

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 948**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08012718 .6**
96 Fecha de presentación: **13.03.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1985634**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2008**

54 Título: **Anticuerpo de unión al ligando 1 de glucoproteína selectina P (PSGL-1) para uso en el tratamiento de enfermedad alérgica**

30 Prioridad:
03.08.2001 US 310196 P
18.01.2002 US 51497

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.03.2012

73 Titular/es:
ABGENOMICS COÖPERATIEF U.A.
STRAWINSKYLAAN 3111
1077 ZX AMSTERDAM, NL

72 Inventor/es:
Rong-Hwa, Lin;
Chung-Hsiun, Wu y
Pei-Ling, Hsu

74 Agente/Representante:
Polo Flores, Carlos

ES 2 376 948 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo de unión al ligando 1 de glucoproteína selectina P (PSGL-1) para uso en el tratamiento de enfermedad alérgica

5

Solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. nº de serie 60/310.196, presentada el 3 de agosto de 2001.

10

Ámbito de la invención

La invención se refiere a composiciones y procedimientos para controlar respuestas inmunes.

15

Antecedentes de la invención

El control de respuestas inmunes indeseadas es un asunto crítico en el tratamiento de enfermedades tales como las enfermedades autoinmunes, rechazo de transplante, enfermedades alérgicas y algunos cánceres. La actividad de linfocitos T abiertamente agresivos puede controlarse mediante inmunosupresión o mediante la inducción de tolerancia inmune. Tolerancia se define como un estado en el que el sistema inmunitario se vuelve insensible a un antígeno, mientras que la inmunosupresión, que reduce la respuesta inmune a antígenos, requiere habitualmente el uso continuado de medicación. En el transplante de órganos, los linfocitos T desempeñan un papel esencial en la respuesta inmune a aloantígenos. Los regímenes inmunosupresores actuales implican habitualmente el uso de corticosteroides, ciclosporina o rapamicina, que bloquean la transcripción de IL-2, un factor de crecimiento clave para linfocitos T, o inhiben la proliferación dependiente de IL-2. Sin embargo, una serie de anticuerpos monoclonales que actúan como agentes depletores de linfocitos T (por ejemplo, CD3, CD4, CD8), o como inhibidores de la señalización de citocinas o de las rutas coestimulantes de linfocitos T (por ejemplo, CD25, B7-1, B7-2, CD152, CTLA4), han demostrado eficacia en la reducción de la incidencia de rechazo con efectos secundarios o toxicidad limitados. Algunos de estos agentes han mostrado cierto grado de éxito en el tratamiento de enfermedad autoinmune y en la prolongación de la supervivencia de injerto.

20

25

30

Se cree ampliamente que la apoptosis es de vital importancia para mantener el funcionamiento apropiado del sistema inmunitario y un mecanismo importante para eliminar células indeseadas (Kabelitz y col. Immunol. Today 14: 338-340 (1993); Raff, Nature: 356: 397-399 (1992)). Diversas señales originarias del interior o exterior de una célula influyen en la vida y la muerte de la célula. Los anticuerpos contra moléculas de superficie de linfocitos T tales como Fas (o CD95, PM = 43 kDa), TNFR2 (PM = 75 kDa), CD2 (PM= 45 kDa) y CTLA-4 (PM= 33 kDa) para inducir la apoptosis de linfocitos T (Osborne, Curr. Opin. Immunol. 8: 245-248 (1996); Lin y col. J. Immunol. 158: 598-603 (1997); Zhang y col. Nature: 377: 348-350 (1995); Lai y col., Eur. J. Immunol. 25: 3243-3248 (1995); Mollereau y col., J. Immunol. 156: 3184-3190 (1996); Gribben y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 811-815 (1995)). Los intentos de usar moléculas Fas y TNFR2 para controlar linfocitos T indeseados se han obstaculizado por el hecho de que estas dos moléculas se expresan no solo en células inmunes, sino también en varios otros sistemas orgánicos importantes como el hígado. Este patrón de expresión limita potencialmente la aplicación terapéutica de estos dos anticuerpos (Ogasawara y col., Nature 364: 806-809 (1993); Pfeffer y col., Celt: 73: 457-467 (1993); Engelmann y col., J. Biological Chemistry 265: 14497-14504 (1990)).

35

40

45

Stirling y Chung (British Medical Bulletin, 2000; 56 (nº 4), 1037-1053) demuestran que la depleción de linfocitos T tiene potencial terapéutico en pacientes con enfermedad alérgica.

Woltmann G. y col. (Blood, 15 de mayo de 2000, vol. 95, nº 10, 3146-3152) dan a conocer la inhibición de la adhesión eosinofílica por un anticuerpo bloqueante contra PGSL-1 y selectina P.

50

Borges y col. (J. Exp. Med. 1997, vol. 185, nº 3, 573-578) demuestran que las células Th1 de ratón se unen a selectina P mediante el ligando 1 de glucoproteína selectina P (PSGL-1).

55 Resumen de la invención

La invención está basada en el descubrimiento de que los linfocitos T pueden deplecionarse y/o inducirse a experimentar apoptosis mediante el acoplamiento del antígeno de superficie de linfocitos T ligando 1 de glucoproteína selectina P (PSGL-1). La depleción de linfocitos T puede ser particularmente útil para el tratamiento de afecciones asociadas a una respuesta inmune mediada por linfocitos T excesiva o indeseada o una proliferación de linfocitos T excesiva o indeseada. Por ejemplo, la depleción de linfocitos T puede causar la reducción o eliminación

60

de la actividad o proliferación de linfocitos T indeseable asociada a enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplante, enfermedades alérgicas y/o cánceres derivados de linfocitos T. Se describen en la presente memoria procedimientos de uso de moduladores de la función de PSGL-1 para prevenir o reducir una respuesta inmune mediada por linfocitos T, así como procedimientos de cribado de moduladores de la función de PSGL-1.

5 En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al ligando 1 de glucoproteína selectina P (PSGL-1) sobre la superficie de un linfocito T activado e induce la muerte del linfocito T activado para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad alérgica mediada por linfocitos T.

10 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al ligando 1 de glucoproteína selectina P (PSGL-1) sobre la superficie de un linfocito T activado e induce la muerte del linfocito T activado en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad alérgica mediada por linfocitos T.

15 Se describe un procedimiento de prevención o reducción de una respuesta inmune mediada por linfocitos T en un individuo. El procedimiento incluye las siguientes etapas: seleccionar un individuo diagnosticado por tener o estar en riesgo de adquirir una afección caracterizada por una respuesta inmune mediada por linfocitos T excesiva o indeseada; y administrar al individuo un compuesto que se une al PSGL-1 sobre la superficie de un linfocito T, en el que la unión del compuesto al PSGL-1 sobre la superficie del linfocito T induce una ruta de transducción de señal que da como resultado la muerte del linfocito T, previniendo o reduciendo así la respuesta inmune mediada por linfocitos T en el individuo.

20 El compuesto usado en dicho procedimiento puede incluir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al PSGL-1. En un ejemplo, el compuesto es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al PSGL-1. En un ejemplo, el procedimiento incluye una etapa adicional de administración de un agente que se une al anticuerpo monoclonal e induce la reticulación de una pluralidad de antígenos PSGL-1 sobre la superficie del linfocito T.

25 En un ejemplo, el procedimiento incluye inducir la reticulación una pluralidad de antígenos PSGL-1 sobre la superficie del linfocito T, en el que la reticulación induce la ruta de transducción de señal que da como resultado la muerte del linfocito T.

30 En un ejemplo, el procedimiento incluye una etapa de selección de un individuo diagnosticado por tener una enfermedad autoinmune. En otro ejemplo, el procedimiento incluye una etapa de selección de un individuo que ha recibido o espera recibir un trasplante alogénico o xenogénico. En otro ejemplo, el procedimiento incluye una etapa de selección de un individuo diagnosticado por tener una enfermedad alérgica. En otro ejemplo, el procedimiento incluye una etapa de selección de un individuo diagnosticado por tener un cáncer de linfocitos T.

35 En un ejemplo, el linfocito T es un linfocito T activado. En un ejemplo, el linfocito T es un linfocito T CD4+. En otro ejemplo, el linfocito T es un linfocito T CD8+.

40 En un ejemplo, el procedimiento incluye una etapa de detección del número de linfocitos T en una primera muestra biológica tomada del individuo antes de la administración del compuesto, y de comparación de los resultados con el número de linfocitos T en una segunda muestra biológica tomada del individuo después de la administración del compuesto.

45 En otro ejemplo, el procedimiento incluye una etapa de detección de la actividad biológica de linfocitos T en una primera muestra biológica tomada del individuo antes de la administración del compuesto, y de comparación de los resultados con la actividad biológica de linfocitos T en una segunda muestra biológica tomada del individuo después de la administración del compuesto.

50 En un ejemplo, la administración da como resultado la depleción de al menos un 20% de las células CD3+ de sangre periférica en el individuo. En algunos ejemplos, la administración da como resultado la depleción de al menos un 30, 40, 50% o más de las células CD3+ de sangre periférica en el individuo.

55 En un ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo induce la muerte de al menos un 20% de las células CD3+ de sangre periférica en el individuo después de la exposición al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos ejemplos, la administración induce la muerte de al menos un 30, 40, 50% o más de las células CD3+ de sangre periférica en el individuo. La muerte celular puede medirse en cualquier momento, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días después de la exposición al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del

mismo.

5 Se describe también un procedimiento de inducción de la muerte de un linfocito T o linfocito citolítico natural (NK). El procedimiento incluye las etapas de: proporcionar un linfocito T o linfocito NK que expresa PSGL-1 sobre su superficie, y poner en contacto el linfocito T o linfocito NK con un compuesto que se une al PSGL-1 sobre la superficie del linfocito T o linfocito NK, en el que la unión del compuesto al PSGL-1 sobre la superficie del linfocito T o linfocito NK induce una ruta de transducción de señal que da como resultado la muerte del linfocito T o linfocito NK.

10 El compuesto usado en dicho procedimiento puede incluir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al PSGL-1. En un ejemplo, el compuesto es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al PSGL-1. En un ejemplo, el procedimiento incluye una etapa de poner en contacto el anticuerpo monoclonal con un agente que se une al anticuerpo monoclonal e induce la reticulación de una pluralidad de antígenos PSGL-1 sobre la superficie del linfocito T o linfocito NK.

15 En un ejemplo, el procedimiento incluye una etapa de inducción de la reticulación de una pluralidad de antígenos PSGL-1 sobre la superficie del linfocito T o linfocito NK, en el que la reticulación induce la ruta de transducción de señal que da como resultado la muerte del linfocito T o linfocito NK.

20 En un ejemplo, el linfocito T es un linfocito T activado. En un ejemplo, el linfocito T es un linfocito T CD4+. En otro ejemplo, el linfocito T es un linfocito T CD8+.

25 En un ejemplo, el procedimiento incluye la etapa de evaluar la viabilidad del linfocito T o linfocito NK después de la puesta en contacto con el compuesto.

En un ejemplo, el procedimiento incluye la etapa de evaluar la actividad biológica del linfocito T o linfocito NK después de la puesta en contacto con el compuesto.

30 Se describe también un procedimiento de cribado de un modulador de la función de PSGL-1. El procedimiento incluye las etapas de: proporcionar una célula que exprese PSGL-1 sobre la superficie de la célula; poner en contacto la célula con una sustancia de ensayo y medir la viabilidad de la célula después de la puesta en contacto de la célula con la sustancia de ensayo para determinar así si la sustancia de ensayo es un modulador de la función de PSGL-1.

35 En un ejemplo, el procedimiento incluye la etapa de detección de la muerte celular inducida por la sustancia de ensayo para determinar así que la sustancia de ensayo es un modulador de la función de PSGL-1.

