis pulmonar intersticial, alergias, tal como alergia atópica, SIDA, neoplasias de células T, como leucemias o linfomas.

Además, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo son útiles para prevenir y/o tratar ciertos trastornos y enfermedades asociados con, o causados por (total o parcialmente) por la mayor proliferación y/o número de células T activadas, en relación con la proliferación y/o el número de células T activadas que se encuentran en individuos sanos o individuos que no padecen trastorno o enfermedad en particular. Ejemplos no restrictivos de trastornos y enfermedades que se pueden prevenir y/o tratar por medio del uso de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpo que aquí se describe incluyen casos de enfermedad del huésped contra el injerto y casos de rechazo a trasplante (incluyendo rechazo de trasplantes utilizando tejidos alogénicos o xenogénicos) tal como trasplante de médula ósea, trasplante de hígado, trasplante de riñón o trasplante de cualquier órgano o tejido.

En consecuencia, en la presente descripción se proveen métodos para prevenir y tratar enfermedades y trastornos, por medio del uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En una modalidad específica, tales métodos comprenden la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente

eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En modalidades específicas, el anticuerpo administrado para tratar un trastorno o enfermedad, que aquí se describe, es 15A7H.

En una modalidad, "tratamiento" o "tratando" un trastorno o trastornos se refiere a una mejora de una enfermedad o trastorno, o al menos de unos de sus síntomas visibles. En otra modalidad, "tratamiento" o "tratando" se refiere a una mejora de al menos un parámetro físico medible, asociado con una enfermedad o trastorno, no necesariamente discernible por el sujeto. En aún otra modalidad, "tratamiento" o "tratando" se refiere a una inhibición de la progresión de una enfermedad o trastorno, ya sea físicamente, por ejemplo, por estabilización de un síntoma discernible, fisiológicamente, por ejemplo, por estabilización de un parámetro físico, o por ambos.

En modalidades específicas, el método de tratamiento que aquí se describe se encarga de la reducción o mejora de la progresión, severidad y/o duración de un trastorno o enfermedad tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En otras modalidades específicas, el método de tratamiento que aquí se describe reduce uno o más síntomas de un trastorno o enfermedad, tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

En una modalidad particular, un método para tratar un trastorno o enfermedad, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, puede lograr al menos uno, dos, tres, cuatro o más de los siguientes efectos, debido a la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un

anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva: (i) la reducción o mejora de la severidad del trastorno o enfermedad y/o uno o más síntomas asociados; (ii) una reducción en la duración de uno o más síntomas asociados con el trastorno o enfermedad; (iii) la prevención de la recurrencia del trastorno o enfermedad; (iv) la regresión del trastorno o enfermedad y/o uno o más síntomas asociados; (v) una reducción en la hospitalización de un paciente; (vi) la reducción en la duración de la hospitalización; (vii) el aumento en la sobrevida de un paciente; (viii) la inhibición de la progresión del trastorno o enfermedad y/o uno o más síntomas asociados; (ix) el aumento o la mejora del efecto terapéutico de otra terapia; (x) una reducción o la eliminación del trastorno o enfermedad; (xi) una reducción en la mortalidad; (xii) una reducción en la tasa de hospitalización; (xiii) la prevención del desarrollo o inicio de uno o más síntomas asociados con el trastorno o enfermedad.

En una modalidad, "prevención" o "prevenir" un trastorno o enfermedad se refiere al término o parcial inhibición del comienzo o desarrollo del trastorno o enfermedad.

En una modalidad específica, la enfermedad o el trastorno tratado de acuerdo con los métodos que aquí se describen es soriasis. Generalmente, se acepta que los linfocitos T juegan un papel trascendental en la patogénesis de la soriasis. En una modalidad específica, un método para tratar la soriasis comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de

anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En otra modalidad específica, un método para mejorar o prevenir uno o más síntomas de soriasis comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los síntomas de soriasis incluyen, pero no se limitan a, manchas rojas de la piel cubiertas de escamas plateadas, manchas levantadas de piel, manchas de pequeña escala en la piel, piel seca, piel agrietada, incluyendo pústulas y picazón en la piel; engrosamiento de uñas, uñas estriadas o con cavidades y rigidez e inflamación en las articulaciones.

En otra modalidad, la enfermedad o el trastorno tratado de acuerdo con los métodos que aquí se describen es la soriasis en placas. La soriasis en placas o soriasis vulgar es la forma más común de soriasis y se caracteriza por placas cutáneas eritematosas levantadas, fuertemente demarcadas, cubiertas por escamas plateadas. Existe una predilección de las lesiones por involucrar las superficies extensoras de las extremidades, la zona lumbosacra y el cuero cabelludo. Los correspondientes hallazgos histopatológicos incluyen infiltración celular inflamatoria significativa de la dermis y epidermis, aumento del número de vasos dilatados, y un engrosamiento sustancial de la epidermis con la diferenciación trastornada de queratinocitos e hiperqueratosis. Aproximadamente un tercio de los pacientes con soriasis en placas se clasifican como que padecen una enfermedad moderada o grave y son, por consiguiente, candidatos para terapia, más allá de tratamiento tópico.

En una modalidad específica, un método para tratar soriasis en placas comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En otra modalidad específica, un método para mejorar o prevenir uno o más síntomas de soriasis en placas comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los síntomas de soriasis en placas incluyen, pero no se limitan a, manchas rojas de la piel cubiertas de escamas plateadas, manchas levantadas de piel, manchas de pequeña escala en la piel, piel seca, piel agrietada, incluyendo pústulas y picazón en la piel; engrosamiento de uñas, uñas estriadas o con cavidades y rigidez e inflamación en las articulaciones.

En otra modalidad, el trastorno tratado de acuerdo con los métodos que aquí se describen es soriasis crónica en placas. En una modalidad específica, un método para tratar soriasis crónica en placas comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En otra modalidad específica, un método, que aquí se describe, es para mejorar o prevenir uno o más síntomas de la soriasis crónica en placas comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de

unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los síntomas de soriasis crónica en placas incluyen, pero no se limitan a, manchas rojas levantadas en la piel, simples o múltiples, que van desde el tamaño de una moneda a un mayor tamaño, en cualquier parte del cuerpo, incluyendo, pero no limitado a, rodillas, codos, regiones lumbosacra, cuero cabelludo y uñas.

En otra modalidad, el trastorno tratado de acuerdo con los métodos que aquí se describen es soriasis guttata. En otra modalidad específica, un método para tratar soriasis guttata comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En otra modalidad específica, un método para prevenir o mejorar uno o más síntomas de soriasis guttata comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los síntomas de soriasis guttata incluyen, pero no se limitan a, erupciones en forma de gota de agua de placas escamosas en la piel, seguidos de una infección, tal como una infección de garganta por estreptococos.

En otra modalidad, la enfermedad o el trastorno tratado de acuerdo con los métodos que aquí se describen es soriasis inversa. En una modalidad específica, un método para tratar soriasis inversa (también llamada soriasis intertriginosa y soriasis flexural) comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente

eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En otra modalidad específica, un método para prevenir o mejorar uno o más síntomas de soriasis inversa comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los síntomas de soriasis inversa incluyen, pero no se limitan a, áreas lisas, normalmente húmedas de la piel que son de color rojo e inflamadas, a diferencia de las escamas asociadas a la soriasis en placas, en una o más de las siguientes partes del cuerpo: axilas, ingle, debajo de los senos y en otros pliegues de la piel alrededor de los genitales y nalgas.

En otra modalidad, la enfermedad o el trastorno tratado de acuerdo con los métodos que aquí se describen es soriasis pustulosa. En una modalidad especifica, un método para tratar soriasis pustulosa comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En otra modalidad específica, un método que aquí se describe para prevenir o mejorar uno o más síntomas de soriasis pustulosa comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los síntomas de soriasis pustulosa incluyen, pero no se limitan a, ampollas llenas de pus, que varían en tamaño y ubicación, pero sobre todo en las manos y los pies.

