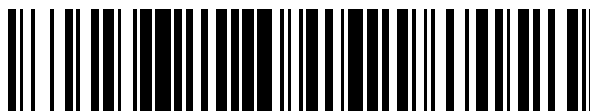


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 156**

21 Número de solicitud: 201031782

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **01.12.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
14.09.2012

71 Solicitante/s:
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
C/ EINSTEIN, 3
28049 MADRID, ES**

72 Inventor/es:
**NUÑEZ ANDRADE, Norman Andrés;
URZAINQUI MAYAYO, Ana Carmen y
SÁNCHEZ MADRID, Francisco**

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

54 Título: **USO DE PSGL-1 PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS Y AUTOINMUNES**

57 Resumen:

La invención se relaciona con el uso de PSGL-1, un polinucleótido que codifica PSGL-1 ó un agente activador de PSGL-1 para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad inflamatoria y/o una enfermedad autoinmune. Asimismo, la invención se relaciona con el uso de un animal deficiente en PSGL-1 como modelo de enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

ES 2 387 156 A1

DESCRIPCIÓN

**USO DE PSGL-1 PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
INFLAMATORIAS Y AUTOINMUNES****CAMPO DE LA INVENCION**

- 5 La invención se relaciona con el uso de PSGL-1 o un agente activador de PSGL-1 para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad inflamatoria y/o una enfermedad autoinmune. Asimismo, la invención se relaciona con el uso de un animal transgénico deficiente en PSGL-1 como modelo de enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- Las células inmunitarias innatas (incluyendo granulocitos, macrófagos, células dendríticas (CD) y linfocitos citolíticos naturales (NK o *natural killer*) residen en la mucosa intestinal y secretan citocinas y quimiocinas que son cruciales para la regulación de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa en condiciones de estado estacionario y durante la inflamación. Las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) son enfermedades inflamatorias crónicas del intestino que se desarrollan como resultado de una respuesta inmunitaria desregulada frente a bacterias comensales. Ejemplos de enfermedades inflamatorias crónicas son la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), que son trastornos inflamatorios autoinmunitarios crónicos, de etiología desconocida y que afectan a la mucosa intestinal.

- Los procesos inflamatorios dependen del reclutamiento y la activación de células inmunitarias, lo que a su vez requiere la formación de contactos intercelulares en los que participan moléculas de adhesión celular. El ligando 1 de la glicoproteína selectina P (PSGL-1) es un ligando de selectinas P, E y L, y puede mediar el contacto (*tethering*) y rodamiento (*rolling*) de leucocitos circulantes sobre el endotelio activado antes de su extravasación (Carlow D *et al.* Immunological Reviews 2009; 230:75-96). Se ha mostrado que la asociación de PSGL-1 a sus ligandos o a un anticuerpo anti-PSGL-1 específico inicia señales intracelulares en leucocitos que inducen la activación de factores de transcripción, tales como cFos, alterando así el estado de activación leucocitaria, y facilitando su adhesión firme a las células endoteliales (Hidari K *et al.* J. Biol. Chem. 1997; 272:28750-6; Urzainqui *et al.* Immunity 2002; 17(4):401-12). Además, se ha demostrado anteriormente que la interacción con sus ligandos de PSGL-1

en células dendríticas induce un programa tolerogénico que les permite desencadenar la diferenciación de linfocitos T para dar lugar a células T reguladoras (Treg) (Urzainqui A *et al.* J Immunol. 2007; 179:7457-65). Por otro lado, se ha comprobado que la interacción de PSGL-1 con selectina P suprime la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ humanas (Levesque J *et al.* Immunity 1999; 11:369-78). Asimismo, se ha observado recientemente que las células T de ratones deficientes en PSGL-1 proliferan más que las células de ratones salvajes (WT) (Matsumoto M *et al.* J Immunol. 2009; 183:7204-11). Además, PSGL-1 participa en el reclutamiento de leucocitos hacia el íleo, en un modelo de animal de Enfermedad de Crohn (Inoue T *et al.* J. Leukoc. Biol. 2005; 77:287-95), y en el reclutamiento de linfocitos Th1 hacia la lámina propia (LP) intestinal (Haddad W *et al.* J. Exp. Med. 2003; 198:369-77). La deficiencia de PSGL-1 aumenta la intensidad de la gastroenteritis aguda inducida por infección por *Salmonella typhimurium*, con una síntesis aumentada de citocinas proinflamatorias (Kum W *et al.* J. Immunol. 2009; 182:6550-61). Todos estos datos sugieren un papel de PSGL-1 en la regulación de las respuestas inmunitarias en el intestino.