40 En un ejemplo, la sustancia de ensayo es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al PSGL-1. En un ejemplo, la sustancia de ensayo es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al PSGL-1. En un ejemplo, el procedimiento incluye la etapa de puesta en contacto del anticuerpo monoclonal con un agente que se une al anticuerpo monoclonal e induzca la reticulación de una pluralidad de antígenos PSGL-1 sobre la superficie de la célula.

45 En un ejemplo, el procedimiento incluye la etapa de inducir la reticulación de una pluralidad de antígenos PSGL-1 sobre la superficie de la célula, en el que la reticulación induce la ruta de transducción de señal que da como resultado la muerte de la célula.

50 En un ejemplo, el linfocito T es un linfocito T activado. En un ejemplo, el linfocito T es un linfocito T CD4+. En otro ejemplo, el linfocito T es un linfocito T CD8+.

En un ejemplo, el procedimiento incluye la etapa de fabricación de cantidades a granel de la sustancia de ensayo y de formulación de la sustancia de ensayo en un portador farmacéuticamente aceptable.

55 Se describe también un kit que contiene: un compuesto que se une al PSGL-1 sobre la superficie de un linfocito T, en el que la unión del compuesto al PSGL-1 sobre la superficie del linfocito T induce una ruta de transducción de señal que da como resultado la muerte del linfocito T, e instrucciones para el uso del compuesto para tratar autoinmunidad, rechazo de trasplante, una afección alérgica o un cáncer de linfocitos T. En otros ejemplos, el kit incluye instrucciones de uso para tratar cualquier enfermedad o trastorno descrito en la presente memoria.

60 Una ventaja de la invención es que permite la depleción de linfocitos T y/o la inducción de la apoptosis en linfocitos T sin causar una respuesta inmune indeseada o dañina asociada. Por ejemplo, la administración de un anticuerpo anti-

PSGL-1 a un individuo no da como resultado la elevación indeseada de los niveles de citocinas inflamatorias tales como IL-2 o TNF- α .

5 Otra ventaja de la invención es que permite la modificación dirigida a una proteína de superficie celular, PSGL-1, cuya expresión está limitada en gran medida a leucocitos, y en particular a linfocitos T y linfocitos NK. Por lo tanto, los compuestos descritos en la presente memoria no inducen niveles significativos de apoptosis en otros tipos celulares tales como células hepáticas. La modificación dirigida de linfocitos T y linfocitos NK (un tipo celular CD3 importante implicado en el rechazo de trasplante) para depleción selectiva, sin inducir significativamente respuestas de citocina sistémicas potencialmente mortales ni dañar otros sistemas de órganos, es una característica deseada de un agente inmunosupresor.

15 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende normalmente por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse en la práctica o ensayo de la invención procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. En caso de un conflicto de terminología, prevalecerá la presente memoria descriptiva. Además, los materiales y procedimientos descritos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

20 Otros rasgos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

25 La Fig. 1 expone los resultados de un experimento de evolución temporal que investigaba cuándo los linfocitos T activados adquieren sensibilidad a señales apoptóticas mediadas por TAB4 (un anticuerpo monoclonal anti-PSGL-1).

30 La Fig. 2 expone los resultados de la biotilación de superficie celular e inmunoprecipitación del antígeno reconocido por el anticuerpo TAB4.

La Fig. 3 expone la expresión del antígeno PSGL-1 sobre linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, células B CD19+ y linfocitos NK.

35 La Fig. 4 expone la expresión del antígeno PSGL-1 sobre timocitos CD4+, CD8+ y CD4+8+, y CD4-8-.

La Fig. 5 expone los niveles de IL-2 producidos en cultivo linfocítico mixto usando células de bazo aisladas a partir de ratones Balb/C tratados con TAB4 (o Ig de hámster) como células sensibles y células de bazo C3H con H2 no coincidente como células estimulantes.

40 La Fig. 6 expone análisis de transferencia Western que demuestran que (A) las proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo TAB4 pueden reconocerse por un anticuerpo anti-PSGL-1 comercialmente disponible y (B) el preaclaramiento de lisado de linfocitos T con anticuerpo anti-PSGL-1 puede deplecionar las proteínas reconocidas por TAB4.

45 La Fig. 7 expone el porcentaje de injertos supervivientes en ratones C57BL/6 que recibieron un injerto de piel de ratones Balb/c y se trataron con un anticuerpo anti-PSGL-1 (rombo negro) o un anticuerpo de control (cuadrado blanco).

50 La Fig. 8 expone la evolución temporal del porcentaje de linfocitos T apoptóticos después de tratamiento de células mononucleares de sangre periférica humanas activadas con un anticuerpo anti-PSGL-1.

La Fig. 9 expone la incidencia de diabetes en ratones macho diabéticos no obesos autoinmunes (NOD) que se trataron con anticuerpo anti-PSGL-1 (cuadrado negro) o un anticuerpo de control (cuadrado blanco).

55 Descripción detallada

La invención está dirigida a procedimientos de modulación de la actividad de linfocitos T mediante la modulación de la función de moléculas de PSGL-1 residentes en la superficie de un linfocito T. El acoplamiento de PSGL-1 con composiciones descritas en la presente memoria puede causar la depleción de linfocitos T y/o inducir a los linfocitos T a experimentar apoptosis. Por lo tanto, estas composiciones son útiles como agentes terapéuticos para controlar afecciones relacionadas con el sistema inmunitario tales como enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplante,

enfermedades alérgicas y/o cánceres derivados de linfocitos T. Las composiciones son también útiles para causar la depleción de linfocitos T de cualquier muestra biológica en la que no se desee la presencia o actividad de linfocitos T.

5 Proteína PSGL-1

La PSGL-1 es una molécula de adhesión a la superficie celular que se expresa en neutrófilos, linfocitos T y B, linfocitos NK, monocitos, células dendríticas y células progenitoras hematopoyéticas CD34 humanas primitivas. Mediante su capacidad de interactuar con selectinas, la PSGL-1 media el rodamiento de leucocitos sobre el endotelio y la extravasación de leucocitos hasta los tejidos inflamados. La unión de linfocitos T mediada por PSGL-1 a selectina E y P, o la migración, está regulada diferencialmente. Por ejemplo, la aparición del epítipo CLA (antígeno linfocítico cutáneo) se cree que está inducida en linfocitos T que experimentan una transición de nativo a de memoria. Solo los linfocitos T 1 auxiliares, pero no los 2 auxiliares, expresan PSGL-1 funcional y ello capaces de migración a la zona inflamada de la piel.

La PSGL-1 es una sialomucina que debe estar específicamente sialilada, fucosilada y sulfatada para unirse a selectina P. La molécula de PSGL-1 existe en isoformas caracterizadas por un diferente grado de sitios de glucosilación y sulfatación en sus extremos N. Los linfocitos T y B de sangre periférica en reposo, líneas celulares linfoides y linfocitos T de sangre periférica activados *in vitro* expresan niveles similares de PGSL-1. Sin embargo, solo los linfocitos T activados exhiben una forma funcional de PSGL-1 y se unen ávidamente a selectina P. Dicha actividad de unión dependiente de la activación parece ser el resultado de una modificación postraduccional diferencial, como sugieren los niveles elevados de actividades alfa-(1,3)-fucosiltransferasas en linfocitos T activados. Las isoformas de PSGL-1 muestran también afinidad diferencial por selectina L y selectina E. Por ejemplo, los linfocitos T humanos que exhiben la isoforma positiva de CLA pueden ligarse y rodar tanto sobre selectina E como P, mientras que los linfocitos T que expresan PSGL-1 sin el epítipo CLA, se unen solo a selectina P. Además, la unión de PSGL-1 a selectina P es contingente en presencia del decapeptido terminal que contiene tres residuos de tirosina para sulfatación y un residuo de treonina para glucosilación.

Puede prepararse una proteína PSGL-1 mediante procedimientos recombinantes y/o aislando una proteína PSGL-1 nativa a partir de material biológico. Puede producirse una proteína PSGL-1 recombinante en células procarióticas o eucarióticas, *in vitro* o *in vivo*. Pueden usarse ácidos nucleicos que codifican PSGL-1 para la producción recombinante de la proteína (véase, por ejemplo, el acceso a GenBank[®] NM_003006 para un ejemplo de un ácido nucleico que codifica un polipéptido PSGL-1). Los anticuerpos dirigidos a PSGL-1 son también bien conocidos y pueden usarse para la purificación del antígeno (véase, por ejemplo, Herron y col. (2000) *Science* 2 de junio; 288 (5471):1653-56; documento WO 00/25808) y/o usarse en los procedimientos descritos en la presente memoria. La PSGL-1 se describe adicionalmente en referencias que incluyen, pero sin limitación, Sako y col. (1993) *Cell* 75: 1179; Vachino y col. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 21966; y Veldman y col. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 16470.

Para la producción recombinante de PSGL-1, puede requerirse la expresión simultánea tanto de PSGL-1 como de su alfa-(1,3)-fucosiltransferasa modificadora, Fuc-TVII, para la expresión funcional de PSGL-1. Además, o como alternativa, la producción recombinante de PSGL-1 puede estar acompañada de cotransfección con un ácido nucleico que codifica PACE para eliminar el propéptido y/o un ácido nucleico que codifica tirosina sulfotransferasa.

Puede usarse un anticuerpo anti-PSGL-1 para aislar y purificar un antígeno PSGL-1 a partir de material biológico. Puede usarse como fuente de proteína cualquier tipo de célula que exprese una proteína PSGL-1, por ejemplo, linfocitos T derivados de un individuo o una línea de linfocitos T. Una vez purificada, la proteína puede usarse en una variedad de procedimientos como se describen en la presente memoria. Por ejemplo, la proteína PSGL-1 purificada puede usarse en un cribado *in vitro* de moduladores de la función de PSGL-1 en linfocitos T o como inmunógeno para preparar anticuerpos dirigidos contra la proteína.

Además, puede purificarse un antígeno de PSGL-1 usando una fusión selectina-Fc, por ejemplo, una fusión selectina P-Fc.

55 Anticuerpos anti-PSGL-1

Pueden usarse polipéptidos PSGL-1 (o fragmentos inmunogénicos o análogos de los mismos) para generar anticuerpos útiles en los procedimientos de la invención. Como se describe anteriormente, los polipéptidos PSGL-1 o fragmentos de peptídicos de los mismos pueden producirse mediante técnicas recombinantes o sintetizarse usando procedimientos de síntesis en fase sólida. Pueden usarse los polipéptidos PSGL-1 recombinantes, o un fragmento peptídico de los mismos, para producir anticuerpos anti-PSGL-1. Además, puede usarse un anticuerpo anti-PSGL-1, tal como el anticuerpo monoclonal TAB4, para purificar un polipéptido PSGL-1, por ejemplo un polipéptido PSGL-1

en su conformación natural, que puede usarse entonces como inmunógeno para producir anticuerpos anti-PSGL-1 adicionales.

5 Un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo monoclonal, policlonal o diseñado por ingeniería genética que se une específicamente a un polipéptido PSGL-1. Un anticuerpo que “se une específicamente” a un antígeno concreto, por ejemplo un polipéptido PSGL-1, no reconocerá sustancialmente ni se unirá a otras moléculas en una muestra. Por tanto, la invención se refiere también a procedimientos para identificar un compuesto de ensayo (por ejemplo, un anticuerpo) que se une a un polipéptido de la invención mediante la puesta en contacto del polipéptido con un compuesto de ensayo, y determinando si el polipéptido se une al compuesto de ensayo (por ejemplo, mediante detección directa de la unión, detección de una molécula competidora que desestabiliza la unión del compuesto de ensayo al polipéptido y/o la detección de la unión usando un ensayo de actividad inductora de la apoptosis).