En otra modalidad, la enfermedad o el trastorno tratado de acuerdo con los métodos que aquí se describen es soriasis eritrodérmica. En una modalidad específica, un método para tratar soriasis eritrodérmica comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En otra modalidad específica, un método que aquí se describe para prevenir o mejorar uno o más síntomas de soriasis eritrodérmica comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los síntomas de soriasis eritrodérmica incluyen, pero no se limitan a, enrojecimiento agresivo de la piel, periódico y generalizado y el desprendimiento de las escamas en hojas, en lugar de escamas pequeñas. El enrojecimiento y desprendimiento de la piel a menudo se acompaña de dolor intenso y picazón, aumento de la frecuencia cardiaca y fluctuación de la temperatura corporal.

En otra modalidad, la enfermedad o el trastorno tratado de acuerdo con los métodos que aquí se describen es soriasis reumatoidea. En una modalidad específica, un método para tratar soriasis reumatoidea comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En otra modalidad específica, un método que aquí se describe es para prevenir o tratar uno o más síntomas de soriasis reumatoidea comprende la administración a

un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los síntomas de soriasis reumatoidea, incluyen, pero no se limitan a, fatiga, pérdida de apetito, fiebre baja, inflamación de los ganglios, debilidad, dolor en las articulaciones de las muñecas, codos, hombros, caderas, rodillas, tobillos, dedos de los pies, mandíbula, manos, pies, dedos y/o cuello, rigidez matutina, dolor en el pecho cuando se respira (pleuresía), quemazón en el ojo, picazón, secreción y nódulos debajo de la piel, entumecimiento, hormigueo o ardor en las manos y pies.

En otra modalidad, la enfermedad o el trastorno tratado de acuerdo con los métodos que aquí se describen es la enfermedad de Crohn. En una modalidad específica, un método para tratar la enfermedad de Crohn comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En otra modalidad específica, un método que aquí se describe es para prevenir o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad de Crohn, comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los síntomas de la enfermedad de Crohn son, pero no se limitan a, dolor abdominal tipo cólico (área del vientre), fiebre, fatiga, pérdida de apetito, dolor al pasar las heces (tenesmo) agua y diarrea persistente, pérdida de peso involuntaria, estreñimiento, inflamación de los ojos,

fístulas (generalmente alrededor del área rectal que pueden causar drenaje de pus, moco o heces), dolor en las articulaciones, inflamación del hígado, úlceras en la boca, sangrado rectal y heces con sangre, protuberancias en la piel o llagas (úlceras) e inflamación de las encías.

En otra modalidad, la enfermedad o el trastorno tratado de acuerdo con los métodos que aquí se describen es espondilitis anquilosante. En una modalidad específica, un método para tratar la espondilitis anquilosante comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En otra modalidad específica, un método para mejorar o prevenir uno o más síntomas de la espondilitis anquilosante comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los síntomas de la espondilitis anquilosante incluyen, pero no se limitan a, dolor frecuente y rigidez en espalda baja y nalgas, columna vertebral y/o cuello; dolor y sensibilidad que se extiende a costillas, omóplatos, caderas, muslos y talones; inflamación del ojo (iridociclitis y uveítis), causando enrojecimiento, dolor de ojos, pérdida de visión, flotadores y fotofobia, fatiga y náuseas.

En otra modalidad, la enfermedad o el trastorno tratado de acuerdo con los métodos que aquí se describen es la diabetes mellitus. En una modalidad específica, un método para tratar la diabetes mellitus comprende la administración a un

paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En otra modalidad específica, un método para mejorar o prevenir uno o más síntomas de la diabetes mellitus comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los síntomas de la diabetes mellitus incluyen, pero no se limitan a, pérdida de peso, poliuria (orinar frecuentemente), polidipsia (aumento de la sed), polifagia (aumento del apetito), enfermedad cardiovascular, retinopatía diabética, neuropatía diabética, estado hiperosmolar no cetónico y cetoacidosis diabética.

En modalidades particulares, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que aquí se describe, se administra a un paciente que previamente ha recibido o se encuentra actualmente recibiendo una o más terapias.

En modalidades particulares, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que aquí se describe, se administra a un paciente que previamente ha recibido o se encuentra actualmente recibiendo una o más terapias. En otras modalidades particulares, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que aquí se describe, se administra a un paciente que es, o se sospecha que pueda ser resistente o refractario a una terapia anti-inflamatoria.

En ciertos aspectos, se proveen aquí métodos para aniquilar las células T en un individuo que así lo necesite, donde dicho método comprende la administración a dicho individuo de una cantidad eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En ciertos aspectos, se provee aquí métodos para inducir la apoptosis de las células T activadas, en un individuo que así lo necesite, donde dicho método comprende la administración a dicho individuo de una cantidad eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

En ciertas modalidades, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo que aquí se describe o una composición farmacéutica del mismo se puede administrar mediante cualquier método adecuado a un paciente que así lo necesite. Ejemplos no limitantes de métodos de administración incluyen infusión intravenosa, inyección o implante subcutáneo, por vía intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intrarrectal, intravaginal, intranasal, intragástrica, por vía intratraqueal, o entrega intrapulmonar y/o cualquier otro método de entrega o suministro físico, que aquí se describe o conocido en el arte. En una modalidad, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo o una composición farmacéutica del mismo se administra sistémicamente (por ejemplo, parenteralmente) a un paciente que así lo necesite. En otra modalidad, un anticuerpo o una composición farmacéutica del mismo se administra localmente (por ejemplo, intratumoralmente) a un paciente que así lo necesite. Cada dosis puede o no ser administrada por una vía de administración

idéntica. En algunas modalidades, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que aquí se describe, se puede administrar por múltiples vías de administración, simultáneamente o secuencialmente, con otras dosis del mismo (u otro) anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

Cuando una enfermedad o uno de sus síntomas está siendo tratado, la administración del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo típicamente se lleva a cabo después de la aparición de la enfermedad o sus síntomas. Cuando un síntoma de una enfermedad está siendo prevenido, la administración del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, típicamente se lleva a cabo antes de la aparición de los síntomas.

La dosis y frecuencia de la administración de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que aquí se describe, o una composición farmacéutica del mismo se administra de acuerdo con los métodos para prevenir y/o tratar, mientras se reducen al mínimo los efectos secundarios. La dosis exacta de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que aquí se describe, que se debe administrar a un sujeto en particular o una composición farmacéutica del mismo se puede determinar por parte de un médico, a la luz de los factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. Los factores que se deben considerar incluyen la severidad del estado de la enfermedad, la salud general del sujeto, edad y peso del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinación(es) con otros agentes terapéuticos o drogas, sensibilidades de reacción y tolerancia/respuesta a la terapia.

La dosis y frecuencia de la administración de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que aquí se describe, o una composición farmacéutica del mismo se puede ajustar a lo largo del tiempo, para proveer niveles suficientes del anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, o para mantener el efecto deseado.

La dosis precisa a utilizarse en la formulación también dependerá de la vía de administración y la seriedad de un desorden inflamatorio o enfermedad y se debe decidir de acuerdo al juico del médico y a las circunstancias de cada paciente.

Las dosis eficaces se pueden extrapolar de las curvas de respuesta-dosis, derivadas de los sistemas de ensayo en modelos animales o *in vitro*.

En una modalidad, la dosis de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que aquí se describe, que se administra a un paciente para prevenir y/o tratar una enfermedad o trastorno es típicamente de 0,001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal de un paciente. En otra modalidad, una dosis adecuada de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que es terapéuticamente eficaz para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad o trastorno, que aquí se describen, se encuentra en el rango de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal de un paciente.