Las bacterias comensales (microbiota) existen normalmente en una relación simbiótica con el intestino huésped, pero miembros de la microbiota pueden invadir de manera oportunista los tejidos mucosos, provocando graves problemas en individuos inmunodeficientes. Para garantizar la protección del huésped frente a tales invasiones por bacterias oportunistas, debe regularse estrechamente el equilibrio entre la tolerancia y la inmunidad, y el sistema inmunitario se encarga de mantener esta homeostasis intestinal. Cuando bacterias infecciosas atraviesan la barrera epitelial, los macrófagos y las CD las eliminan mediante fagocitosis y producen citocinas proinflamatorias para reclutar neutrófilos y otros leucocitos y activar así respuestas de células T. Para mantener la auto-tolerancia a la microbiota y restaurar la homeostasis tras la infección, las respuestas inflamatorias deben limitarse mediante la generación de Treg. Además, otro papel importante de los macrófagos intestinales tras la lesión es ayudar a restaurar la barrera epitelial porque el daño al epitelio puede conducir a infección bacteriana, inflamación y septicemia (Hooper L *et al.* Nat. Rev. Immunol. 2010; 10:159-69). Sin embargo, las moléculas y células que participan en la regulación de las respuestas innata y adaptativa que se producen en los tejidos mucosos no se han llegado a caracterizar completamente.

Una enfermedad autoinmune es una enfermedad causada porque el sistema inmunitario ataca las células del propio organismo. En este caso, el sistema inmunitario se convierte en el agresor y desencadena una respuesta inmune exagerada contra sustancias y tejidos que normalmente están presentes en el cuerpo. Las causas son un tanto desconocidas, pero están relacionadas con el reconocimiento proteico entre las superficies de las membranas celulares del sistema inmunitario y las que forman el organismo.

La esclerosis sistémica o esclerodermia es una enfermedad autoinmune que presenta gran severidad, porque afecta a la piel y a todos los órganos internos, acumulando colágeno y otros componentes de matriz extracelular en ellos, ocasionando un fallo multiorgánico. Actualmente no existen buenos modelos animales que desarrollen espontáneamente esclerodermia, una de las enfermedades autoinmunes más graves, sino que se utilizan modelos en los que se trata localmente con determinados agentes químicos que inducen la acumulación de colágeno en el órgano o tejido tratado, lo que permite el desarrollo de terapias para tratar la fibrosis producida en dicho órgano. En los pacientes con esclerodermia se produce una fibrosis progresiva multiorgánica que se agrava con el tiempo, además de que se produce daño vascular debido a la apoptosis de las células endoteliales, debilidad muscular, etc. Sin embargo, no existe ningún modelo animal que reproduzca todos los aspectos clínicos de la esclerosis sistémica. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos modelos animales que permitan estudiar tratamientos que retrasen la aparición de síntomas, que mejoren o curen los síntomas, que frenen o paren el avance de la enfermedad, así como estudiar factores químicos o ambientales que agravan la enfermedad, para evitar la exposición a los mismos.

Las enfermedades inflamatorias intestinales, como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, son enfermedades autoinmunes en las que se rompe el equilibrio tolerancia/inmunidad del intestino lo que permite que bacterias comensales oportunistas invadan la mucosa intestinal. Las terapias actuales para las EII emplean una secuencia de tratamientos, dirigidos inicialmente a tratar la enfermedad aguda y posteriormente a mantener la remisión (Engel M *et al.* J. Gastroenterology 2010; 45(6):571-83). En concreto, los tratamientos que se administran a los pacientes con EII son sistémicos y están basados en citocinas anti-inflamatorias, como la IL-10, o anticuerpos frente a las citocinas e interleucinas proinflamatorias que se producen durante el transcurso de la

enfermedad. Sin embargo, no existen tratamientos que actúen específicamente sobre las células del sistema inmune para regular su activación, el componente responsable de la producción de estas citocinas e interleucinas. Aunque se han usado algunos agentes biológicos para inhibir la respuesta inmunitaria aberrante en el intestino, estos agentes
 5 tienen acción sobre otros tipos celulares, y por tanto conllevan efectos secundarios perjudiciales para el paciente (Bosani M *et al.* *Biologics: Targets and Therapy* 2009; 3:77–97), por lo que existe una necesidad de identificar nuevas dianas más eficaces y más específicas para evitar los efectos secundarios derivados de los tratamientos sistémicos actuales.

10 Los modelos animales de EII son herramientas inestimables para la investigación de los mecanismos patológicos subyacentes, la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y las pruebas de posibles tratamientos (Jurjus A *et al.* *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 2004; 50:81-92), por lo que existe la necesidad de desarrollar nuevos modelos animales que cumplan dichas expectativas.