15 En general, los polipéptidos PSGL-1 pueden acoplarse con una proteína portadora tal como KLH, mezclarse con un coadyuvante e inyectarse a un mamífero hospedador. Los anticuerpos producidos en ese animal pueden purificarse entonces mediante cromatografía de afinidad por antígeno

20 En particular, pueden inmunizarse diversos animales hospedadores mediante inyección con un polipéptido PSGL-1 o un fragmento antigénico del mismo. Los animales hospedadores empleados habitualmente incluyen conejos, ratones, conejillos de indias y ratas. Diversos coadyuvantes que pueden usarse para aumentar la respuesta inmune dependen de la especie hospedadora, e incluyen coadyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa bocallave y dinitrofenol. Los coadyuvantes humanos potencialmente útiles incluyen BCG (bacilo de Calmette-Guérin) y *Corynebacterium parvum*. Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo que están contenidos en los sueros de animales inmunizados.

30 Los anticuerpos dentro de la invención incluyen por lo tanto anticuerpos policlonales y, además, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂ y moléculas producidas usando una colección de expresión de Fab.

35 Los anticuerpos monoclonales, que son poblaciones homogéneas de anticuerpos de un antígeno particular, pueden prepararse usando los polipéptidos PSGL-1 descritos anteriormente y tecnología de hibridoma estándar (véanse, por ejemplo, Kohler y col., Nature 256: 495 [1975]; Kohler y col., Eur. J. Immunol. 6: 511 [1976]; Kohler y col., Eur. J. Immunol. 6: 292 [1976]; Hammerling y col., “Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas”, Elsevier, N.Y. [1981]).

40 En particular, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse mediante cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo, tal como la descrita en Kohler y col., Nature 256: 495 (1975), y la patente de EE.UU. nº 4.376.110; la técnica de hibridoma de células B (Kosbor y col., Immunology Today 4: 72 [1983]; Cole y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026 [1983]) y la técnica de hibridoma EBV (Cole y col., “Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy”, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96 [1983]). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce el mAb de esta invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. La capacidad de producir altos títulos de mAb *in vivo* hace a éste un procedimiento de producción particularmente útil.

45 Una vez producidos, se ensaya en los anticuerpos policlonales o monoclonales el reconocimiento específico de PSGL-1 mediante análisis de transferencia Western o inmunoprecipitación mediante procedimientos estándar, por ejemplo, como se describe en Ausubel y col., más arriba. Son útiles en la invención los anticuerpos que reconocen específicamente y se unen a PSGL-1. Son particularmente útiles los anticuerpos anti-PSGL-1 que se unen al antígeno PSGL-1 sobre la superficie de un linfocito T, por ejemplo, una célula CD3+, e inducen la depleción y/o apoptosis de linfocitos T en un individuo.

50 Los anticuerpos pueden usarse, por ejemplo, como parte de una pauta terapéutica (por ejemplo, para reducir o eliminar una respuesta inmune indeseable, tal como una respuesta inmune mediada por linfocitos T, asociada a afecciones tales como enfermedades autoinmunes, rechazo de transplante, enfermedades alérgicas y cánceres derivados de linfocitos T). Los anticuerpos pueden usarse también en un ensayo de cribado para medir la capacidad de un compuesto candidato de unirse a PSGL-1.

60 Además, pueden usarse las técnicas desarrolladas para la producción de “anticuerpos quiméricos” (Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851 [1984]; Neuberger y col., Nature 312: 604 [1984]; Takeda y col., Nature 314: 452 [1984]) mediante corte y empalme de genes procedentes de una molécula de anticuerpo de ratón de la especificidad

de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones derivan de diferentes especies animales, tales como aquellos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal de murino y una región constante de inmunoglobulina humana.

5 Como alternativa, pueden adaptarse técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patentes de EE.UU. n^{os} 4.946.778, 4.946.778 y 4.704.692) para producir anticuerpos monocatenarios contra un polipéptido PSGL-1, o un fragmento del mismo. Los anticuerpos monocatenarios se forman ligando los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv mediante un puente aminoacídico, dando como resultado un polipéptido monocatenario.

10 Pueden generarse mediante técnicas conocidas fragmentos de anticuerpo que reconocen y se unen a epítomos específicos. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, pero sin limitación, fragmentos F(ab')₂ que pueden producirse mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y fragmentos de Fab que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de fragmentos F(ab')₂. Como alternativa, pueden construirse colecciones de expresión de Fab (Huse y col., Science 246: 1275 [1989]) para permitir una identificación rápida y sencilla de fragmentos de Fab monoclonales con la especificidad deseada.

15 Los anticuerpos pueden humanizarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden humanizarse comercialmente anticuerpos monoclonales con una especificidad de unión deseada (Scotgene, Escocia; Oxford Molecular, Palo Alto, Calif.). Son también rasgos de la invención anticuerpos totalmente humanos, tales como aquellos expresados en animales transgénicos, (Green y col., Nature Genetics 7: 13 [1994]; y patentes de EE.UU. n^o 5.545.806 y 5.569.825).

25 Ensayos de cribado de compuestos que modulan la función PSGL-1

La invención comprende también procedimientos para identificar compuestos que interaccionan con PSGL-1 (o un dominio de PSGL-1) que incluyen, pero sin limitación, compuestos que inducen la depleción de linfocitos T y/o la apoptosis de linfocitos T tras la unión a PSGL-1. Se incluyen también compuestos que modulan la interacción de PSGL-1 con proteínas transmembrana, extracelulares o intracelulares que regulan la actividad PSGL-1 y compuestos que modulan la actividad PSGL-1.

30 Los compuestos que pueden cribarse según la invención incluyen, pero sin limitación, péptidos, anticuerpos y fragmentos de los mismos, y otros compuestos orgánicos que se unen a PSGL-1 y modulan una función biológica mediada por PSGL-1, como se describe en la presente memoria.

35 Dichos compuestos pueden incluir, pero sin limitación, péptidos tales como, por ejemplo, péptidos solubles, incluyendo pero sin limitación, miembros de colecciones de péptidos aleatorios (Lam y col., Nature 354: 82 [1991]; Houghten y col., Nature 354: 84 [1991]), y colecciones moleculares derivadas de la química combinatoria constituidas por aminoácidos de configuración D y/o L, fosfopéptidos (incluyendo, pero sin limitación, miembros de colecciones de fosfopéptidos dirigidas degeneradas aleatoria o parcialmente; Songyang y col., Cell 72: 767 [1993]), anticuerpos (incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, antiidiotípicos, quiméricos o monocatenarios, y FAb, F(ab')₂ y fragmentos de colección de expresión de FAb, y fragmentos de unión a epítomo de los mismos), y moléculas orgánicas o inorgánicas pequeñas.

40 Otros compuestos que pueden cribarse según la invención incluyen, pero sin limitación, moléculas orgánicas pequeñas que afectan a una actividad de la proteína PSGL-1, como se describe en la presente memoria.

45 Las tecnologías informáticas de modelización y búsqueda permiten la identificación de compuestos, o la mejora de compuestos ya identificados, que pueden modular la expresión o actividad de PSGL-1. Habiendo identificado dicho compuesto o composición, se identifican los sitios o regiones activos. Dichos sitios activos podrían ser típicamente parte de un sitio de unión de un modulador natural de la actividad. El sitio activo puede identificarse usando procedimientos conocidos en la técnica incluyendo por ejemplo, las secuencias aminoacídicas de péptidos, las secuencias nucleotídicas de ácidos nucleicos o el estudio de complejos del compuesto o composición relevante con su ligando natural. En el último caso, pueden usarse procedimientos químicos o cristalográficos de rayos X para encontrar el sitio activo, encontrando dónde se encuentra el modulador (o ligando) sobre el factor.

50 Aunque se describen anteriormente con referencia al diseño y generación de compuestos que podrían alterar la unión, podrían cribarse también colecciones de compuestos conocidos, incluyendo productos naturales o productos químicos sintéticos y materiales biológicamente activos, compuestos que se unen a proteína PSGL-1 y causan la depleción de linfocitos T y/o inducen la apoptosis de linfocitos T.

Pueden diseñarse sistemas *in vitro* para identificar compuestos capaces de interactuar con PSGL-1 (o un dominio de PSGL-1). Los compuestos identificados pueden ser útiles, por ejemplo, en la modulación de la actividad de linfocitos T como se describe en la presente memoria, y por tanto pueden ser útiles para el tratamiento de afecciones tales como enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplante, enfermedades alérgicas y cánceres derivados de linfocitos T.

El principio de los ensayos usados para identificar los compuestos que se unen a PSGL-1 implica preparar una mezcla de reacción de PSGL-1 (o un dominio del mismo) y el compuesto de ensayo en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir a los dos componentes interactuar y unirse, formando por tanto un complejo que puede eliminarse y/o detectarse en la mezcla de reacción. La especie de PSGL-1 usada puede variar dependiendo del objetivo del ensayo de cribado. En algunas situaciones, es preferible emplear un péptido correspondiente a un dominio de PSGL-1 fusionado con una proteína o polipéptido heterólogo que proporcione ventajas en el sistema de ensayo (por ejemplo, marcado, aislamiento del complejo resultante, etc.).

Los ensayos de cribado pueden realizarse de una variedad de maneras. Por ejemplo, un procedimiento para realizar dicho ensayo implica anclar la proteína, polipéptido, péptido o proteína de fusión PSGL-1 o la sustancia de ensayo sobre una fase sólida y detectar los complejos de PSGL-1/compuesto de ensayo anclados sobre la fase sólida al final de la reacción. En una realización de dicho procedimiento, el reactivo de PSGL-1 puede anclarse sobre una superficie sólida, y el compuesto de ensayo, que no está anclado, puede estar marcado directa o indirectamente.

En la práctica, pueden utilizarse convenientemente placas de microvaloración como fase sólida. El componente anclado puede inmovilizarse mediante enlaces no covalentes o covalentes. El enlace no covalente puede conseguirse simplemente recubriendo la superficie sólida con una disolución de la proteína y secando. Como alternativa, puede usarse un anticuerpo inmovilizado, preferiblemente un anticuerpo monoclonal específico de la proteína a inmovilizar, para anclar la proteína a la superficie sólida. Las superficies pueden prepararse por adelantado y almacenarse.

Para realizar el ensayo, se añade el componente no inmovilizado a la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Después de completar la reacción, se eliminan los componentes no reaccionados (por ejemplo, mediante lavado) en condiciones tales que cualquier complejo formado permanezca inmovilizado sobre la superficie sólida. La detección de complejos anclados sobre la superficie sólida puede conseguirse de una serie de maneras. Cuando el componente no inmovilizado previamente está premarcado, la detección del marcaje inmovilizado sobre la superficie indica que se formaron complejos. Cuando el componente no inmovilizado previamente no está premarcado, puede usarse un marcaje indirecto para detectar complejos anclados sobre la superficie, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado específico del componente no inmovilizado previamente (el anticuerpo, a su vez, puede estar marcado directamente o marcado indirectamente con un anticuerpo anti-Ig marcado).

Como alternativa, puede realizarse una reacción en fase líquida, separarse los productos de reacción de los componentes no reaccionados y detectarse los complejos, por ejemplo, usando un anticuerpo inmovilizado específico de la proteína, polipéptido, péptido o proteína de fusión PSGL-1 o el compuesto de ensayo para anclar cualquier complejo formado en disolución, y un anticuerpo marcado específico del otro componente del posible complejo para detectar complejos anclados.

Como alternativa, pueden usarse ensayos basados en células para identificar compuestos que interactúan con PSGL-1. Con este fin, pueden usarse líneas celulares que expresan PSGL-1 o líneas celulares que se han modificado por ingeniería genética para expresar PSGL-1. Los ensayos basados en células son particularmente útiles para evaluar los efectos funcionales de un compuesto identificado mediante un cribado descrito en la presente memoria. Por ejemplo, una vez se identifica un compuesto basándose en su capacidad de unirse a una proteína PSGL-1, en el compuesto puede ensayarse entonces su capacidad, por ejemplo, de inducir la apoptosis de linfocitos T *in vitro* o *in vivo* o de deplecionar los linfocitos T *in vitro* o *in vivo*.