En modalidades específicas, una "cantidad eficaz" de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que aquí se describe, se refiere a una cantidad de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo que es suficiente para lograr al menos uno, dos,

tres, cuatro o más de los siguientes efectos: (i) la reducción o mejora de la severidad de una enfermedad o trastorno que aquí se describen y/o uno o más síntomas asociados; (ii) la reducción en la duración de uno o más síntomas asociados con trastorno o enfermedad, tal como se describe en la presente memoria descriptiva; (iii) la prevención en la recurrencia de una enfermedad o trastorno; (iv) la regresión de una enfermedad o trastorno y/o uno o más síntomas asociados; (v) la reducción en la hospitalización de un paciente; (vi) la reducción en la permanencia en el hospital; (vii) el aumento en la sobrevida de un paciente; (viii) la inhibición de la progresión de una enfermedad o trastorno y/o uno o más síntomas asociados; (ix) el aumento o mejora del efecto terapéutico de otra terapia; (x) una reducción o eliminación de la enfermedad o el trastorno; (xi) una reducción en la mortalidad; (xii) una reducción en la tasa de hospitalización; (xiii) la prevención del desarrollo o aparición de uno o más síntomas asociados con una enfermedad o trastorno; y (xiv) la mejora en la calidad de vida, tal como se evalúa mediante métodos ampliamente conocidos en el arte, por ejemplo, cuestionarios. En algunas modalidades, una "cantidad eficaz", tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la cantidad de un anticuerpo que aquí se describe, para lograr un resultado específico, descrito en la Sección 6. *infra*. En ciertas modalidades, una cantidad eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo es de alrededor de 0,01 mg a alrededor de 1,000 mg.

En algunas modalidades, una dosis única de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que aquí se describen, se administra una o más veces a un paciente, para prevenir y/o tratar un trastorno o

enfermedad, tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

En modalidades particulares, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo o una composición farmacéutica del mismo se administra a un paciente de acuerdo con los métodos para prevenir y/o tratar un trastorno o enfermedad que se presenta en ciclos, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo o la composición farmacéutica se administra por un periodo de tiempo, seguido por un periodo de descanso (es decir, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo o la composición farmacéutica no se administra por un periodo de tiempo).

Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se provee aquí, se puede administrar antes de, simultáneamente o después de la administración de una o más terapias adicionales (por ejemplo, agentes) para su uso para prevenir y/o tratar el trastorno o enfermedad, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. El uso del término "en combinación" no restringe el orden en el cual un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo y una o más terapias adicionales se administran a un paciente. En modalidades específicas, las terapias se pueden administrar en serie o secuencialmente.

En otra modalidad específica, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que aquí se describe, se utiliza en combinación con una cantidad de otra terapia (tal como, por ejemplo, un agente antiinflamatorio) para prevenir y/o tratar una enfermedad o trastorno, tal como

se describe en la presente memoria descriptiva. En una modalidad específica, dicha combinación de terapias posee efecto sinérgico. En otras modalidades, tal combinación tiene un efecto acumulativo.

En una modalidad específica, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo y la terapia adicional permite el uso de dosis más bajas (por ejemplo, dosis bajo el punto óptimo) del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo y/o la terapia adicional y/o la administración menos frecuente del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que aquí se describe, o la terapia adicional a un paciente. En ciertas modalidades, la capacidad de utilizar dosis más bajas de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como aquí se describe, y/o de una terapia adicional y/o de administrar un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, o dicha terapia adicional reduce, menos frecuentemente, la toxicidad asociada con la administración de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, o de dicha terapia adicional, respectivamente, a un paciente, sin reducir la eficacia de un anticuerpo o de dicha terapia adicional, respectivamente, en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno o enfermedad tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En algunas modalidades, la administración de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que aquí se describe, en combinación con una terapia adicional da como resultado una mejor eficacia del anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que aquí se describe, y/o de dicha terapia

adicional, en prevenir y/o tratar un trastorno o enfermedad, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En algunas modalidades, la administración de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que aquí se describe, y uno o más terapias adicionales evitan o reducen los efectos secundarios adversos o indeseados que se asocian con el uso de cualquier terapia única.

En una modalidad específica, el sujeto al que se le administra un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo que aquí se describe es un animal (por ejemplo, un mono Cynomolgus o un ser humano). En una modalidad preferida, el sujeto al que se le administra un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, que aquí se describe, es un humano. En una modalidad específica, el sujeto al que se le administra un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo exhibe uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno, tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

6.6 Métodos en base a células

En la presente descripción se proporcionan métodos para inducir o potenciar la apoptosis en una célula que expresa PSGL-1, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo descrito en la presente memoria descriptiva. En una modalidad, la célula es una célula inmune. En una modalidad específica, la célula es una célula T. En una modalidad más específica, la célula es una célula T activada. Los métodos para detectar la apoptosis se describen en el arte y se pueden llevar a cabo fácilmente por un experto en el arte. En modalidades específicas, un método para inducir

o potenciar la apoptosis de las células T activadas que expresan PSGL-1 comprende poner en contacto las células con una cantidad eficaz de un anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, en donde la cantidad eficaz es suficiente para inducir o potenciar la apoptosis, tal como se evalúa mediante métodos conocidos por un experto en el arte.

La presente memoria descriptiva proporciona métodos para reducir o inhibir la sobrevida de las células que expresan PSGL-1, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo descrito en la presente descripción. En una modalidad, la célula es una célula inmune. En una modalidad específica, la célula es una célula T. En una modalidad más específica, la célula es una célula T activada. Ensayos de sobrevida celular se describen en el arte y se pueden llevar a cabo fácilmente por parte de un experto en el arte. Por ejemplo, la viabilidad celular se puede evaluar mediante el uso de la tinción de azul de tripan u otros marcadores de muerte celular (por ejemplo, tinción de anexina-5) o marcadores de viabilidad (por ejemplo, yoduro de propidio o exclusión 7-AAD) conocido en el arte. En modalidades específicas, un método para reducir o inhibir la sobrevida de las células T activadas que expresan PSGL-1 comprende poner en contacto las células con una cantidad eficaz de un anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, en donde la cantidad eficaz reduce o inhibe a la sobrevida de las células, tal como se evaluó mediante métodos conocidos para un experto en el arte (por ejemplo, ensayo de exclusión con azul de tripan o yodo propidio o exclusión 7-AAD).

6.7 Kits

En la presente descripción se provee un pack o kit farmacéutico, que comprende uno o más envases rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo que se proporcionan aquí. Opcionalmente asociada a dicho envase (s) se puede encontrar una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleje la aprobación por parte de la agencia de la fabricación, uso o venta para la administración humana.

En una modalidad específica, tal como se provee aquí, se encuentra un kit que comprende un primer recipiente o contenedor, que incluye un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En una modalidad específica, un kit comprende un primer recipiente que es un frasco que contiene dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, como un polvo estéril liofilizado con vacío, y el kit comprende, además, un segundo recipiente que comprende un fluido farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad específica, tal como se provee aquí, se encuentra un dispositivo de inyección que contiene un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En una modalidad específica se encuentra un dispositivo de inyección para el anticuerpo en soluciones estériles. En una modalidad específica, un dispositivo de inyección, tal como el que se provee aquí, en una jeringa.