15

COMPENDIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención se relaciona con el uso de un compuesto seleccionado del grupo:

- (i) PSGL-1 o una variante funcionalmente equivalente;
 - 20 (ii) un polinucleótido que codifica PSGL-1 o una variante funcionalmente equivalente; y
 - (iii) un agente activador de PSGL-1,
- para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad seleccionada del grupo formado por una enfermedad inflamatoria y una
 25 enfermedad autoinmune.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un animal no humano deficiente en el gen PSGL-1 para:

- (i) estudiar una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria;
- (ii) evaluar la progresión de una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria; y/o
- 30 (iii) identificar compuestos potencialmente terapéuticos frente a una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra el número de células presentes en órganos linfoides y poblaciones de leucocitos residentes en órganos linfoides de ratones PSGL-1^{-/-}. **(A)** Se obtuvieron ganglios linfáticos poplíteos (GLp), ganglios linfáticos mesentéricos (GLm), placas de Peyer (PP), timo y bazo de ratones WT y deficientes en PSGL-1, se disgregaron y se procesaron para obtener suspensiones celulares. Se contaron el número de células totales en cada órgano en un contador celular automático (n=7). **(B)** Se midió el porcentaje de linfocitos y granulocitos circulantes así como el número de leucocitos por ml de sangre, en un analizador hematológico automático (n=21). Se analizaron las CD (CD11c+) y monocitos (Mo, F4/80+) circulantes mediante FACS tras la tinción con el conjunto de anticuerpos apropiado (n=10). **(C)** y **(D)** Porcentaje de poblaciones de leucocitos presentes en **(C)** GLm y **(D)** PP. Se tiñeron las células con los anticuerpos apropiados y se analizaron mediante FACS: linfocitos T CD4+ y CD8+, células B (B220+), CD (CD11c+), CDp (CD11c+B220+), macrófagos (F4/80+) y células NK (DX5α+). Los datos son medias ± desviación estándar (DE); *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

La **Figura 2** muestra las subpoblaciones de leucocitos residentes en la lámina propia (LP) del colon y la piel de ratones PSGL-1^{-/-}. Se obtuvieron suspensiones celulares a partir del colon y de la piel de ratones WT y deficientes en PSGL-1, se tiñeron con cóctel de anticuerpos y se analizaron mediante FACS. **(A)** Porcentaje de células CD45+ en el infiltrado de LP y porcentajes de granulocitos (Gr1+), células B (B220+), macrófagos (F4/80+), CD (CD11c+), células T CD4+, células T CD8+ y células NK (DX5α+) presentes en la población de células CD45+. Los datos son medias ± DE (n=10 ratones). **(B)** Expresión de moléculas marcadoras de activación en la piel y en la lamina propia de ratones WT y PSGL-1 K.O. En las células de la LP, los histogramas muestran un análisis de FACS representativo de los niveles de expresión de moléculas MHC-II en macrófagos y CD obtenidas a partir de la LP del colon de ratones WT y deficientes en PSGL-1. El diagrama de barras muestra el porcentaje de células F4/80+ que expresan la molécula coestimulante CD86 (media ± DE; n = 5 ratones). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

La **Figura 3** muestra el efecto de la inyección intravenosa de anticuerpo anti-PSGL-1 en el reclutamiento de poblaciones leucocitarias y en su estado de activación.

(A) Número total de poblaciones leucocitarias en la lámina propia tras tres dosis de 200µg/ml, administradas en días alternos, de anticuerpo anti-PSGL-1. (B) Nivel de expresión de distintos marcadores de activación (MHC-II, CD69 y CD86) en macrófagos y células dendríticas, tras el tratamiento intravenoso con anti-PSGL-1. (C) Porcentaje de poblaciones efectoras de macrófagos en la LP de ratones WT, tras el tratamiento intravenoso con anticuerpo anti-PSGL-1

La **Figura 4** muestra las células efectoras innatas y adaptativas en ratones PSGL-1^{-/-}. (A) Porcentaje de diferentes subpoblaciones efectoras de macrófagos (F4/80+) y CD (CD11c+) residentes en el infiltrado de CD45+ de la LP del colon a partir de ratones WT y deficientes en PSGL-1. Se analizaron las células mediante FACS tras la tinción intracelular para IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 o IFN γ . Los datos son medias \pm DE (n=6 ratones). (B) Porcentaje de subpoblaciones efectoras CD4+ y CD8+ en el infiltrado de CD45+ de la LP del colon a partir de ratones WT y deficientes en PSGL-1. Las células se analizaron mediante FACS tras la tinción intracelular para IFN γ (Th1), IL-17 (Th17) e IL-4 (Th2). Los datos son medias \pm DE (n=6). (C) Porcentaje de Treg (CD25^{high} Foxp3⁺) en las subpoblaciones CD4+ y CD8+ del infiltrado CD45+ de la LP del colon. Los datos son medias \pm DE (n = 12 ratones); * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

La **Figura 5** muestra la evolución de la colitis ulcerosa (CU) inducida por DSS en ratones PSGL-1^{-/-}. Se indujo colitis ulcerosa en ratones WT y deficientes en PSGL-1 incluyendo DSS al 4% (A-D) o DSS al 1% (E) en el agua de bebida. (A) Porcentaje del peso inicial desde el día 0 en el día 5 del tratamiento con DSS al 4%. Los datos son medias \pm DE (n=5 ratones) de un experimento representativo de tres; * p<0,05. (B) Transcurso temporal del índice de actividad de la enfermedad (DAI), puntuado mediante síntomas clínicos (véase el apartado relativo a Métodos). (C) Fotografías de cólores representativos obtenidas tras el tratamiento durante 5 días con DSS al 4%. (D) Tinción con hematoxilina/eosina de secciones de colon obtenidas tras el tratamiento durante 5 días con DSS al 4%. (E) Análisis de evolución de la enfermedad en ratones WT y deficientes en PSGL-1 tratados con DSS al 1% durante 10 días. Los datos son medias \pm DE (n=6 ratones) a partir de un experimento representativo de tres.