Composiciones farmacéuticas

Dado que es un objeto de la presente invención alterar una respuesta inmune en un individuo, es también un rasgo de la invención una composición farmacéutica que contenga, por ejemplo, anticuerpos, moléculas pequeñas u otros compuestos que se unen específicamente a PSGL-1. En un ejemplo preferido, el compuesto funciona como agonista de PSGL-1.

Las composiciones farmacéuticas para uso según la presente invención pueden formularse de manera convencional usando uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables. Por tanto, los compuestos y sus sales y

solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para administración mediante una variedad de vías de administración.

5 Los compuestos pueden formularse para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección intravenosa rápida o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril exenta de pirógenos, antes del uso.

Procedimientos de control de una respuesta inmune mediada por linfocitos T y depleción de poblaciones de linfocitos T

15 Los compuestos tales como los detallados en los ensayos de cribado descritos en la presente memoria pueden ser útiles, por ejemplo, en la modulación de una función biológica mediada por un polipéptido PSGL-1 y/o para el tratamiento de trastornos asociados a una respuesta inmune excesiva o indeseada, por ejemplo, una respuesta inmune mediada por linfocitos T. Estos compuestos incluyen, pero sin limitación, péptidos, anticuerpos y fragmentos de los mismos, y otros compuestos orgánicos que se unen a PSGL-1 sobre la superficie de un linfocito T e inducen una ruta de transducción de señal que da como resultado la muerte del linfocito T. Los procedimientos de la invención incluyen opcionalmente la adición de un agente reticulante que induce la reticulación de PSGL-1 sobre la superficie de una célula. Los compuestos descritos en la presente memoria pueden usarse en cualquier caso en que se desee la depleción o eliminación de la actividad de linfocitos T. Las afecciones particularmente útiles que pueden tratarse con los compuestos de la invención incluyen enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplante, enfermedades alérgicas y cánceres derivados de linfocitos T.

25 Los ejemplos de afecciones que pueden tratarse con los compuestos anti-PSGL-1 descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, diabetes mellitus, artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis y artritis psoriásica), esclerosis múltiple, encefalomiелitis, miastenia grave, lupus sistémico eritematoso, tiroiditis autoinmune, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica y dermatitis eccematosa), psoriasis, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, diabetes de tipo I, enfermedades inflamatorias intestinales, colitis ulcerosa, asma, asma alérgica, lupus cutáneo eritematoso, esclerodermia, vaginitis, proctitis, erupciones por medicamentos, reacciones de reversión de lepra, eritema nodoso leproso, uveítis autoinmune, encefalomiелitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, pérdida auditiva sensorineural progresiva bilateral idiopática, anemia aplásica, anemia pura eritroblástica, trombocitopenia idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, síndrome de Stevens-Johnson, esprúe idiopático, liquen plano, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveítis posterior, fibrosis pulmonar intersticial, enfermedad de injerto contra hospedador, casos de trasplante (incluyendo trasplante que usa tejidos alogénicos o xenogénicos) tales como trasplante de médula ósea, trasplante de hígado o trasplante de cualquier órgano o tejido, alergias tales como alergia atópica, SIDA y neoplasmas de linfocitos T tales como leucemias y/o linfomas.

45 Los procedimientos de la invención pueden usarse para deplecionar los linfocitos T de una población celular, *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, una muestra biológica derivada de un individuo puede deplecionarse de linfocitos T *in vitro* poniendo en contacto la muestra con un compuesto anti-PSGL-1 descrito en la presente memoria, opcionalmente junto con un agente reticulante. Este procedimiento puede ser útil, por ejemplo, al permitir el enriquecimiento de células no T en una población celular así como al reducir o eliminar la actividad de linfocitos T de una población celular.

50 Los siguientes son ejemplos de la práctica de la invención. No ha de considerarse que limiten el alcance la invención en modo alguno.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de anticuerpo monoclonal anti-proteína inductora de la apoptosis de linfocitos T ("TAIP")

55 Se generó un anticuerpo monoclonal específico de TAIP aplicando los bien conocidos procedimientos de fusión de Kohler y Milstein ((1976) European Journal of Immunology 6: 511-519), produciendo un hibridoma que secreta los anticuerpos deseados. Se fusionaron células productoras de anticuerpo de un hámster inyectado con linfocitos T de bazo de Balb/C activadas con concanavalina A (Con A) con una línea celular de mieloma, formando un hibridoma secretor de anticuerpo. Se fusionaron las dos poblaciones de células con polietilenglicol, se clonaron las células productoras de anticuerpo resultantes y se propagaron mediante procedimientos de cultivo de tejido estándar. Un hibridoma generado según estos procedimientos secretaba un anticuerpo monoclonal, designado TAB4, que era

capaz de inducir la apoptosis de linfocitos T *in vitro* y deplecionar los linfocitos T *in vivo*. La proteína reconocida por TAB4 se designó proteína inductora de la apoptosis de linfocitos T (TAIP).

5 Se adquirieron ratones C57BL/6J (B6) y BALB/c de Jackson Lab (Bar Harbor, ME). Se adquirieron hámsteres sirios de Animal Core Facility, National Taiwan University Medical College.

10 Se centrifugó el sobrenadante de cultivo concentrado del hibridoma TAB4 a 20.000 x g durante 10 minutos y se diluyó el sobrenadante a una relación 1:1 con tampón de unión (acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0). Se lavó una columna de proteína G (aproximadamente 1 ml de volumen de lecho) tres veces con 3-5 ml de tampón de unión. Se introdujo el sobrenadante de cultivo clarificado en la columna de proteína G, se recogió el flujo y se reintrodujo en la columna. Se lavó la columna con 6-10 ml de tampón de unión y se eluyó el anticuerpo unido de la columna con 5 ml de tampón de elución (glicina-HCl 0,1 M, pH 2,8). Cada fracción contenía 1 ml del anticuerpo eluido y se ajustó la fracción eluida a pH neutro mezclando cada fracción de 1 ml con 50 µl de Tris-HCl 1 M, pH 7,5. Se combinaron las fracciones que contenían el anticuerpo y se dializaron frente a 2 litros de PBS, pH 7,4, tres veces a las 3 horas para cada diálisis. Se determinó la concentración de proteína en las muestras de anticuerpo con el procedimiento descrito por Bradford usando el ensayo de proteína Bio-Rad (BIO-RAD, Hercules, CA).

Ejemplo 2: Preparación de una suspensión de células de bazo de ratón y activación y enriquecimiento de linfocitos T

20 Se sumergió bazo de ratón en 8 ml de disolución salina equilibrada de Hank (HBSS), se desmenuzó suavemente con un cubreobjetos estéril, se transfirió a un tubo de centrifuga de 15 ml (Costar) y se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en el tampón residual golpeando suavemente la pared. Se lisaron los eritrocitos (RBC) contaminantes mediante la adición de 1 ml de tampón de lisis de RBC (NH₄Cl 0,6 M, base Tris 0,17 M, pH 7,65), seguido de una incubación de 2 min a temperatura ambiente y una rápida inactivación con 9 ml de HBSS. Se sedimentaron las células a 200 x g durante 5 minutos, se lavaron dos veces y se resuspendieron en medio RPMI. Se determinó la concentración y viabilidad de las células en la mezcla con un hemocitómetro (Cambridge Scientific Inc.) y exclusión con azul tripán.

30 Se ajustaron las células de bazo a una concentración final de 3·10⁶/ml con medio RPMI y se añadió concanavalina A a una concentración final de 2 µg/ml para activar los linfocitos T. Se transfirió la suspensión celular a una placa de cultivo de 6 pocillos (5 ml/pocillo) o un disco de cultivo de 10 cm (10 ml/disco) y se incubó a 37°C, 5% de CO₂ durante 48 horas antes de recoger. Se resuspendieron las células de bazo activadas, incluyendo linfocitos T activados, en 5 ml de HBSS y se superpusieron cuidadosamente sobre un colchón de 5 ml de disolución Percoll al 55% en un tubo de centrifuga. Se tuvo cuidado de no alterar las capas separadas. Se centrifugaron las células a 35 1.900 x g durante 13 minutos a 25°C sin freno. Se recogieron los linfocitos T enriquecidos de la interfase de las dos capas, se lavaron dos veces con HBSS y estaban preparadas para los experimentos.

Ejemplo 3: Apoptosis de linfocitos T activados

40 Se resuspendieron linfocitos T activados (véase el ejemplo 2) a una concentración final de 5·10⁵ células/ml en medio RPMI que contenía 5 ng/ml de IL-2, y se trataron con Ig de control, TAB4 o anti-CD3 según las condiciones mostradas en la Tabla 1.

TABLA 1

Grupos experimentales	Tratamiento*
Control negativo	3 µg/ml de Ig de hámster 5 ng/ml de IL-2 3 µg/ml de anticuerpo reticulante (anti-Ig de hámster)
TAB4	3 µg/ml de mAb de hámster TUB4 5 ng/ml de IL-2 3 µg/ml de anticuerpo reticulante (anti-Ig de hámster)
Control positivo	1 µg/ml de mAb anti-CD3 5 ng/ml de IL-2 1 µg/ml de anticuerpo reticulante (anti-Ig de ratón)
*: concentración final de los reactivos designados en el medio	

45 Después de un periodo de incubación de 18-24 horas, se determinó la extensión de la apoptosis en cada cultivo usando el ensayo de apoptosis 7-AAD. Se transfirieron los linfocitos Tratados a tubos FACS (Falcon), se lavaron dos veces con disolución FACS enfriada con hielo (1% de suero fetal bovino, 0,05% de azida de sodio en PBS) y se sedimentaron a 200 x g a 4°C. Se resuspendieron las células en disolución FACS enfriada con hielo a una concentración final de 1-2·10⁷ células/ml. Para la tinción, se mezclaron 0,1 ml de las células resuspendidas con 7-

AAD hasta una concentración final de 2 µg/ml y se incubaron entonces a 4°C en la oscuridad durante 20 minutos. Finalmente, se lavaron los linfocitos Teñidos dos veces con disolución FACS enfriada con hielo, se resuspendieron en 0,5 ml de disolución FACS y se analizaron con citómetro de flujo BD LSR (Beckton Dickison).

5 La Fig. 1 expone los resultados de un experimento de evolución temporal representativo que investigaba cuándo los linfocitos T activados adquieren sensibilidad a señales apoptóticas mediadas por TAB4 (anti-TAIP). Se activaron los esplenocitos de ratón con Con-A y se mantuvieron en medio que contenía IL-2. Se recogieron los linfocitos T activados, se resuspendieron y se expusieron a anticuerpo monoclonal TAB4 o IgG de hámster de control en presencia de anticuerpo anti-IgG de hámster como reticulante. La capacidad de la reticulación de TAEP de inducir un bajo nivel (6,5%) de muerte celular apoptótica fue evidente el primer día. Sin embargo, la extensión de la apoptosis inducida por TAB4 aumentó desde 17% el día 2 hasta un máximo de 52% el día 4, y se redujo a 44% el día 6. La IgG de hámster de control no indujo muerte de linfocitos T apoptótica específica, en comparación con los cultivos que recibieron solo IL-2. El anti-CD3 (como control positivo) indujo la apoptosis a un 38% de linfocitos T después de 48 horas de activación (datos no mostrados).