También se proveen kits que se pueden utilizar en los métodos anteriores. En una modalidad, un kit comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, preferentemente un anticuerpo purificado, en uno o más envases o recipientes. En una modalidad específica, los kits que aquí se describen contienen un PSGL-1 sustancialmente aislado, como control. En otra modalidad específica, los kits que aquí se describen comprenden además un anticuerpo de control que no reacciona con PSGL-1. En otra modalidad específica, los kits que aquí se describen contienen uno o más elementos para detectar la unión de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo a PSGL-1 (*por ejemplo*, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo se pueden conjugar en un sustrato detectable, tal como un compuesto fluorescente, un sustrato enzimático, un radiocompuesto activado, un compuesto luminiscente o un segundo anticuerpo, que reconoce al primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo. En modalidades específicas, el kit puede incluir un PSGL-1 producido recombinantemente o sintetizado químicamente. El PSGL-1 proporcionado en el kit también puede estar unido a un soporte sólido. En una modalidad más específica, los medios de detección del kit descrito anteriormente incluyen un soporte sólido al que está unido el PSGL-1. Dicho kit puede también incluir un anticuerpo anti-humano no unido a una molécula reportera o indicadora. En esta modalidad, la unión del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno derivado de anticuerpo, un PSGL-1 se puede detectar mediante la unión de

dicho anticuerpo marcado con una molécula reportera o indicadora.

7. EJEMPLOS

Los ejemplos en esta sección (*es decir*, sección 6) se ofrecen a modo de ilustración, y no a modo de limitación.

7.1 Ejemplo 1: Generando los anticuerpos monoclonales anti-PSGL-1

Las regiones variables de cadena pesada y cadena liviana de 15A7 humanizado descrito en la Publicación de Solicitud Internacional WO 2005/110475, publicada el 24 de Noviembre, de 2005, la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad. El anticuerpo h15A7 posee un isotipo de anticuerpo IgG4 con una cadena liviana tipo kappa. Se introdujo una mutación de Ser228 → Pro228 por medio de PCR usando partidores mutagénicos en la región de bisagra de h15A7. La mutante de bisagra resultante de h15A7 se denomina aquí como 15A7H. El resto de la secuencia de proteína de 15A7H es idéntica a h15A7. La secuencia de aminoácido de 15A7H se muestra en la Figura 7 A-B y se describe en las SEQ ID NO: 1 y 2. Las secuencias de genes que codifican las cadenas liviana y pesada del anticuerpo fueron introducidas en vectores de expresión eucariótica derivado del vector pAD-CMV1 (descrito en la EP 393 438)

Se generó 15A7H usando métodos conocidos en el arte. Brevemente, fueron co- transfectados vectores de expresión recombinante que codifican los marcadores de selección dihidrofolato reductasa (DHFR) y neomicina fosfotransferasa

además de la cadena liviana y la cadena pesada para 15A7H, respectivamente, en la suspensión de células huésped adaptadas CHO-DG44. La selección de células transfectadas establemente ocurrió dos días después de la transfección en medio selectivo de hipoxantina/libre de timidina y con adición del antibiótico G418. Una vez que las células se recuperaron de la selección inicial, se indujo una amplificación génica basada en DHFR por medio de la adición de metotrexato. Se desarrollo línea celular de producción monoclonal de 15A7H por depósito único de células usando una célula huésped CHO-DG44. Para la producción del anticuerpo15A7H, se expandieron las células para inóculo para la producción en biorreactor. Se realizó la producción en biorreactor en un modo de lote alimentado por 8 a 14 días. Para soportar la producción de anticuerpo y para prolongar el período de producción de cultivo celular, se agregó un medio nutriente de alimentación durante la etapa de producción. Se cosechó el caldo de cultivo celular por centrifugación y filtración terminal para eliminar de manera eficiente las células, proporcionando un fluido de cultivo libre de células (CCF) para la purificación posterior del producto. Luego de remover las células durante la cosecha, se purificó la proteína a través de cromatografía de afinidad con proteína A y con cromatografía de intercambio aniónico y catiónico. Además, se incluyeron dos etapas robustas de depuración de virus, una etapa de inactivación viral a pH bajo y una etapa de nanofiltración para la remoción del virus.

Se determinó la pureza de 15A7H por el método de electroforesis capilar en gel. Se desnaturaron las muestras con SDS (dodecil sulfato de sodio) y se separaron basado en el tamaño en un capilar relleno con un tampón gel que actúa como

un medio de tamiz. En muestras reducidas, se reducen los enlaces de disulfuro con 2-mercaptoethanol, lo que resulta en picos separados para las cadenas liviana y pesada del anticuerpo. En muestras no reducidas, se agregó yodoacetamida, un agente alquilante para evitar cualquier fragmentación inducida por la preparación de la muestra y para asegurar que el pico principal de IgG se mantiene intacto.

Las muestras fueron inyectadas electrocinéticamente y las proteínas movilizadas fueron detectadas por absorbancia UV a 200 nm usando un detector UV. Para muestras reducidas, se informaron los porcentajes de área corregida en el tiempo (TCA %) de la suma de cadena pesada y liviana (% LC+HC). El valor posible de informar para las muestras no reducidas es el TCA% del pico principal de IgG.

Una cantidad menor de medias moléculas de anticuerpo fue detectada por medio de electroforesis de gel en capilar no reductora (CGE) (Figura 1) indicando que la mutación de Ser228 → Pro228 disminuyó de manera importante la formación del enlace de disulfuro intra-cadena en la región de bisagra. La cantidad de medias moléculas de anticuerpo se redujo de ~8-10% para h15A7 hasta menos de 1% para 15A7H.

Una formulación para 15A7H se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6: Formulación de 15A7H

Componentes	Concentración [mmol/L]	Concentración [g/L]	Propósito del componente
Citrato de sodio dihidrato $C_6H_5Na_3O_7 \times 2\ H_2O$	9,1	2,676	Componente tampón
Cloruro de sodio	150	8,766	Agente de Tonicidad
Polisorbato 80	----	0,2	Estabilizante
Ácido cítrico monohidrato $C_6H_8O_7 \times H_2O$	0,9	0,189	Componente tampón
15A7H	0,267	40	Ingrediente Activo
Agua para inyección (WFI)	----	agregar WFI a un volumen final de 1,0 L	Solvente

El pH de la formulación es 6,0.

7.2 Ejemplo 2: Unión de anticuerpos 15A7H sobre células T humanas primarias activadas

Se examinó 15A7H para la unión en células T $CD4^+$ primarias humanas activadas.

7.2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular y Activación de células T Se cultivaron células T CD4+ de sangre periférica a 37°C a 1x106 en medio RPMI completo y se estimularon por 2 días y se agregó 20 µg/ml de PHA-L (Sigma, Catálogo # L2769). Se incubaron las células por otros cuatro a cinco días a 37°C con 20 ng/ml de IL-2 (R&D systems, Catálogo #RD202-IL) para producir "células T CD4+ activadas".

Ensayo de unión celular: Se contaron células T CD4+ humanas activadas y se plaquearon a $1x10^5$ células/100 µl en tampón FACS en una placa de cultivo de 96 pocillos de fondo

redondo (Falcon BD, Catálogo # 353263) y se incubaron en hielo por 30 minutos.

Se diluyeron la IgG4 control isotipo anti-lisozima, h15A7 and 15A7H hasta 90 ug/ml en tampón FACS en una placa de dilución de fondo plano (Falcon, Catálogo # 353077). Se prepararon once diluciones seriadas de tres veces de las preparaciones de anticuerpo para cada anticuerpo a lo largo de la placa con una concentración de partida de 30 ug/ml.