La **Figura 6** muestra un infiltrado de leucocitos en la LP del colon de ratones PSGL-1^{-/-} tras la inducción de CU. Se obtuvieron suspensiones celulares a partir de cólores de ratones WT y deficientes en PSGL-1 tratados con DSS al 4% (5 días). Se

tiñeron las células con un cóctel de anticuerpos y se analizaron mediante FACS. **(A)** Porcentaje de células CD45+ en el infiltrado de LP y el porcentaje de células Gr1+ en la población CD45+. **(B)** Porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+, células B (B220+), CD (CD11c+), macrófagos (F4/80+) y células NK (DX5 α +) en la población CD45+. **(C)** Se tiñeron las suspensiones de células F4/80+ con anticuerpos para marcadores de superficie y se analizaron mediante FACS (n=4). **(D)** y **(E)** Subpoblaciones de macrófagos **(D)** y células dendríticas **(E)** analizadas mediante tinción de citocinas intracelular y FACS. En todos los casos, los datos son medias \pm DE a partir de 6 ratones; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

10 La **Figura 7** describe las respuestas de Th y niveles de citocinas inflamatorias aumentados en la LP del colon de ratones PSGL-1^{-/-} tras la inducción de CU. Se obtuvo el colon a partir de ratones WT y deficientes en PSGL-1 tratados con DSS al 4%. **(A)** Se incubaron lisados celulares de proteína total con el cóctel de anticuerpos del kit FlowCytomix para Th1/Th2/Th17 y se analizaron mediante FACS. El panel muestra las
15 cantidades de IL-1 α , IL-22 e IL-6 halladas en 300 ng de proteína total (n=12 ratones). **(B)** Porcentajes de células T CD4+ (izquierda) y CD8+ (derecha) que expresan IFN γ (Th1), IL-17 (TH17) e IL-4 (Th2) (n=6). **(C)** Porcentaje de Treg (CD25^{high} Foxp-3⁺) en las subpoblaciones CD4+ y CD8+ (n=6). En todos los casos, los datos son medias \pm DE; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

20 La **Figura 8** muestra la presencia de autoanticuerpos nucleares y citoplasmáticos en el suero sanguíneo de varios ratones WT y deficientes en PSGL-1. Análisis en microscopio de fluorescencia de la presencia de anticuerpos que reaccionan con antígenos nucleares y citoplasmáticos presentes en células Hep2 de carcinoma de laringe.

La **Figura 9** muestra tinciones de Hematosilina-Eosina de cortes de piel de
25 ratones de 4 meses y tinción tricrómica de Masson de cortes de pulmones de ratones de 20 meses de edad, incluidos en parafina y que se han obtenido de ratones WT y de ratones deficientes para PSGL-1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 Los autores de la presente invención han observado que PSGL-1 puede ser una diana para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes. Así, tal y como se ilustra en el Ejemplo (véase el apartado 2.5), ratones deficientes en la proteína

PSGL-1 desarrollaron una forma exacerbada de colitis ulcerosa tras inducción con dextrán sulfato sódico (DSS), y la respuesta de células T en la lámina propia del colon aumenta considerablemente durante la colitis ulcerosa (CU) (véase el apartado 2.6 del Ejemplo). Además, estos ratones deficientes en PSGL-1 desarrollan de forma espontánea
5 síntomas que son compatibles con esclerosis sistémica (véase apartados 2.8 y 2.9).

Puesto que se conoce que la señalización de PSGL-1 modifica el estado de activación de leucocitos mieloides (Urzainqui A *et al.* Immunity 2002; 17:401-12), en la presente invención se utiliza un modelo de CU experimental en ratones deficientes en PSGL-1, inducida por DSS, para explorar la implicación de PSGL-1 en la patogénesis de
10 la CU y se describe el desarrollo de esclerosis sistémica espontánea en ausencia de PSGL-1. Se han obtenido evidencias claras de que PSGL-1 ejerce un papel homeostático en el tejido linfoide asociado al intestino y a la piel, y de que este receptor de adhesión participa en la patogénesis de la CU. Además se ha visto que PSGL-1 juega un papel importante en el control de la autoinmunidad, ya que en su ausencia se desarrolla la
15 esclerodermia, una de las enfermedades autoinmunes más severas.