15 Ejemplo 4: Expresión del antígeno TAIP en diferentes tejidos

Se lavaron las células dos veces con disolución FACS enfriada con hielo (1% de suero fetal bovino, 0,05% de azida de sodio en PBS) y se centrifugaron a 200 x g a 4°C en un tubo FACS (Falcon). Se resuspendieron las células en disolución FACS enfriada con hielo hasta una concentración final de $1 \cdot 10^7$ células/ml, y se usó una alícuota de 0,1 ml de las células resuspendidas en un tubo FACS (Falcon) para cada ensayo. Para tinción de superficie, se añadieron anticuerpo monoclonal TAB4 o Ig de hámster de control a una concentración final de 2 µg/ml a las células y se incubaron las mezclas a 4°C durante 30 minutos en la oscuridad. Se lavaron las células una vez con FACS enfriado con hielo y se tiñeron después con: (1) para células de bazo, anticuerpos anti-CD3 conjugado con Cychrome (2 µg/ml), anti-Ig de hámster conjugado a FITC y anti-CD8/CD4/CD19/CD11b/pan-NK/I-A/I-E/Mac-3 conjugado con PE (2 µg/ml) en 100 µl de disolución FACS enfriada con hielo; y (2) para células de timo, anticuerpos anti-Ig de hámster conjugado con FITC, anti-CD8 conjugado con PE y anti-CD4 conjugado con Cychrome (2 µg/ml) en 100 µl de disolución FACS enfriada con hielo. Se efectuó la reacción a 4°C durante 30 min en la oscuridad. Finalmente, se lavaron los linfocitos Teñidos dos veces con disolución FACS enfriada con hielo, se resuspendieron en 1 ml de disolución FACS y se analizaron con citómetro de flujo BD LSR (Beckton Dickison).

Las Fig. 3 y 4 demuestran mediante análisis FACS la distribución de antígeno TAIP en las diversas subpoblaciones de esplenocitos y timocitos. Como se muestra en la Fig. 3, las células B CD19+ expresaban cantidades bajas pero detectables de proteínas TAIP sobre la superficie. Se detectaron cantidades significativamente mayores de proteínas TAIP en células CD3+ y en una fracción de los linfocitos NK. La mayoría de los linfocitos T de timo CD4+, CD8+ y CD4+8+ expresaban cantidades significativas de proteínas TAIP. En contraposición, las proteínas TAIP se expresaban solo en una pequeña población de linfocitos T de timo CD4-8- (Fig. 4).

Se recogieron tejidos de ratones B6 y BALB/c incluyendo cerebro, timo, corazón, pulmón, hígado, estómago, riñón, bazo y piel, se fijaron en formaldehído al 10% durante una noche a temperatura ambiente y se embebieron en bloques de parafina. Se prepararon secciones de tejido de un grosor de 4 µm a partir del bloque de parafina con un microtomo Leica RM2135, se extendieron en agua a 45°C y se superpusieron sobre un portaobjetos recubierto. Se secaron los portaobjetos a 37°C y estaban preparados para experimentos posteriores.

Se desparafinaron portaobjetos que contenían las secciones de parafina de tejido y se secaron mediante una serie de xilenos-etanol al 100% según un protocolo estándar, y se mantuvieron finalmente en etanol al 100%. Se rehidrataron las secciones mediante una incubación en serie de etanol al 100%-etanol al 90%, etanol al 85%, etanol al 70%, PBS según un protocolo estándar hasta una disolución final de PBS. Se efectuaron todas las siguientes reacciones en una cámara humidificada. Se bloqueó la unión no específica incubando las secciones de tejido en tampón de bloqueo (suero de cabra normal al 1%) durante 1 hora a temperatura ambiente (o a 4°C durante una noche). Se eliminó el tampón de bloqueo y se añadió TAB4 o Ig de hámster normal (dilución 1:200) a las secciones y se continuó la incubación durante otra hora a temperatura ambiente (o a 4°C durante una noche). Se lavaron las secciones dos veces con PBS, durante 5 minutos cada una, para eliminar el anticuerpo primario, se hicieron reaccionar con Ig de cabra anti-hámster conjugada con fosfatasa alcalina diluida 1:250 y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron de nuevo las secciones dos veces con PBS, 5 minutos cada una, para eliminar el conjugado de anticuerpo-enzima y se reveló la reacción de color con disolución de sustrato BCIP/NBT a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Se lavaron de nuevo las secciones con PBS para eliminar el sustrato enzimático en exceso, se deshidrataron mediante una serie de PBS-etanol-xilenos y se montaron para microscopía.

Los resultados indicaban que la expresión de proteínas TAIP se detectaba solo en tejidos derivados de médula

ósea, pero no en el resto de los tejidos ensayados.

Ejemplo 5: Biotinilación de superficie celular e inmunoprecipitación del antígeno TAIP

5 Se biotinilaron en superficie 5×10^7 células RL \square 1 o NIH-3T3 en 1 ml de PBS que contenía sulfo-NHS-biotina 0,5 mg/ml (Pierce) durante 30 minutos sobre hielo. Se terminó la reacción incubando las células con 0,5 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (Life Technologies, Inc.) durante 10 minutos sobre hielo. Se lavaron las células con 1 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco una vez y con 1 ml de disolución salina tamponada con fosfato dos veces.

10 Se lisaron células marcadas a una densidad de $5,0 \cdot 10^7$ células/ml en tampón de lisis frío (1% de Triton X-100, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 160 mM, CaCl₂ 1 mM) que contenía un cóctel inhibidor de proteasa completo (Roche) durante 15 minutos, y se sedimentó el material insoluble a $10.000 \times g$ durante 10 minutos; éstas y todas las etapas posteriores se efectuaron a 4°C. Para inmunoprecipitación, se preincubó el lisado durante 30 minutos con 50 μ l de Sepharose de proteína G empacutada (Amersham Pharmacia Biotech) para eliminar las proteínas de unión no específica. Se sedimentaron las perlas y se incubaron alícuotas del sobrenadante (correspondientes rutinariamente a $5,0 \cdot 10^7$ células) con 20 μ l de Sepharose de proteína G precargada con 10 μ g de mAb TAB4 o IgG de suero de hámster normal. Después de la incubación durante 4 h a 4°C, se lavó la resina cuatro veces con tampón de lavado (0,05% de Triton X-100, Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, NaCl 400 mM, CaCl₂ 1 mM, ovoalbúmina 1 mg/ml) y dos veces con un tampón de lavado similar que contenía NaCl 250 mM en lugar de 400 mM. Se eluyeron las proteínas que se unían específicamente a TAB4 con 50 μ l de tampón de muestra 1 x SDS. Se separaron las proteínas eluidas mediante PAGE-SDS al 8% y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (Millipore). Se analizaron en los filtros las proteínas biotiniladas con avidina conjugada con peroxidasa (PharMingen) y se revelaron con reactivo de quimioluminiscencia (NEN™ Life Science Products).

25 Como se muestra en la Fig. 2, se identificó una proteína de superficie biotinilada con un peso molecular de aproximadamente 120 kDa mediante TAB4 en células RL \square 1 (linfocitos T TAIP+), pero no en células 3T3 (linfocitos TAIP-). En contraposición, la Sepharose de proteína G recubierta con suero normal de hámster no pudo recuperar esta proteína de 120 kDa. Estos resultados sugieren que esta proteína de 120 kDa es el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal TAB4 sobre la superficie celular de linfocitos T.

Ejemplo 6: Depleción de linfocitos T *in vivo*

35 Para examinar los efectos de TAB4 sobre poblaciones de linfocitos T y otras células *in vivo*, se inyectaron ratones con 300 μ g de TAB4 o Ig de hámster de control por vía intraperitoneal y, el día 4, se recogieron esplenocitos, timocitos y células mononucleares de sangre periférica para el recuento celular total y para los análisis de marcadores de superficie celular mediante FACS.

40 Para los ensayos FACS, se fijaron las células con paraformaldehído al 2% a 4°C durante 20 minutos, se lavaron dos veces y se resuspendieron en disolución FACS enfriada con hielo a una concentración final de $1 \cdot 10^7$ células/ml. Se usó una alícuota de 100 μ l de las células resuspendidas en un tubo FACS (Falcon) para cada ensayo. Se añadieron TAB4 o Ig de hámster de control a una concentración final de 2 μ g/ml a las células y se incubaron las mezclas a 4°C durante 30 minutos en la oscuridad. Se lavaron las células una vez con FACS enfriado con hielo y se hicieron reaccionar con: (1) para células de bazo, anticuerpos anti-CD3 conjugado con Cychrome (2 μ g/ml), anti-Ig de hámster conjugado con FITC y anti-CD8/CD4/CD19/CDI 1b/pan-NK/I-A/I-E/Mac-3 conjugado con PE (2 μ g/ml) en 100 μ l de disolución FACS enfriada con hielo; y (2) para células de timo, anticuerpos anti-Ig de hámster conjugado con FITC, anti-CD8 conjugado con PE y anti-CD4 conjugado con Cychrome (2 μ g/ml) en 100 μ l de disolución FACS enfriada con hielo. Se efectuó la reacción a 4°C durante 30 minutos en la oscuridad. Finalmente, se lavaron los linfocitos Teñidos dos veces con disolución FACS enfriada con hielo, se resuspendieron en 1.000 μ l de disolución FACS y se analizaron con citómetro de flujo BD LSR (Beckton Dickison).

55 Cuatro días después de la inyección, los porcentajes de linfocitos T CD3+ en leucocitos de sangre periférica (PBL) se redujeron de un 36,7% en ratones de control a un 4,1% en ratones tratados con TAB4 (Tabla 2). El tratamiento con TAB4 causó una ligera reducción del número total de esplenocitos. Sin embargo, en ratones tratados con TAB4, hubo un 62% de reducción en el número de linfocitos T CD3+, un 50% de reducción del número de linfocitos NK y un ligero aumento del número total de células B CD19+. El número total de timocitos recuperados de ratones tratados con TAB4 era solo un 48% del nivel observado en el control (reducido un 52%). Además, excepto para linfocitos T CD4+, se redujeron todas las demás linfocitos T CD8+, CD4+CD8+ y CD4-CD8-, siendo la subpoblación de CD4+CD8+ la más profundamente afectada (64,7% de reducción).

60

TABLA 2

Bazo					
x 10 ⁶	Nº de tratamiento	Ig de hámster normal	Tratado con TA-B4	Depleción (%)	
Esplenocitos totales	123	93,5	105	14,6	
Linfocitos T CD3+	32,8	28,4	12,4	62,2	
CD3-CD19+	72,2	53,4	72,9	-0,8	
CD3-NK+	3,6	2,4	1,80	50	
Leucocitos de sangre periférica					
	Nº de tratamiento	Ig de hámster normal	Tratado con TA-B4	Depleción (%)	
Linfocitos T CD3+	36,7%	36%	4,1%	88,8%	
Timo					
x 10 ⁶	Nº de tratamiento	Ig de hámster normal	Tratado con TA-B4	Depleción (%)	
Timocitos totales	94	229	45	52,1	
CD4+	9,3	28,4	10,9	-16,6	
CD8+	5,2	7,7	3,6	30,3	
CD4+CD8+	73,8	182	26	64,7	
CD4-CD8-	5,6	10,5	4,5	19,3	
(Datos representativos de tres experimentos)					

Ejemplo 7: El anticuerpo anti-TAIP no induce la secreción de IL-2 ni TNF- α

- 5 Se inyectaron por vía intraperitoneal ratones Balb/c (H-2d) con 300 μ g de TAB4 o Ig de hámster de control. Se aislaron los esplenocitos 7 días después de la inyección, y se usaron como células sensibles en cultivo con esplenocitos C3H (H-2k) tratados con mitomicina C (como células estimulantes). Tres días después, se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se midió el contenido de IL-2 mediante un equipo ELISA (PharMingen). Como se muestra en la Fig. 5, se suprimió la producción de IL-2 en células sensibles derivadas de ratones tratados con TAB4 en comparación con la de ratones de control. Se analizaron también los niveles plasmáticos de IL-2 y TNF- α y no se observó una diferencia significativa en los niveles de IL-2 (o TNF- α) en los sueros de los ratones de control y tratados con TAB4. Puesto que la producción de IL-2 es clave para la actividad de linfocitos T, los resultados muestran que puede usarse *in vivo* un anticuerpo específico de TAIP, tal como TAB4, para manipular linfocitos T y controlar respuestas inmunes mediadas por linfocitos T indeseadas tales como las asociadas a enfermedades autoinmunes y rechazo de trasplante.