Se peletearon y resuspendieron muestras de células en duplicado en 100µl de cada dilución de anticuerpo para una concentración de partida inicial de 30 µg/ml. Se incubaron las células en hielo por 60 minutos. Se peletearon las células y se lavaron con el tampón de lavado seguido de la adición de 100 µl de anticuerpo secundario conjugado diluido de F(ab)2 de Cabra anti-Ig humanas con R-PE. El anticuerpo secundario conjugado de F(ab)2 de Cabra anti-Ig humanas con R-PE (BD Biosciences, Catálogo # 554655; stock a 1,05 mg/ml) fue previamente diluido 1:800 en tampón e FACS, las células fueron incubadas en hielo por 30 minutos en oscuridad luego peleteadas y lavadas un par de veces con el tampón de lavado. Se resuspendieron las células en 150 µl de tampón de lavado y se fijaron con adición de 50 µl de citofix BD /Tampón de fijación Cytoperm (BD Biosciences, Catálogo# 554655).

Se analizaron las muestras en el analizador de arreglos BD FACS Array Bioanalyzer. Se adquirieron alrededor de 5000 eventos usando el citómetro de flujo BD FACS Array para cada muestra celular con una puerta para "linfocito" fijada de acuerdo a SSC y FSC y la fluorescencia media que fue determinada para cada muestra.

Análisis de los Datos: Se determinaron la afinidad de unión del anticuerpo IgG4 anti-lisozima, h15A7 y 15A7H a células T CD4+ activadas graficando la concentración de anticuerpo versus el índice de fluorescencia media (MFI) para cada muestra en duplicado usando XLfit (modelo: dosis respuesta de un sitio, 205). Se determinaron los valores de EC50 para cada curva de unión.

7.2.2 RESULTADOS:

Unión a células T Humanas activadas: Usando citometría de flujo, se determine la unión de 15A7H a células T CD4+ humanas activadas. La Figura 2 demuestra que 15A7H se une con un EC50 de 0,22 nM.

Datos de unión de agregado desde múltiples donantes demuestra que 15A7H se unió a células T CD4+ activadas con una EC50 media de 0,22 +/- 0,02. Los valores de EC50 provenientes de 4 donantes fueron usados para calcular Media +/- SEM. Se ensayó el anticuerpo h15A7 bajo las mismas condiciones y se unió a células T CD4+ activadas con una EC50 media de 0,27 +/- 0,05. Por lo cual, 15A7H y h15A7 demuestran una unión comparable a células T activadas (véase la Tabla 7).

Tabla 7: Ensayo de unión a células T CD4+ activadas.

EC50 (nM)	Media +/- SEM
15A7H	0,22 +/- 0,02
h15A7	0,27 +/- 0,05

7.3 Ejemplo 3: Actividad *in-vivo* de 15A7H de hipersensibilidad tipo retardada *trans-vivo* de humano en modelo de ratón

Se ensayó 15A7H en el modelo de hipersensibilidad tipo retardada *trans-vivo* (DTH) en ratones hembra C57BL/6. Se administraron por vía i.p. las dosis de 0,03, 0,10, 0,3, 1 y 10 mg/kg de 15A7H en un tampón de formulación. Se ensayó el anticuerpo h15A7 bajo las mismas condiciones.

7.3.1 MATERIALES Y METODOS

Ensayo Trans Vivo: Se adquirieron ratones hembras C57BL/6 desde Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, Indiana) de 6 a 8 semanas de edad y se usaron dentro de cuatro semanas desde su llegada. Todos los ratones se albergaron en un ambiente libre de patógenos, y se trataron de acuerdo a las directrices NIH. Todos los experimentos en animales fueron revisados por y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso Animal (IACUC) y se llevaron a cabo de conformidad con la directriz NIH, "*Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings.*"

Se recolectó sangre por medio de veni-punción desde donantes humanos normales que se sabía eran buenos respondedores al tétano. Se retiró cien ml de sangre total en tubos CPT Vacutainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y se rotaron a 1800 RCF por 30 min. La capa leucocitaria que contiene las células mononucleares y las plaquetas fue separada, lavada tres veces, y resuspendida en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y contada. La contaminación de plaquetas fue minimizada por múltiples lavados en PBS. No se permitió más de una razón 1:1 de plaquetas a PBMC. Las células fueron inmediatamente inyectadas en las plantas de los ratones.

Se utilizó toxoide tetánico adsorbido en fosfato de aluminio (TT-Tetguard) a una concentración de 0,25 Lf por sitio de inyección (la unidad Lf es el valor de floculación, la cantidad de toxoide que cuando se mezcla con una unidad Internacional de antitoxina produce una mezcla de floculación óptima).

Se inyectaron 7 a 10 X 10^6 PBMC mezclados con 0,25 unidades Lf de TT en un volumen total de 50 µl, en las plantas traseras de los ratones. El grosor de la planta se midió antes de la inyección y a las 24 horas post-inyección, usando un calibre indicador de grosor (Mitutoyo, Aurora, IL). El grosor previo a la inyección se restó del grosor después de la inyección a las 24 horas para obtener el cambio en el grosor de la pata. Todas las mediciones se realizaron en pulgadas.

Ensayo de 15A7H y h15A7: Se disolvieron 15A7H y h15A7 (10 mg/ml de stock) en un vehículo que contiene citrato de sodio 25 mM y cloruro de sodio 115 mM con Tween 80 0,04%, pH 5,97. Se inyectaron los ratones i.p. con 0,2 ml de vehículo o 15A7H o h15A7 a 0,03, 0,1, 0,3, 1, y 10 mg/kg, una hora antes de las inyecciones en las plantas con PBMC con o sin TT. Cada dosis de anticuerpo 15A7H y h15A7 fue ensayado en los PBMC provenientes de cuatro donantes diferentes y se usó un ratón por tratamiento por donante. Los grupos de tratamiento 15A7H y h15A7 fueron comparados con el grupo tratado con vehículo.

Estadísticas: Todos los valores se informan como la media ± SEM a menos que se indique de otra forma. Los cambios en el grosor de la planta en el grupo tratado con la droga fue comparado con el grupo tratado con vehículo. Se combinaron el delta de grosores de las patas de 4 experimentos individuales de donantes y se calculó la media ± SEM. El porcentaje de

inhibición del grosor de la pata se calculó como sigue: 100 X (Δ grosor de la $pata_{veh}$ - Δ grosor de la $pata_{droga}$) / (Δ grosor de la $pata_{veh}$ - Δ grosor de la $pata_{PBMC}$). Se probó la significancia de los efectos inhibidores usando Kruskal-Wallis un Análisis de una vía de la Varianza (ANOVA) en Rangos. Se considera que un valor de p inferior a 0,05 era estadísticamente importante.

Niveles Plasmáticos de 15A7H y h15A7 en ratones C57BL/6: se determinaron los niveles plasmáticos de 15A7H y h15A7 a 0,03, 0,1, 0,3, 1, y 10 mg/kg, 24 horas después de la inyección intraperitoneal en ratones hembra C57BL/6. Las muestras de plasma se recolectaron a partir de animales experimentales *trans-vivo* DTH al término del experimento. Se realizó el bioanálisis en todas las muestras.

Estudio farmacocinético Satélite de 15A7H: Se usaron ratones hembra satélite C57BL/6 recibiendo dosis intraperitoneales de 15A7H (los mismos niveles de dosis que antes) para recolectar los datos que son más intensos respecto de las concentraciones en plasma de 15A7H. Estos ratones no fueron tratados con PBMC humanos o toxoide tetánico. Los tiempos de muestreo para estos ratones "PK" fueron 1, 3, 5, y 24 h después de la dosificación. Cada grupo de dosis de ratones PK consistió de 6 ratones. Dentro de cada grupo de dosis, se usó un subgrupo de 3 ratones para el muestreo a la 1a hora y 5 horas, y otro subgrupo de 3 ratones se uso para el muestreo a las 3 y 24 horas.