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria del intestino que también puede ser englobada dentro de las enfermedades autoinmunes. Esta enfermedad puede ser considerada como representativa de otras enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

20 Usos terapéuticos

En un aspecto, la invención se relaciona con el uso de un compuesto seleccionado del grupo formado por:

- (i) la proteína PSGL-1 o una variante funcionalmente equivalente;
- (ii) un polinucleótido que codifica PSGL-1 o una variante funcionalmente
25 equivalente;
- (iii) un anticuerpo anti-PSGL-1; y
- (iii) un agente activador de PSGL-1,

en la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad seleccionada del grupo formado por una enfermedad inflamatoria y una
30 enfermedad autoinmune.

La proteína “PSGL-1” según se utiliza en la presente invención, recibe también el nombre de “ligando 1 de la glicoproteína selectina P” o CD162 y es una glicoproteína

que se encuentra en los leucocitos y células endoteliales y que se une a la selectinas P, L y E, aunque con mayor afinidad a la selectina P. El término PSGL-1, tal como aquí se utiliza incluye la proteína PSGL-1 de cualquier especie animal, en particular, de un mamífero, por ejemplo, PSGL-1 humana, tal y como se define en la base de datos NCBI con número de acceso Q14242 (versión de 19 de noviembre de 2010), PSGL-1 de ratón (*Mus musculus*) correspondiente a la proteína descrita en NCBI con número de acceso Q99L34 (versión de 21 de octubre de 2010), etc.

El término “variante funcionalmente equivalente de PSGL-1” tal como aquí se utiliza incluye cualquier péptido derivado de la secuencia aminoacídica de PSGL-1 generado mediante modificación, sustitución, adición, inserción y/o deleción de uno o más aminoácidos, siempre y cuando dicho péptido mantenga sustancialmente la función de la proteína PSGL-1. En concreto, la variante funcionalmente equivalente muestra al menos una función relacionada con la capacidad de provocar señales intracelulares en leucocitos que promueven su adhesión a células endoteliales e inducen la activación transcripcional de factores de transcripción, que alteran el estado de activación de los leucocitos; de reclutar leucocitos al íleo y de reclutar linfocitos Th1 y células monocíticas a la lámina propia intestinal. Métodos adecuados para determinar la capacidad de PSGL-1 de llevar a cabo alguna de las funciones descritas anteriormente incluyen los métodos descritos en el Ejemplo que acompaña a esta descripción (en particular, véanse los apartados 2.2 y 2.3), basados en la detección de dos subconjuntos (MHC-II^{dim} y MHC-II^{high}), tanto de macrófagos como de células dendríticas, en la lámina propia de ratones que presentan PSGL-1 y en la evaluación del perfil de producción de citocinas, respectivamente. Entre las variantes funcionalmente equivalentes de PSGL-1, tal como aquí se definen, se encuentra la fracción soluble de la PSGL-1.

Variantes adecuadas para su uso en la presente invención incluyen aquellas que muestran al menos un 25%, al menos 40%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con respecto a las secuencias de PSGL-1 arriba indicadas. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST (Altschul S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5;

215(3):403-10). El experto en la materia entenderá que las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en esta descripción pueden estar modificadas químicamente, por ejemplo, mediante modificaciones químicas que son fisiológicamente relevantes, tales como, glicosilaciones, fosforilaciones, acetilaciones, etc.

5 En una realización particular, la proteína PSGL-1 se puede utilizar en la presente invención en forma soluble para señalar a las células endoteliales vía selectinas. En el caso de la esclerosis sistémica, las células endoteliales mueren por apoptosis, por lo que se reduce la formación y el tamaño de los vasos sanguíneos, y es posible que la ausencia o reducción de señales vía selectinas-PSGL-1 sea causante de este problema, por lo que
10 la proteína soluble puede resolver o reducir dicho problema. Además, se contempla también que la proteína PSGL-1 se utilice en la presente invención con el fin de competir con la molécula presente en la membrana de los leucocitos para impedir que se produzca una señalización vía PSGL-1-selectinas en los leucocitos y así impedir las señales tolerogénicas que los induce y aumentar la inmunogenicidad leucocitaria y por tanto la
15 respuesta inmunológica, lo que es de gran importancia en el caso de los tumores. En una realización particular, debido a que hay células tumorales que expresan PSGL-1 y es probable que su presencia aumente la capacidad migratoria de dichas células y por tanto, la capacidad de formar metastásis tumorales, la proteína PSGL-1 soluble se puede utilizar a alta concentración para contribuir tanto a la inhibición de la tolerancia como a
20 la reducción de la capacidad migratoria de las células tumorales que expresan PSGL-1 en su membrana, en el caso de la esclerosis sistémica.

 En una realización particular, la invención contempla el uso de un polinucleótido que codifica PSGL-1 o que codifica una variante funcionalmente equivalente de PSGL-1, con el fin de administrar por terapia génica dicho polinucleótido y que se exprese la
25 proteína PSGL-1.

 El término “polinucleótido”, según se usa en la presente invención, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud y formada por ribonucleótidos y/o deoxiribonucleótidos. El término incluye tanto polinucleótidos de cadena sencilla como de cadena doble, así como polinucleótidos modificados (metilados, protegidos y
30 similares).