Ejemplo 8: Uso de un anticuerpo anti-TAIP para prevenir el rechazo de trasplante

- 20 Se anestesiaron ratones (obtenidos de Jackson Laboratory) de 8 a 12 semanas de edad con maleato de acepromazina (Fermenta Animal Health Co., Kansas City, MO). Antes del injerto cutáneo, se inyectaron por vía intraperitoneal ratones C57BL/6 receptores no timectomizados (H-2b) con 500 μ g de TAB4 o anticuerpos de control isotópico 7 días antes de la cirugía de trasplante de piel. 7 días después, se injertó un flanco lateral de piel de ratones Balb/c no coincidentes totalmente alógenicos (H-2d) en el flanco lateral de ratones C57BL/6 pretratados con anticuerpo. 7 días después del trasplante, se inyectaron de nuevo los ratones con 500 μ g de TAB4 o anticuerpo de control isotópico. Se controlaron los ratones cada día después del trasplante de injerto. Se consideraron rechazados los injertos cuando un 50% de la piel donante estaba necrótica. Se muestra el porcentaje de supervivencia de injerto en la Fig. 7 (n= 8). Los datos muestran que los tratamientos de anticuerpo TAB4 prolongaban la supervivencia de los injertos cutáneos alógenicos.

30 Ejemplo 9: Identificación de TAIP como PSGL-1

- El ligando 1 de glucoproteína selectina P (PSGL-1), también denominado CD162, es el principal ligando de selectina P expresado en leucocitos, incluyendo linfocitos T (Sako y col. (1993) *Cell* 75: 1179; Vachino y col. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 21966; Veldman y col. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 16470). Las características bioquímicas de TAIP, tales como su peso molecular y su tendencia a la dimerización, sugieren la posibilidad de que TAB4 pueda ser análogo de

PSGL-1. Para investigar la relación entre estos dos antígenos, se ensayó lo siguiente: 1) si el antígeno precipitado por TAB4 puede reconocerse por un anticuerpo anti-PSGL1 comercialmente disponible, y 2) si un anticuerpo anti-PSGL1 puede deplecionar TAB4 del lisado celular.

5 Se lisaron linfocitos T RL β 1 a una densidad de $1,0 \cdot 10^8$ células/ml en tampón de lisis (1% de Triton X-100, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 160 mM, CaCl $_2$ 1 mM) que contiene cóctel inhibidor de proteasa completo durante 1 hora, y se sedimentó el material insoluble a $10.000 \times g$ durante 10 minutos. Se efectuaron éstas y todas las etapas posteriores a 4°C. Se incubó el lisado correspondiente a $5,0 \cdot 10^7$ células con 20 μ l de Sepharose de proteína G recargada con 10 μ g de mAb anti-PSGL-1 (clon 2P-1, PharMingen, San Diego, CA), mAb anti-TAIP, TAB4 o IgG de suero de hámster normal. Después de incubación de 4 horas a 4°C, se lavaron las perlas cinco veces con tampón de lavado (0,05% de Triton X-100, Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, NaCl 400 mM, CaCl $_2$ 1 mM, ovoalbúmina 1 mg/ml), y dos veces con un tampón de lavado similar que contiene NaCl 250 mM en lugar de 400 mM. Se eluyeron las proteínas unidas con 40 μ l de tampón de muestra 1 x SDS. Se separaron las proteínas eluidas mediante PAGE-SDS al 6% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se inmunotransfirieron las membranas con mAb anti-PSGL-1 y se revelaron mediante IgG de cabra anti-rata conjugada con peroxidasa (H+L), seguido de quimioluminiscencia (Renaissance, NEN).

20 Se lisaron linfocitos T RL β 1 biotinilados en superficie a una densidad de $1,0 \cdot 10^8$ células/ml en tampón de lisis. Se incubó el extracto celular con 20 μ g de anticuerpo unido a 40 μ l de Sepharose de proteína G a 4°C durante una noche. Se realizaron las depleciones con mAb anti-PSGL-1 (2PH1) o IgG de rata de control, con TAB4 o suero de hámster normal de control. Se sometieron adicionalmente los lisados deplecionados a realizar la inmunoprecipitación con TAB4 o mAb anti-PSGL-1, respectivamente. Se separaron los inmunoprecipitados en gel de poliacrilamida al 6% y se detectaron mediante fluorografía. Como se muestra en la Fig. 6, el anticuerpo anti-PSGL-1 puede deplecionar la proteína TAIP de lisados de linfocitos T. Además, las proteínas inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-TAIP (TAB4) pueden reconocerse por anticuerpo anti-PSGL-1 mediante análisis Western.

Ejemplo 10: Inducción de la apoptosis en linfocitos T humanos mediante un anticuerpo anti-PSGL-1

30 Para determinar el papel desempeñado por PSGL-1 en la apoptosis de linfocitos T humanos, se llevaron a cabo experimentos de evolución temporal para investigar cuándo los linfocitos T humanos activados adquieren sensibilidad hacia señales apoptóticas mediadas por PSGL-1. Se estimularon linfocitos T humanos con el mitógeno fitohemaglutinina (PHA) y se expandieron adicionalmente en medio que contenía IL-2. Se recogieron linfocitos T activados y se expusieron después a anti-PSGL-1 en presencia de IL-2 y anticuerpos reticulantes.

35 Se tomó sangre periférica humana de adultos sanos, se heparinizó y se enriqueció en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) basándose en la densidad diferencial usando Ficoll-Paque Plus (Pharmacia Biotech). Se activaron los PBMC con PHA al 1% (Life Technologies, GibcoBRL) durante 48 horas y se mantuvieron posteriormente en IL-2 humana recombinante (5 ng/ml) durante el periodo de ensayo. Para evaluar la capacidad inductora de la apoptosis de un anticuerpo anti-PSGL-1 humano, se trataron las células activadas con: (1) 1 μ g/ml del clon de anticuerpo anti-PSGL-1 KPL-1 (BD PharMingen) más Ig de conejo anti-ratón reticulante (0,5 μ g/ml) (Jackson ImmunoResearch Laboratories); (2) Ig de ratón purificada de control isotópico más Ig de conejo anti-ratón reticulante; o (3) Ig de conejo anti-ratón reticulante sola. Después de 6 horas de tratamiento, se determinó el porcentaje de células apoptóticas tempranas mediante FACS, tiñendo con anti-anexina V (BD PharMingen) y PI (Sigma).

45 Como se muestra en la Fig. 8, la señalización desencadenada por PSGL-1 usando un anticuerpo anti-PSGL-1 más el reticulante desencadenaba un nivel significativo de apoptosis en PBMS humanas activadas por PHA (principalmente linfocitos T). El porcentaje de células apoptóticas aumentó de 8,5% los días 3 a 24% el día 8 en cultivos tratados con anti-PSGL-1. Ni los anticuerpos de control de isótopo coincidente ni reticulante solos tenían efecto alguno sobre estas células.

Ejemplo 11: Uso de anticuerpo agonista anti-PSGL-1 para tratar enfermedad autoinmune

55 Se criaron en condiciones estándar ratones diabéticos no obesos (NOD), un animal de diabetes autoinmune bien aceptado. Se desarrolló diabetes espontánea en los ratones NOD a la edad de aproximadamente 20 semanas. En el grupo experimental, los ratones recibieron tres dosis de anticuerpos anti-PSGL-1 (TAB4) por vía intraperitoneal a 300 μ g por ratón a la edad de 14, 15 y 17 semanas. Se administraron dos inyecciones adicionales con la misma dosis a las edades de 24 y 26 semanas. Se administró al grupo de control Ig de hámster a la misma dosis. Se controló en los ratones la glucosuria mediante tiras Medi-Test Glucose (Macherey-Nagel, Alemania) dos veces por semana después de la edad de 15 semanas. Se consideraron como diabéticos niveles de glucosa en orina no en ayunas superiores a 300 mg/dl para dos medidas consecutivas.

Como se muestra en la Fig. 9, el tratamiento con anticuerpo TAB4 (anti-PSGL-1) proporcionaba una protección significativa en comparación con el tratamiento de anticuerpo de control. Por tanto, un tratamiento con anticuerpo anti-PSGL-1 puede amortiguar la actividad de linfocitos T autoimunes y retardar el inicio de diabetes de tipo I.

5

Otras realizaciones

Ha de entenderse que, aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, se pretende que la descripción anterior ilustre y no limite el alcance de la invención. Otros aspectos, ventajas y modificaciones de la invención están dentro del alcance de las reivindicaciones expuestas a continuación.

10

La invención incluye adicionalmente la materia en cuestión de las reivindicaciones del documento WO 03/013603 del que deriva esta solicitud, cuyo contenido se reproduce a continuación como apartados numerados.

15

Apartado 1. Un procedimiento de prevención o reducción de la respuesta inmune mediada por linfocitos T en un individuo, comprendiendo el procedimiento:

seleccionar un individuo diagnosticado por tener o estar en riesgo de adquirir una afección caracterizada por una respuesta inmune mediada por linfocitos T excesiva o indeseada; y

20

administrar al individuo un compuesto que se une al ligando 1 de glucoproteína selectina P (PSGL-1) sobre la superficie de un linfocito T, en el que la unión del compuesto al PSGL-1 sobre la superficie del linfocito T induce una ruta de transducción de señal que da como resultado la muerte del linfocito T, previniendo o reduciendo así la respuesta inmune mediada por linfocitos T en el individuo.

25

Apartado 2. El procedimiento del apartado 1, en el que el compuesto es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al PSGL-1.

30

Apartado 3. El procedimiento del apartado 1, en el que el compuesto es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al PSGL-1.

35

Apartado 4. El procedimiento del apartado 3, que comprende adicionalmente administrar un agente que se une al anticuerpo monoclonal e induce la reticulación de una pluralidad de antígenos PSGL-1 sobre la superficie del linfocito T.

40

Apartado 5. El procedimiento del apartado 1, en el que el procedimiento comprende inducir la reticulación de una pluralidad de antígenos PSGL-1 sobre la superficie del linfocito T, en el que la reticulación induce la ruta de transducción de señal que da como resultado la muerte del linfocito T.

45

Apartado 6. El procedimiento del apartado 1, que comprende seleccionar un individuo diagnosticado por tener una enfermedad autoinmune.

50

Apartado 7. El procedimiento del apartado 1, que comprende seleccionar un individuo que ha recibido o se espera que reciba un trasplante alogénico o xenogénico.

55

Apartado 8. El procedimiento del apartado 1, que comprende seleccionar un individuo diagnosticado por tener una enfermedad alérgica.

60

Apartado 9. El procedimiento del apartado 1, que comprende seleccionar un individuo diagnosticado por tener un cáncer de linfocitos T.

Apartado 10. El procedimiento del apartado 1, en el que el linfocito T es un linfocito T activado.

65

Apartado 11. El procedimiento del apartado 1, en el que el linfocito T es un linfocito T CD4+

70

Apartado 12. El procedimiento del apartado 1, en el que el linfocito T es un linfocito T CD8+

75

Apartado 13. El procedimiento del apartado 1, en el que el procedimiento comprende detectar el número de linfocitos T en una primera muestra biológica tomada del individuo antes de la administración del compuesto, y comparar los resultados con el número de linfocitos T en una segunda muestra biológica tomada del individuo después de la administración del compuesto.