Bioanálisis de h15A7 y 15A7H: Se usó un ELISA sandwich para cuantificar las concentraciones de h15A7 o 15A7H en el plasma de ratones. Brevemente, se usaron placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con PSGL-1 para unir

h15A7 o 15A7H en la muestra de plasma diluida. Después de lavar, se detectó h15A7 o 15A7H unido con un anticuerpo monoclonal IgG_4 anti-humano marcado con biotina y enzima marcada con (HRP)-estreptavidina. Se midió la cantidad de producto coloreado formado durante la reacción del sustrato fotométricamente y esta aumentó con el aumento de la concentración de h15A7 o 15A7H en la muestra. La concentración de h15A7 o 15A7H que corresponde a la absorbancia óptica medida se calculó por medio de ajuste de datos de la curva estándar no lineal. El rango de las muestras de calibración fue de 0,04 a 1,2 ng/mL. Las muestras se diluyeron al menos 1:100. Por lo cual, el límite inferior de cuantificación de h15A7 o de 15A7H en el plasma complete fue de 4 ng/mL. Usando factores de dilución mayores es posible aumentar el límite superior de la cuantificación hasta 2,4 mg/mL (1:2000000).

Debido a las leves diferencias de la reactividad del material de referencia de h15A7 y 15A7H en el ELISA, se usaron dos curvas de calibración y dos conjuntos de controles de calidad. Se analizaron las muestras de animales tratados con h15A7 versus la curva de calibración de h15A7, y las muestras de animales tratados con 15A7H se analizaron versus la curva de calibración de 15A7H.

7.3.2 RESULTADOS

***TRANS VIVO* DTH:** La Figura 3 muestra la dosis respuesta combinada de 15A7H anticuerpo en *trans vivo* DTH en 4 PBMC de donante tal como se muestra por el porcentaje de inhibición de DTH luego del tratamiento con 15A7H. Cuando los ratones fueron dosificados i.p. a -1 hora, con 0,03, 0,1, 0,3, 1, y 10 mg/kg,

ambos h15A7 y 15A7H inhibieron el *trans vivo* DTH en una manera dependiente de la dosis. La Tabla 8 muestra la dosis respuesta y el porcentaje de inhibición de 15A7H y h15A7 en *trans-vivo* DTH. Una dosis única de 15A7H o h15A7 a 0,3 mg/kg y superior, mostró una inhibición importante de *trans vivo* DTH. La ED_{50} para h15A7 y 15A7H en este ensayo fue de 0,09 y 0,1 mg/kg respectivamente, n = 4 donantes.

Tabla 8: Dosis respuesta y % de inhibición de DTH en *trans-vivo*

Delta (pulg.)		Media	SEM	n
	PBMC	0,0005	0,0000	4
	Vehiculo	0,0090	0,0010	4
	h15A7 0,03 mpk	0,0061	0,0007	4
	h15A7 0,1 mpk	0,0047	0,0008	4
	h15A7 0,3 mpk	0,0033	0,0006	4
	h15A7 1 mpk	0,0018	0,0003	4
	h15A7 10 mpk	0,0009	0,0001	4
	15A7H 0,03 mpk	0,0060	0,0007	4
	15A7H 0,1 mpk	0,0049	0,0006	4
	15A7H 0,3 mpk	0,0040	0,0010	4
	15A7H 1 mpk	0,0024	0,0006	4
	15A7H 10 mpk	0,0012	0,0004	4
% de inhibición				
	Vehiculo	0,00	0,00	4
	h15A7 0,03 mpk	33,31	6,67	4
	h15A7 0,1 mpk	51,02	2,52	4
	h15A7 0,3 mpk	67,83	4,26	4
	h15A7 1 mpk	85,14	3,17	4
	h15A7 10 mpk	95,43	1,41	4
	15A7H 0,03 mpk	35,56	3,25	4
	15A7H 0,1	47,95	2,88	4

	mpk			
	15A7H 0,3 mpk	61,20	5,62	4
	15A7H 1 mpk	79,15	5,19	4
	15A7H 10 mpk	91,32	4,94	4

CONCENTRACIONES PLASMATICAS DEL COMPUESTO: Las concentraciones plasmáticas de 15A7H para ambos ratones satélite PK y DTH se resumen en la Figura 5. La Figura 4 muestra las concentraciones plasmáticas combinadas de 24 horas de 15A7H graficado contra él % de inhibición de DTH. Nótese que las concentraciones medias a las 24 horas después de la dosificación para los ratones PK y DTH para un nivel de dosis determinado fueron muy similares. Esto sugiere que, a pesar que los ratones PK y DTH fueron tratados de manera diferente (solo los ratones DTH recibieron los PBMC y toxoide tetánico), las farmacocinéticas de 15A7H en los dos casos fueron muy similares. Las concentraciones en plasma de ambos h15A7 y 15A7H fluctuaron solo dentro de un rango bastante estrecho en el transcurso de tiempo del estudio (mediciones de la concentración entre 1 y 24 horas después de la dosificación).

PK-PD: La Tabla 9 y la Tabla 10 muestran las concentraciones en plasma a las veinticuatro horas (PK) de los anticuerpos h15A7 y 15A7H y el correspondiente porcentaje de inhibición de *trans- vivo* DTH (PD) a las mismas dosis. La Figura 4 compara la relación PK-PD de 15A7H en el modelo *trans- vivo* DTH. Se calcularon las ED_{50} para h15A7 y 15A7H siendo de 687 y 770 ng/ml respectivamente, n = 4 donantes.

Tabla 9: Relación PK-PD en el modelo *trans- vivo* DTH.

(A) Famacocinética (PK) ng/ml			
Dosis	Mean	SEM	n

de h15A7 mg/kg, i.p.			
0,03	111	12	4
0,1	618	64	4
0,3	2320	172	4
1	9355	642	4
10	67668	23686	4
(B) Farmacodinamia (PD) % de inhibición			
Dosis de h15A7 mg/kg, i.p.	Mean	SEM	n
0,03	33	7	4
0,1	51	3	4
0,3	68	4	4
1	85	3	4
10	95	1	4

Tabla 10: Relación PK-PD en el modelo *trans- vivo* DTH.

(A) Famacocinética (PK) ng/ml			
dosis 15A7H mg/kg, i.p.	Media	SEM	n
0,03	228	20	4
0,1	708	79	4
0,3	1968	228	4
1	6163	469	4
10	54725	13612	4
(B) Farmacodinamia (PD) % de inhibición			
dosis 15A7H mg/kg, i.p.	Media	SEM	n
0,03	36	3	4
0,1	48	3	4
0,3	61	6	4
1	79	5	4
10	91	5	4

7.3.3 CONCLUSION

Una dosis única de 15A7H o h15A7 a 0,3 mg/kg y mayor, mostró un porcentaje de inhibición significativo de *trans vivo* DTH. La ED_{50} para h15A7 y 15A7H en el ensayo *trans-vivo* DTH fue de 0,09 y 0,1 mg/kg, respectivamente. Las concentraciones plasmáticas de ambos h15A7 y 15A7H fluctuaron solo dentro de un rango bastante estrecho a lo largo del transcurso de tiempo del estudio.

7.4 Ejemplo 4: Evaluación de la Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC)

En un esfuerzo por determinar si 15A7H posee actividad CDC, se usaron ensayos de liberación de lactato deshidrogenasa para medir la actividad CDC a varias concentraciones.

7.4.1 MATERIALES y METODOS

Se usaron células Ramos (obtenidas de la ATCC; cat# CRL-1596) como las células blanco y se cultivaron en medio DMEM completo (Invitrogen, Carlsbad, CA; Número de Catálogo 11995) con 0,5 mg/ml de Geneticins (Invitrogen, Carlsbad, CA; Número de Catálogo 10131). Se usó complemento de conejo como la fuente de proteínas del complemento (Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, NY; número de catálogo: AIC4000-1). Se usó el medio de Citotoxicidad Cedarlane como el medio de ensayo (Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, NY; Número de catálogo: CL95100).