 Polinucleótidos que codifican PSGL-1, adecuados para su uso en la presente invención, incluyen, sin limitación, los polinucleótidos descritos en las bases de datos

que codifican PSGL-1 humana, como el descrito en la base de datos GenBank/EMBL con número de acceso NC_000012 (versión de 23 de noviembre de 2010), PSGL-1 de rata (*Rattus norvegicus*) correspondiente al polinucleótido descrito en GenBank/EMBL con número de acceso NC_005111 (versión de 23 de noviembre de 2010), PSGL-1 de ratón (*Mus musculus*) correspondiente al polinucleótido descrito en GenBank/EMBL con número de acceso NC_000071 (versión de 23 de noviembre de 2010).

El término “agente activador de PSGL-1”, según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier compuesto que es capaz de provocar un aumento en la actividad de PSGL-1, independientemente de que dicho aumento sea debido a un aumento de la actividad de PSGL-1 preexistente o a un aumento en la síntesis de PSGL-1 en las células endometriales o leucocitos. Ejemplos ilustrativos de agentes activadores de PSGL-1 incluyen, aunque no se limitan a:

- ligandos de PSGL-1, tal como las selectinas (selectina P, L o E) o análogos de dichas selectinas funcionalmente equivalentes, incluyendo péptidos que comprenden la fracción soluble de una selectina, en particular, de la P-selectina;
- compuestos que aumentan el nivel plasmático de las selectinas solubles (aumentando, por ejemplo, su expresión) o que estimulan la translocación de la selectina a la membrana celular; ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos compuestos incluyen trombina, histamina, bradiquinina, fragmentos de proteínas del complemento, radicales libres derivados de oxígeno y algunas citocinas;
- compuestos que facilitan o incrementan la unión entre PSGL-1 y su ligando (selectinas), tales como la α -1,3 fucosiltransferasa que lleva a cabo la O-glicosilación de PSGL-1, generándose una glicofoma que presenta mayor afinidad por la P-selectina y la tirosilprotein sulfotransferasa que lleva a cabo la sulfatación de algunas tirosinas de PSGL-1, aumentando la afinidad por la selectina; y
- un anticuerpo anti-PSGL-1 dirigido específicamente a PSGL-1.

Por “anticuerpo anti-PSGL-1” se entiende en el contexto de la presente invención todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse a PSGL-1 de manera específica y provoca el mismo efecto que provocaría la unión de PSGL-1 a su/s ligando/s. Los anticuerpos

anti-PSGL-1 están dirigidos específicamente contra epítomos de la proteína esenciales para desempeñar su función o contra la proteína completa. Los anticuerpos pueden ser preparados usando cualquiera de los métodos que son conocidos para el experto en la materia. Así, los anticuerpos policlonales se preparan mediante inmunización de un animal con la proteína que se desea inhibir. Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el método descrito por Kohler, Milstein y col. (*Nature*, 1975, 256: 495). Anticuerpos adecuados en el contexto de la presente invención incluyen anticuerpos intactos que comprende una región variable de unión a antígeno y una región constante, fragmentos “Fab”, “F(ab')₂” y “Fab”, Fv, scFv, diabodies y anticuerpos biespecíficos.

10 Cualquier anticuerpo dirigido contra la proteína PSGL-1 que transmita señales intracelulares se puede utilizar para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad seleccionada entre: enfermedad inflamatoria y una enfermedad autoinmune. Ejemplos ilustrativos de anticuerpos incluyen, aunque no se limitan a, el anticuerpo monoclonal dirigido a PSGL-1 humana descrito en Snapp KR *et al.* (*Blood* Y. 1998, vol. 91: 154-
15 164), el anticuerpo anti-PSGL-1 descrito por Huang C *et al.* (*European Journal of Immunology* 2005; Vol. 35: 2239-2249) y los anticuerpos anti PSGL-1 descritos en las solicitudes de patente US 20090198044 y US20090285812. Los anticuerpos, al unirse a PSGL-1 inician señales intracelulares y activan rutas de señalización que finalmente inducen la expresión génica de factores de transcripción (cFos, C/EBP, AP1),
20 responsables de controlar la síntesis de determinadas interleucinas y citocinas que son las responsables de la actividad inmunogénica/reguladora de las células del sistema inmune, por lo que actúan como verdaderos ligandos de la molécula.