80

- 5 Apartado 14. El procedimiento del apartado 1, en el que el procedimiento comprende detectar la actividad biológica de linfocitos T en una primera muestra biológica tomada del individuo antes de la administración del compuesto, y comparar los resultados con la actividad biológica de linfocitos T en una segunda muestra biológica tomada del individuo después de la administración del compuesto.
- 10 Apartado 15. El procedimiento del apartado 1, en el que la administración da como resultado la depleción de al menos un 20% de las células CD3+ de sangre periférica en el individuo.
- 15 Apartado 16. El procedimiento del apartado 2, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo induce la muerte de al menos un 20% de las células CD3+ de sangre periférica en el individuo después de la exposición al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 20 Apartado 17. Un procedimiento de inducción de la muerte de un linfocito T o linfocito citolítico natural (NK), comprendiendo el procedimiento:
proporcionar un linfocito T o linfocito NK que expresa PSGL-1 sobre su superficie, y
poner en contacto el linfocito T o linfocito NK con un compuesto que se une al PSGL-1 sobre la superficie del linfocito T o linfocito NK, en el que la unión del compuesto al PSGL-1 sobre la superficie del linfocito T o linfocito NK induce una ruta de transducción de señal que da como resultado la muerte del linfocito T o linfocito NK.
- 25 Apartado 18. El procedimiento del apartado 17, en el que el compuesto es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al PSGL-1.
- 30 Apartado 19. El procedimiento del apartado 17, en el que el compuesto es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al PSGL-1.
- 35 Apartado 20. El procedimiento del apartado 19, que comprende adicionalmente poner en contacto el anticuerpo monoclonal con un agente que se une al anticuerpo monoclonal e induce la reticulación de una pluralidad de antígenos PSGL-1 sobre la superficie del linfocito T o linfocito NK.
- 40 Apartado 21. El procedimiento del apartado 17, en el que el procedimiento comprende inducir la reticulación de una pluralidad de antígenos PSGL-1 sobre la superficie del linfocito T o linfocito NK, en el que la reticulación induce una ruta de transducción de señal que da como resultado la muerte del linfocito T o linfocito NK.
- 45 Apartado 22. El procedimiento del apartado 17, en el que la célula es un linfocito T activado.
- 50 Apartado 23. El procedimiento del apartado 17, en el que la célula es un linfocito T CD4+.
- 55 Apartado 24. El procedimiento del apartado 17, en el que la célula es un linfocito T CD8+.
- 60 Apartado 25. El procedimiento del apartado 17, en el que el procedimiento comprende evaluar la viabilidad del linfocito T o linfocito NK después de la puesta en contacto con el compuesto.
- 65 Apartado 26. El procedimiento del apartado 17, en el que el procedimiento comprende evaluar la actividad biológica del linfocito T o linfocito NK después de la puesta en contacto con el compuesto.
- 70 Apartado 27. Un procedimiento de cribado de un modulador de la función de PSGL-1, comprendiendo el procedimiento:
proporcionar una célula que exprese PSGL-1 sobre la superficie de la célula;
poner en contacto la célula con la sustancia de ensayo; y
medir la viabilidad de la célula después de la puesta en contacto con la sustancia de ensayo, para determinar así si la sustancia de ensayo es un modulador de la función de PSGL-1.
- 75 Apartado 28. El procedimiento del apartado 27, que comprende adicionalmente detectar la muerte de la célula inducida por la sustancia de ensayo, para determinar así que la sustancia de ensayo es un modulador de la función de PSGL-1.

Apartado 29. El procedimiento del apartado 28, en el que la sustancia de ensayo es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al PSGL-1.

5 Apartado 30. El procedimiento del apartado 28, en el que la sustancia de ensayo es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al PSGL-1.

10 Apartado 31. El procedimiento del apartado 30, que comprende adicionalmente poner en contacto el anticuerpo monoclonal con un agente que se une al anticuerpo monoclonal e induce la reticulación de una pluralidad de antígenos PSGL-1 sobre la superficie de la célula.

Apartado 32. El procedimiento del apartado 28, en el que el procedimiento comprende la reticulación de una pluralidad de antígenos PSGL-1 sobre la superficie de la célula, en el que la reticulación induce la ruta de transducción de señal que da como resultado la muerte de la célula.

15 Apartado 33. El procedimiento del apartado 28, en el que la célula es un linfocito T activado.

Apartado 34. El procedimiento del apartado 28, en el que la célula es un linfocito T CD4+.

20 Apartado 35. El procedimiento del apartado 28, en el que la célula es un linfocito T CD8+.

Apartado 36. El procedimiento del apartado 28, que comprende adicionalmente fabricar cantidades a granel de la sustancia de ensayo y formular la sustancia de ensayo en un portador farmacéuticamente aceptable.

25 Apartado 37. Un kit que comprende:

un compuesto que se une al PSGL-1 sobre la superficie de un linfocito T, en el que la unión del compuesto al PSGL-1 sobre la superficie del linfocito T induce una ruta de transducción de señal que da como resultado la muerte del linfocito T; e

30 instrucciones para el uso del compuesto para tratar autoinmunidad, rechazo de trasplante, una afección alérgica o un cáncer de linfocitos T.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al ligando 1 de glucoproteína selectina P (PSGL-1) sobre la superficie de un linfocito T activado, e induce la muerte del linfocito T activado, para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad alérgica mediada por linfocitos T.
5
2. Uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al ligando 1 de glucoproteína selectina P (PSGL-1) sobre la superficie de un linfocito T activado, e induce la muerte del linfocito T activado, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad alérgica mediada por linfocitos T.
10
3. El anticuerpo según la reivindicación 1 o el uso según la reivindicación 2, en las que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

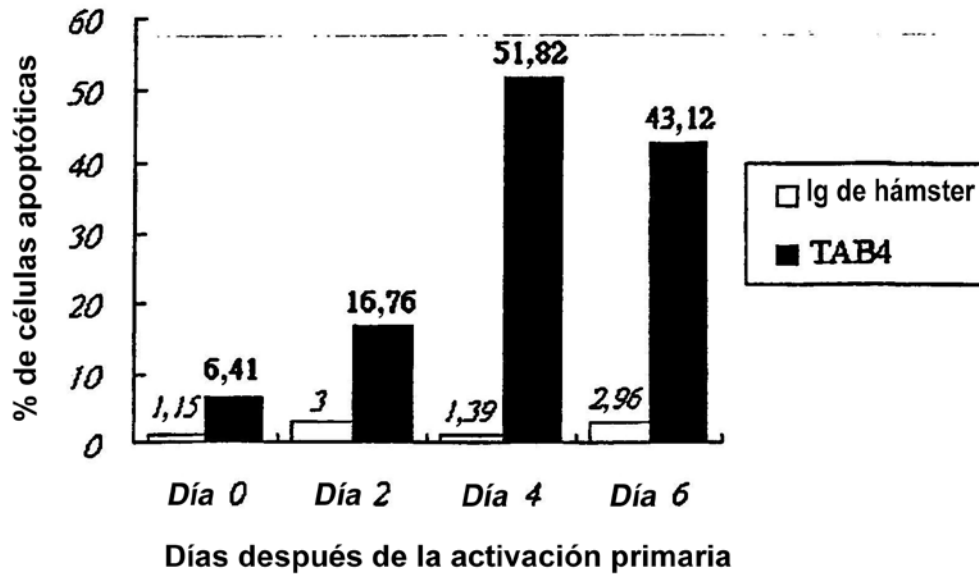
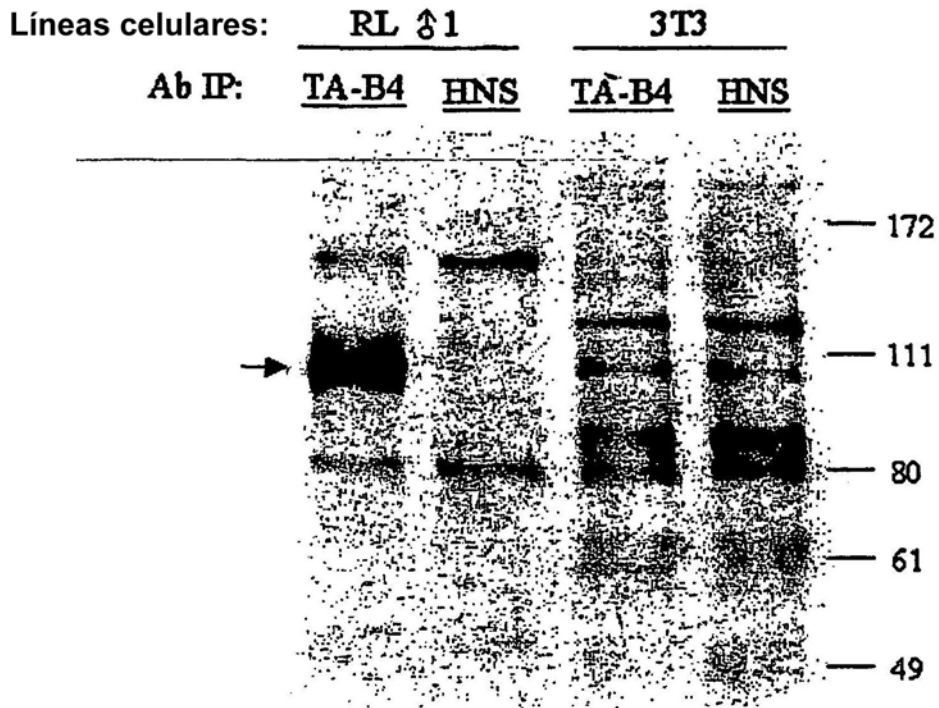


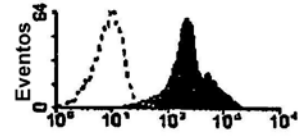
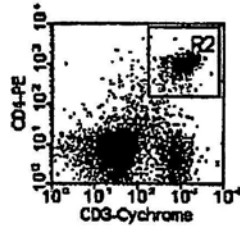
Fig. 1



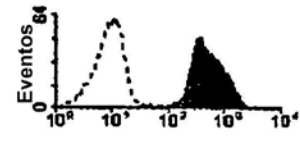
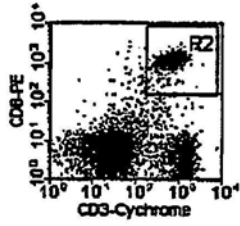
Ab IP: anticuerpo usado para inmunoprecipitación
TA-B4: anticuerpo monoclonal TA-B4
HNS: suero de hámster normal

Fig. 2

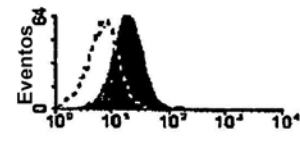
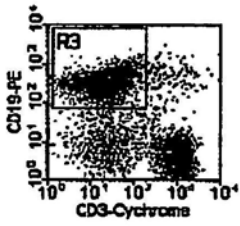
CD4 T



CD8 T



CD19⁺



Pan-NK⁺

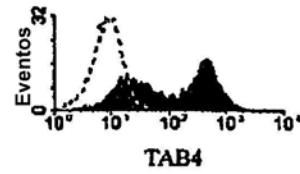
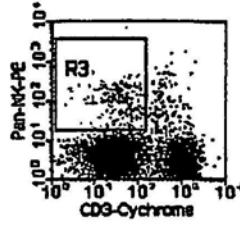