Se determinó la actividad CDC a través de la liberación de LDH desde células blanco usando el kit de detección de Citotoxicidad "Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH)" (Roche Applied Science, Indianapolis, IN; Número de catálogo: 04 744 934 001). Se usó un anti CD20 humano de ratón purificado del hibridoma 1F5 (ATCC), Birmingham, AL; Número de catálogo: 6140-01) para activar el complemento como un anticuerpo control positive en el ensayo. Se usó IgG4 κ humana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Número de catálogo: I4639) como un control de isotipo. Las muestras y controles se establecieron como sigue (Todas las muestras poseen duplicados):

Muestras: 100 µl complemento estándar de conejo (diluidas 1:6 en medio de ensayo) + 50 µl células blanco (células Ramos en medio de ensayo) + 50 µl de diluciones de anticuerpo,

Control basal: 200 µl medio de ensayo

Control de liberación máxima: 50 µl células blanco + 100 µl complemento estándar de conejo + 50 µl medio de ensayo

Control de liberación espontánea: 50 µl de células blanco + 100 µl de estándar de complemento de conejo + 50 µl de medio de ensayo

La placa se incubó a 37°C en una incubadora de CO_2 húmeda por 3 horas. Después de 30 minutos desde el término de la incubación (luego de 2,5 horas de incubación), se agregó 10 µl de Solución de Lisis (proporcionada en el Kit de Detección de Citotoxicidad) a la muestra de control de la liberación máxima. Al final de la incubación, la placa se centrifugó a 200 g por 10 minutos a temperatura ambiente, y se transfirieron 100 µl de sobrenadante libre de células hacia los pocillos correspondientes de una placa de fondo plano de 96 pocillos para la detección de LDH. Se agregaron 100 µl de Mezcla de Reacción (proporcionada en el Kit de Detección de Citotoxicidad) a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente por 15 a 30 minutos en oscuridad. Al final de la segunda incubación, la reacción se detuvo agregando 50 µl de solución Stop (proporcionada en el Kit de Detección de Citotoxicidad). La absorbancia fue medida a la longitud de onda de 490-492 nm en el lector de placa SpectraMAX Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se calculó CDC% usando ([liberación inducida pro Anticuerpo] - [Control de liberación Espontánea])/ ([Liberación Máxima] - [Control de liberación Espontánea]) x 100%.

7.4.2 RESULTADOS

Se probó la actividad CDC de 15A7H bajo condiciones optimizadas para la respuesta CDC de anti-CD20 con las células Ramos. Como se muestra en la Figura como se muestra en la Figura 6 y la Tabla 11, se probaron diferentes concentraciones de anticuerpos con dilución fija del complemento de 1:12 para la actividad CDC. No se detectó actividad CDC para 15A7H, h15A7 o para el control negativo de IgG4. CD20 de ratón anti-humano demostró una clara dosis respuesta del anticuerpo.

Tabla 11: Porcentaje de actividad CDC de 15A7H a diferentes concentraciones

Concentración de Anticuerpo (µg/ml)	h15A7	IgG4 Kappa	Mouse anti-CD20	15A7H
5	1,54	-0,87	Nd	-0,45
0,5	4,25	0,50	68,26	-0,15
0,05	0,84	3,22	59,60	-2,59
0,005	2,08	3,29	31,42	-1,37
0,0005	nd	nd	6,77	Nd

7.4.3 CONCLUSION

15A7H no muestra actividad CDC hasta la concentración de 5 µg/ml de anticuerpo a la dilución de complemento de 1:12 en los ensayos realizados en células Ramos.

7.5 Ejemplo 5: Estudio Clínico

Se administra 15A7H a individuos por administración intravenosa de dosis únicas crecientes de 125 µg/kg, 500 µg/kg, 1000 µg/kg y 2000 µg/kg y en otros individuos a través de administración subcutánea de dosis únicas de 500 µg/kg y 1000 µg/kg. Se adaptó la dosis. Se usó 15A7H resuspendido en la formulación descrita en la Tabla 6. Luego de la administración, se realizaron los ensayos de laboratorio clínico (*por ejemplo*, hematología, química clínica y análisis de orina), por ejemplo en una base semanal, usando métodos conocidos en el arte. También se determinaron los parámetros farmacocinéticos, por ejemplo en una base semanal, usando métodos conocidos en el arte.

Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patente citadas en esta solicitud se enumeran por este medio incorporadas por referencia en su totalidad como si cada publicación individual o solicitudes de patente fuse específica e individualmente indicada para ser incorporada por referencia. A pesar que la anterior invención se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de entendimiento, será fácilmente aparente para aquellos de experiencia normal en el arte a la luz de las enseñanzas de esta invención, que ciertos cambios y modificaciones pueden ser realizadas a la misma sin apartarse del espíritu o espectro de las cláusulas anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une de manera inmmunoespecífica a PSGL-1 de humano CARACTERIZADO porque comprende:

(i) una región variable ("VL") de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 3;

(ii) una cadena pesada que comprende una región variable de cadena ("VH") que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 4; y

(iii) una región constante de IgG4 humana que contiene una sustitución de Serina por Prolina en el aminoácido 228 de la cadena pesada enumerado de acuerdo al índice EU.

2. Un anticuerpo monoclonal que se une de manera inmmunoespecífica a PSGL-1 de humano CARACTERIZADO porque comprende:

(i) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 1; y

(ii) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2.

3. Un anticuerpo monoclonal que se une de manera inmmunoespecífica a PSGL-1 de humano CARACTERIZADO porque comprende:

(i) una cadena pesada que consiste de la SEQ ID NO: 2; y

(ii) una cadena liviana que consiste de la SEQ ID NO: 1.

RESUMEN

Aquí se proporciona, en un aspecto, anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a PSGL-1, polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótido que codifican a tales anticuerpos, y los vectores de expresión y células huésped para producir a tales anticuerpos. También se proveen aquí los kits y las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos que se unen específicamente a PSGL-1, así como los métodos para tratar un desorden o enfermedad causado por o asociado con la proliferación aumentada y/o cantidades aumentadas de células T activadas usando los anticuerpos aquí descritos.

SEQUENCE LISTING

<110> AbGenomics Cooperatief U.A.
BASSARAB, Stefan
ENENKEL, Barbara
GARIDEL, Patrick
SCHOTT, Heidrun
SINGH, Sanjaya
LITZENBURGER, Tobias

<120> ANTI-PSGL-1 ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> A0871.70004WO00

<140> N/A
<141> 2012-06-11

<150> US 61/496249
<151> 2011-06-13

<160> 21

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 219
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 15A7H Light Chain amino acid sequence

<400> 1

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1			5				10						15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Asn
		20					25						30		
Asp	Gly	Asn	Thr	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala
	35					40						45			
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
50					55						60				
Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	His	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
65				70					75						80
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly
			85					90						95	
Ser	Tyr	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
		100					105						110		
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
	115					120						125			
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
130					135						140				
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
145				150					155						160
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
			165					170						175	
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu

180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 2
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 15A7H Heavy Chain amino acid sequence

<400> 2
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Tyr Ile Asn Gly Gly Ser Ser Thr Ile Phe Tyr Ala Asn Ala Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Ala Ser Tyr Gly Gly Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 3
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 15A7H Variable Light Chain Region (VL) amino acid sequence

<400> 3
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Asn
20 25 30
Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser Tyr Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
Arg

<210> 4
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 15A7H Variable Heavy Chain Region (VH) amino acid sequence

<400> 4
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
            20                  25                  30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Tyr Ile Asn Gly Gly Ser Ser Thr Ile Phe Tyr Ala Asn Ala Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Tyr Ala Ser Tyr Gly Gly Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 15A7H VL CDR1 amino acid sequence