Tal como entenderá un experto en la materia, es posible utilizar una combinación de los compuestos mencionados anteriormente: (i) la proteína PSGL-1 o una variante funcionalmente equivalente; (ii) un polinucleótido que codifica PSGL-1 o una variante funcionalmente equivalente; y (iii) un agente activador de PSGL-1, de manera que su efecto sea mayor.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “enfermedades inflamatorias” incluye cualquier enfermedad causada por una activación descontrolada y
30 continuada de las respuestas inflamatorias que causan daño en los tejidos; dicha respuesta inflamatoria puede ser desencadenada por agentes infecciosos, agentes físicos, agentes químicos, tumores y muerte celular. Las enfermedades autoinmunes, en la

medida en que también tienen un componente inflamatorio, caen dentro del término “enfermedades inflamatorias” tal como aquí se utiliza. En general, las enfermedades inflamatorias se clasifican según el tejido dañado, por ejemplo:

- 5 (i) las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) que comprenden un conjunto de enfermedades cuya característica principal es la presencia de una inflamación crónica, sostenida o recurrente en el intestino, tales como la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis isquémica, colitis por diversión, síndrome de Behçet, colitis linfocítica, enterocolitis eosinofílica, gastroenteritis, enfermedad injerto versus huésped (GVH) y la colitis actínica entre otras;
- 10 (ii) las enfermedades inflamatorias de las articulaciones, por ejemplo, artritis reumatoide, artritis gotosa, polimialgia reumática, tendinitis y bursitis, entre otras;
- (iii) otras enfermedades inflamatorias como la psoriasis y el asma; y
- (iv) enfermedades que cursan con un componente inflamatorio aunque su etiología no sea fundamentalmente inflamatoria.

15 El término “enfermedad autoinmune” según se emplea en la presente invención se refiere a una enfermedad causada porque el sistema inmunitario ataca las células del propio organismo; estas enfermedades pueden ser específicas de órgano o sistémicas. Ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen, aunque no se limitan a, esclerosis sistémica o esclerodermia, alopecia areata, espondilitis anquilosante, cardiomiopatía

20 autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedad autoinmune del oído interno, síndrome linfoproliferativo autoinmune, neuropatía periférica autoinmune, pancreatitis autoinmune, síndrome poliendocrino autoinmune, dermatitis autoinmune por progesterona, púrpura trombocitopénica autoinmune, uveítis autoinmune, enfermedad celiaca, enfermedad de la aglutinina fría, enfermedad de Crohn,

25 dermatomiositis, diabetes mellitus tipo I, fascitis eosinofílica, penfigoide gastrointestinal, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, lupus eritematoso, síndrome Miller-Fisher, enfermedad mixta del tejido conectivo, miastenia grave, narcolepsia, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante

30 primaria, psoriasis, artritis psoriática, policondritis recidivante, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren's, arteritis temporal, colitis ulcerosa, vasculitis y granulomatosis de Wegener.

El término “enfermedad de Crohn” se refiere en la presente invención a la enfermedad crónica autoinmune en el cual el sistema inmunitario del individuo ataca su propio intestino produciendo inflamación. Frecuentemente la parte afectada es el íleon o tramo final del intestino delgado, aunque la enfermedad puede aparecer en cualquier lugar del tracto digestivo.

El término “colitis ulcerosa” se refiere en la presente invención a una enfermedad inflamatoria del colon (el intestino grueso) y del recto. Está caracterizada por la inflamación y ulceración de la pared interior del colon.

El término “esclerodermia o esclerosis sistémica o síndrome de Crest” se refiere a una enfermedad autoinmune del tejido conectivo difuso caracterizada por cambios en la piel, vasos sanguíneos, músculos esqueléticos y órganos internos. Se desconoce(n) la(s) causa(s) de dicha enfermedad.

Para su administración a un sujeto, tanto la proteína PSGL-1 o la variante funcionalmente equivalente, el polinucleótido que codifica PSGL-1 o una variante funcionalmente equivalente, como el agente activador de PSGL-1, se formulan en una composición farmacéutica apropiada. Por tanto, la invención contempla el desarrollo de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de dichos compuestos, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El término “sujeto”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un miembro de una especie de un animal mamífero e incluye, pero no se limita a, animales domésticos, primates y humanos; preferiblemente dicho sujeto es un ser humano masculino o femenino de cualquier edad o raza.

En el contexto de la presente invención se entiende por “cantidad terapéuticamente eficaz” la cantidad de principio activo (e.g., polinucleótido que codifica PSGL-1 o una variante funcionalmente equivalente o agente activador de PSGL-1) necesaria para conseguir el efecto deseado, por ejemplo, prevenir y/o tratar una enfermedad inflamatoria, o una enfermedad autoinmune. La cantidad de dicho principio activo que puede estar presente en la composición farmacéutica puede variar dentro de un amplio intervalo. En general, la cantidad terapéuticamente eficaz de dicho principio activo a administrar dependerá, entre otros factores, del tipo de compuesto que se vaya a administrar, del sujeto que vaya a ser tratado, de su edad, de su estado, de la severidad de

la enfermedad que padezca dicho sujeto, de la forma de administración elegida, de la vía y frecuencia de administración del principio activo a administrar, etc.

El término “vehículo farmacéuticamente aceptable”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un vehículo que debe estar aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o enumerado en la Farmacopea Estadounidense o la Farmacopea Europea, u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más concretamente en humanos. El término “vehículo” se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente o portador con el que se deben administrar el principio activo (e.g., la proteína PSGL-1, el polinucleótido que codifica PSGL-1 o una variante funcionalmente equivalente o el agente activador de PSGL-1); obviamente, dicho vehículo debe ser compatible con dichos productos.