Fig. 3

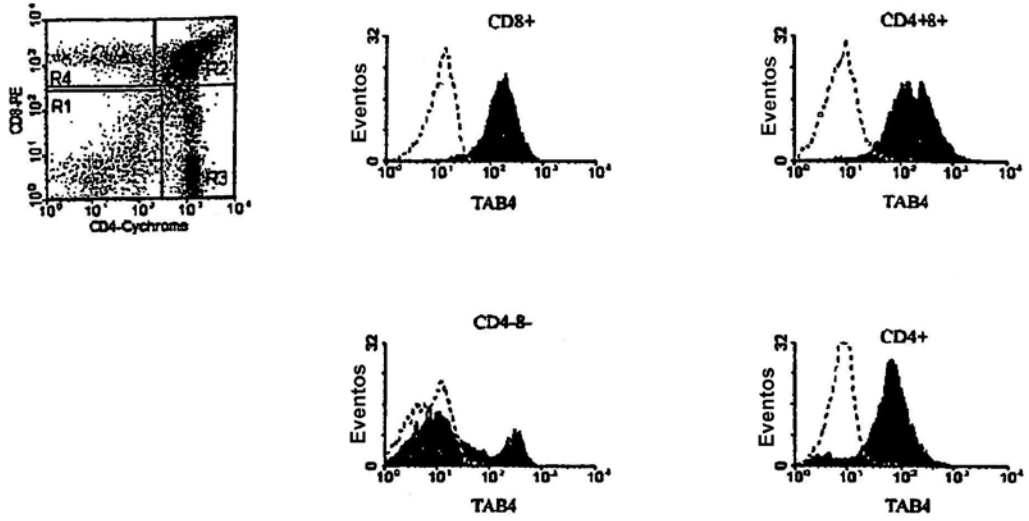


Fig. 4

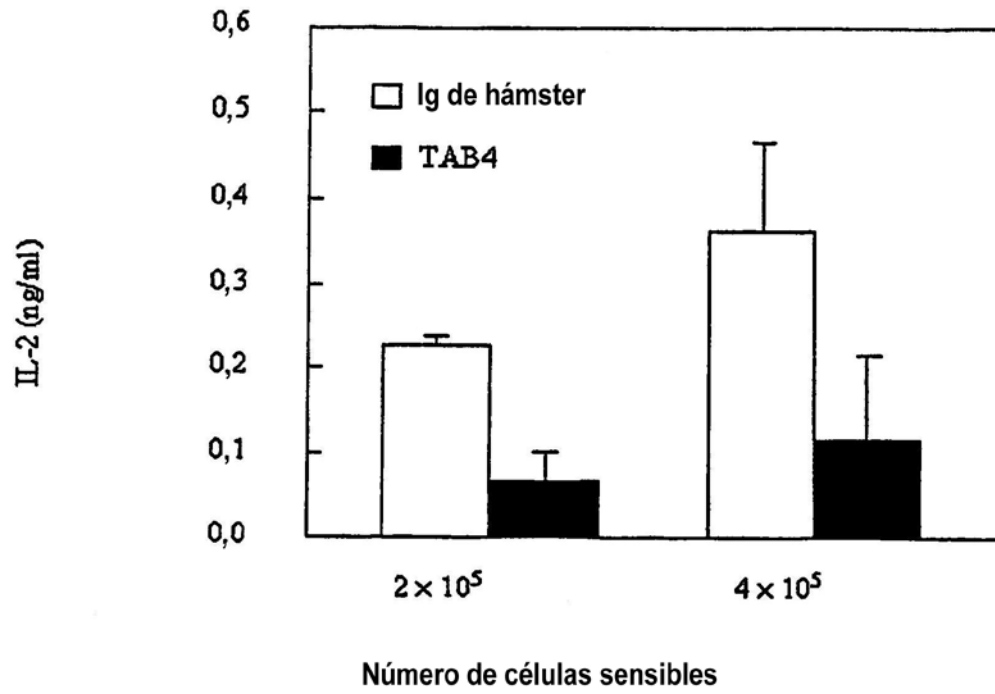


Fig. 5

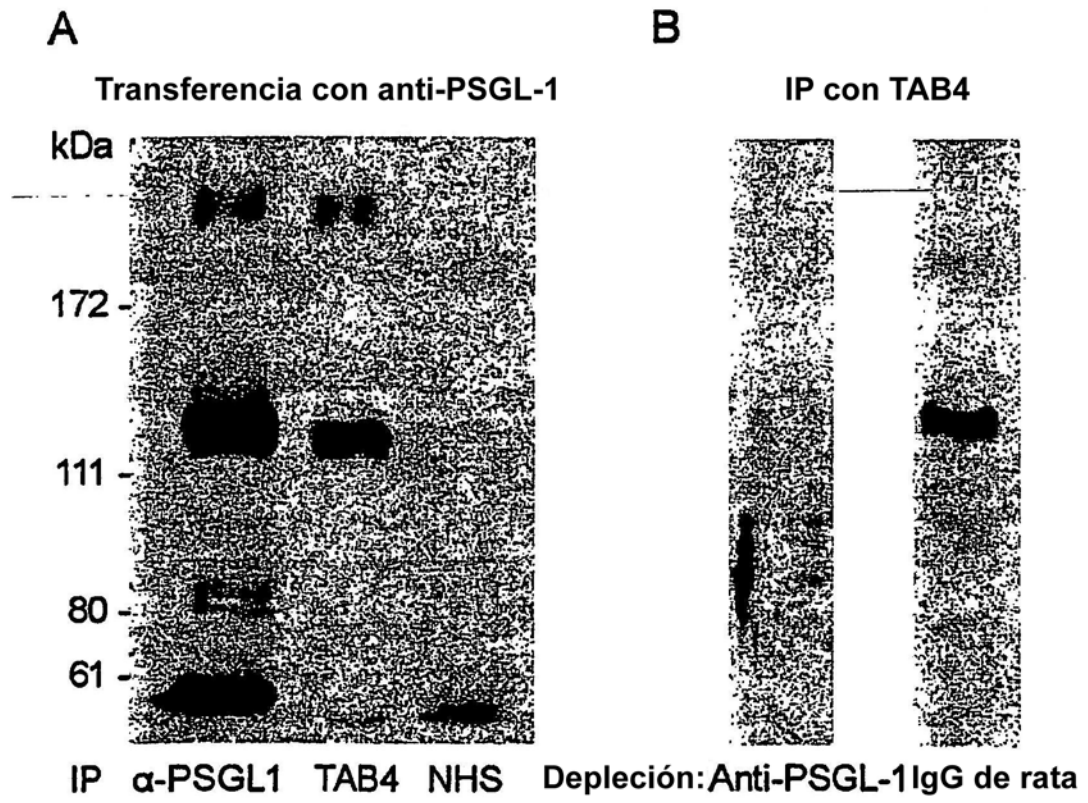


Fig. 6

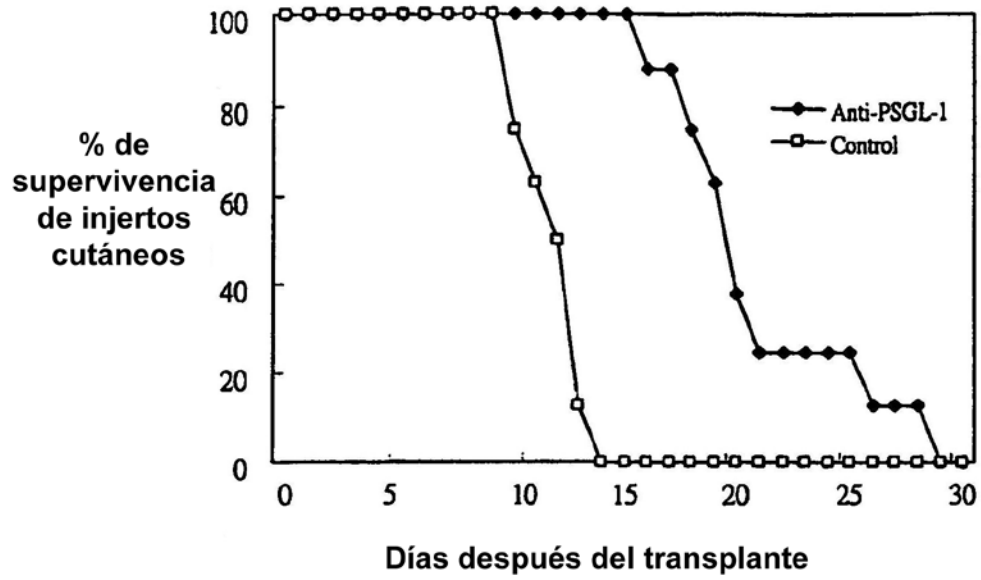


Fig. 7

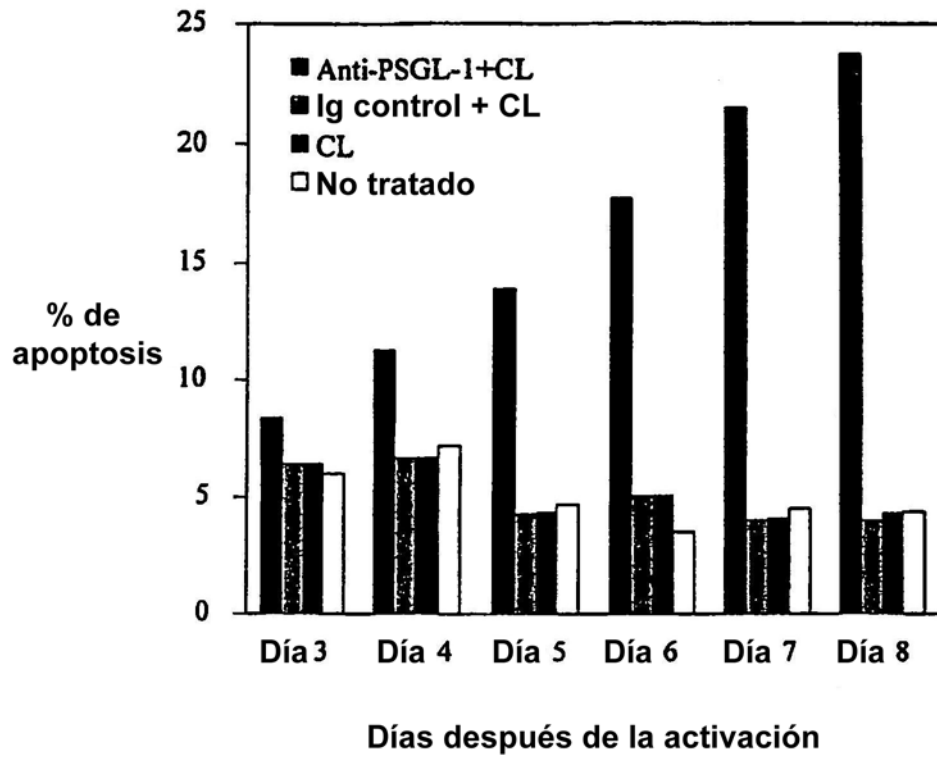


Fig. 8

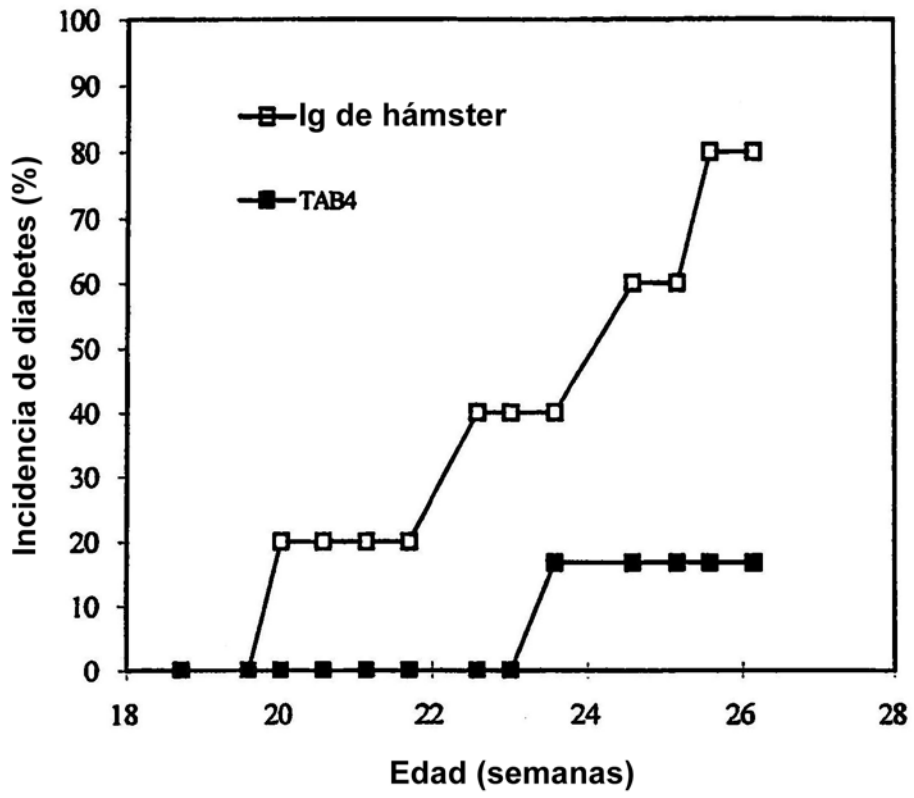


Fig. 9