<400> 5
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Asn Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu
 1   5   10   15

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 15A7H VL CDR2 amino acid sequence

<400> 6
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1   5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 15A7H VL CDR3 amino acid sequence

<400> 7
Phe Gln Gly Ser Tyr Val Pro Leu Thr
 1   5

<210> 8

<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 15A7H VH CDR1 amino acid sequence

<400> 8
Ser Phe Gly Met His
 1   5

<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 15A7H VH CDR2 amino acid sequence

<400> 9
Tyr Ile Asn Gly Gly Ser Ser Thr Ile Phe Tyr Ala Asn Ala Val Lys Gly
 1   5   10   15

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 15A7H VH CDR3 amino acid sequence

<400> 10
Tyr Ala Ser Tyr Gly Gly Gly Ala Met Asp Tyr
 1   5   10

<210> 11
<211> 412
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Full length human PSGL-1 amino acid sequence

<400> 11
Met Pro Leu Gln Leu Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Gly Pro Gly Asn
 1   5   10   15
Ser Leu Gln Leu Trp Asp Thr Trp Ala Asp Glu Ala Glu Lys Ala Leu
            20   25   30
Gly Pro Leu Leu Ala Arg Asp Arg Arg Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr
        35   40   45
Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg
    50   55   60
Asn Ser Thr Asp Thr Thr Pro Leu Thr Gly Pro Gly Thr Pro Glu Ser
65   70   75   80

```
Thr Thr Val Glu Pro Ala Ala Arg Arg Ser Thr Gly Leu Asp Ala Gly
                85                  90                  95
Gly Ala Val Thr Glu Leu Thr Thr Glu Leu Ala Asn Met Gly Asn Leu
            100                 105                 110
Ser Thr Asp Ser Ala Ala Met Glu Ile Gln Thr Thr Gln Pro Ala Ala
        115                 120                 125
Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro Val Pro Thr Glu Ala Gln Thr Thr
    130                 135                 140
Pro Leu Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Arg Leu Thr Ala Thr Glu
145                 150                 155                 160
Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175
Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro Thr Gly Leu Glu Ala Gln
            180                 185                 190
Thr Thr Ala Pro Ala Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr Ala Pro Ala Ala
        195                 200                 205
Met Glu Ala Gln Thr Thr Pro Pro Ala Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr
    210                 215                 220
Gln Thr Thr Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr Ala Pro Glu Ala Thr Glu
225                 230                 235                 240
Ala Gln Thr Thr Gln Pro Thr Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Leu
                245                 250                 255
Ala Ala Met Glu Ala Leu Ser Thr Glu Pro Ser Ala Thr Glu Ala Leu
            260                 265                 270
Ser Met Glu Pro Thr Thr Lys Arg Gly Leu Phe Ile Pro Phe Ser Val
        275                 280                 285
Ser Ser Val Thr His Lys Gly Ile Pro Met Ala Ala Ser Asn Leu Ser
    290                 295                 300
Val Asn Tyr Pro Val Gly Ala Pro Asp His Ile Ser Val Lys Gln Cys
305                 310                 315                 320
Leu Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Leu Val Ala Thr Ile Phe Phe Val
                325                 330                 335
Cys Thr Val Val Leu Ala Val Arg Leu Ser Arg Lys Gly His Met Tyr
            340                 345                 350
Pro Val Arg Asn Tyr Ser Pro Thr Glu Met Val Cys Ile Ser Ser Leu
        355                 360                 365
Leu Pro Asp Gly Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Ala Asn Gly Gly Leu
    370                 375                 380
Ser Lys Ala Lys Ser Pro Gly Leu Thr Pro Glu Pro Arg Glu Asp Arg
385                 390                 395                 400
Glu Gly Asp Asp Leu Thr Leu His Ser Phe Leu Pro
                405                 410
```

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> IgG4 hinge region amino acid sequence

<400> 12

```
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1               5                  10
```

<210> 13
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 15A7H VL FR1

<400> 13
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1   5   10   15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
            20

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 15A7H VL FR2

<400> 14
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1   5   10   15

<210> 15
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 15A7H VL FR3

<400> 15
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr
 1   5   10   15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
            20   25   30

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 15A7H VL FR4

<400> 16
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1   5   10

<210> 17
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 15A7H VH FR1

<400> 17
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 18
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 15A7H VH FR2

<400> 18
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 19
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 15A7H VH FR3

<400> 19
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 15A7H VH FR4

<400> 20
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 21

<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> IgG4 wild-type hinge region amino acid sequence

<400> 21
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala
 1   5   10

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

TESTIGO DOCUMENTAL

Folio: 113

Dependencia Jerárquica: DEL PROPIEDAD INDUSTRIAL	**Código**	2000
Dependencia Productora: GRUPO DE NUEVAS CREACIONES	**Código**	2020
Tipo de Radicación: Entrada: **X** Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		
Radicador:		

DESCRIPCIÓN DE LA PRUEBA

Nombre de la Serie / Subserie:	Código:
Expediente: 14-4726-19 16-8135-0	Solicitante / ***Quejoso / Demandante / otros.***
Prueba excluida: cd	
N°. de Pruebas excluidas: 1	
Fecha de emisión de la Prueba:	

UBICACIÓN DE LA PRUEBA EN LA SECCIÓN DE MATERIAL GRÁFICO

N°. de bloque:		Otras especificaciones:
N°. de rodante:		
N°. de estante:		
N°. de archivador:		
N°. de entrepaño:		
N°. de gaveta:		
N°. de caja:		

IMPORTANTE:

- El material gráfico ***o especial*** que se encuentra ***dentro o anexo a*** las unidades documentales o expedientes, debe extraerse y llevarse a aquella sección del archivo que se haya dispuesto para conservar documentos en distintos formatos.
- Entiéndase por material gráfico todos aquellos dibujos, croquis, mapas, planos, fotografías, ilustraciones, pictografías, códices, prensa, objetos tridimensionales, entre otros.

Observaciones:

El CD contiene 1 documento de texto NO PROCESADO.

Unidad de Conservación

- ☐ Bolsa
- ☐ Caja
- ☐ Libro
- ☐ Sobre
- ☐ Tomo
- ☐ Otro

Soporte Documental

- X CD
- ☐ Disquete
- ☐ DVD
- ☐ Folleto
- ☐ Periódico
- ☐ Plano
- ☐ Publicación Periódica
- ☐ USB
- ☐ Otro

JV -K3.

REIVINDICACIONES

1. Un kit CARACTERIZADO porque comprende un primer envase que contiene un anticuerpo monoclonal que comprende:

(i) una región variable ("VL") de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 3;

(ii) una cadena pesada que comprende una región variable de cadena ("VH") que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 4; y

(iii) una región constante de IgG4 humana que contiene una sustitución de Serina por Prolina en el aminoácido 228 de la cadena pesada enumerado de acuerdo al índice EU.

2. Un kit de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal comprende:

(i) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 1; y

(ii) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2.

3. Un kit de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal comprende:

(i) una cadena pesada que consiste de la SEQ ID NO: 2; y

(ii) una cadena liviana que consiste de la SEQ ID NO: 1.

115

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 16 - 001299

Bogotá D.C., Enero 08 de 2016 - 08:16:22

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	392	05/01/2016	8.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	1048	07/01/2016	164.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	1083	07/01/2016	4.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	1087	07/01/2016	840.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	1098	07/01/2016	1.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	141927	30/12/2015	1.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	141928	30/12/2015	1.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	80.000.00	80.000.00
				$80.000.00

SON: **OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____

-*-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-004726- -00019-0000

Fecha: 2016-01-14 16:49:54 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: ~~116~~ 115

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 16-008135- -00000-0000

Fecha: 2016-01-14 16:49:54 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: ~~116~~ 115

0010-17516-841-003-3