En una realización particular, el compuesto a administrar es un producto de naturaleza oligonucleotídica, tal como un polinucleótido que codifica PSGL-1 o una variante funcionalmente equivalente; en este caso, dicho polinucleótido estará incluido ventajosamente en un vector, tal como un vector viral o un vector no viral adecuado para su empleo en terapia génica, que comprende dicho polinucleótido o formando parte de una construcción génica que comprende la citada secuencia.

Existen dos enfoques principales para introducir un polinucleótido en las células de un sujeto: *in vivo* y *ex vivo*. Para la administración *in vivo*, se inyecta la molécula de ácido nucleico directamente en el paciente, habitualmente en el sitio en el que se requiere el polinucleótido, o se incluyen secuencias que lo dirigen a la célula y/o tejido de interés. Para la administración *ex vivo*, se extraen células del paciente, se introduce el polinucleótido en esas células aisladas y se administran las células modificadas al sujeto bien directamente o bien encapsuladas, por ejemplo, dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses US 4.892.538 y US 5.282.187). Otros medios para la distribución de genes a una célula o tejido incluyen, pero sin limitarse a, métodos balísticos, transferencia mediada por liposomas, transferencia mediada por receptores (complejo ligando-ADN), electroporación, precipitación con fosfato cálcico, etc. (véase por ejemplo US 4.970.154, WO 96/40958, US 5.679.559, US 5.676.954 y US No. 5.593.875).

Existen numerosas técnicas disponibles para introducir polinucleótidos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si se transfiere el polinucleótido en células

cultivadas *in vitro* o *in vivo* en las células del huésped. Las técnicas adecuadas para la transferencia del polinucleótido en células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Las técnicas para transferir moléculas de ácido nucleico *in vivo* convencionales incluyen la transfección con vectores virales. A modo ilustrativo, no limitativo, dichos vectores pueden ser vectores virales basados en retrovirus, adenovirus, etc., o en caso de los no virales, los vectores pueden ser complejos ADN-liposoma, ADN-polímero, ADN-polímero-liposoma, etc. [véase “Nonviral Vectors for Gene Therapy”, editado por Huang, Hung y Wagner, Academic Press (1999)]. Para una revisión de los protocolos de terapia génica conocidos en la actualidad véase Anderson *et al.*, Science 256:808-813 (1992).

En una realización particular, el compuesto a administrar es un agente activador de PSGL-1, de naturaleza oligonucleotídica o no oligonucleotídica, o bien la proteína PSGL-1. En este caso, dicho agente activador de PSGL-1 o la proteína PSGL-1 se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz y se formula con los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados a la forma de administración elegida.

Para el tratamiento de las enfermedades y patologías previamente mencionadas, el compuesto activador de PSGL-1 de naturaleza oligonucleotídica o no oligonucleotídica o la proteína PSGL-1 contenido en la composición farmacéutica proporcionada por esta invención puede ser administrado por cualquier medio que produzca el contacto de dicho compuesto con el sitio de acción del mismo en el cuerpo humano o animal.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la invención pueden presentarse en cualquier forma de administración adecuada, por ejemplo, sólida, líquida, etc., y pueden administrarse por cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, por vía oral, parenteral (e.g., subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, intravenosa, etc.), rectal, tópica, etc., para lo cual incluirán los vehículos farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación de la forma de administración deseada. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de formas farmacéuticas de administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, etc., las cuales pueden contener los vehículos apropiados convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., y

pueden ser preparadas por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas por esta invención también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. Otras formas de administración de la composición farmacéutica proporcionada por esta invención incluyen aerosoles, colirios, pomadas, etc., para lo cual se utilizarán los vehículos farmacéuticamente aceptables apropiados. En cualquier caso, los vehículos farmacéuticamente aceptables se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de los vehículos farmacéuticamente aceptables necesarios para su obtención así como de sus métodos de producción puede encontrarse, por ejemplo, en el “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid; y en Remington’s Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000).

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención puede contener un agente activador de PSGL-1 junto con, opcionalmente, uno o más, compuestos adecuados para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y/o enfermedades autoinmunes, que actúen frente a otras dianas diferentes de PSGL-1. Dichos compuestos son conocidos por los técnicos en la materia.

Aunque los métodos de administración y dosificación varían según la edad y el peso corporal del paciente, un experto en la técnica puede seleccionarlos de manera rutinaria. La dosificación apropiada del compuesto utilizado en la invención (proteína PSGL-1, polinucleótido que codifica PSGL-1 o agente activador de PSGL-1) depende del tipo de enfermedad que se va a tratar, la gravedad y el curso de la enfermedad, y a que se administre dicho compuesto para fines de prevención o terapéuticos. Asimismo, en el caso del agente activador de PSGL-1 también depende de la naturaleza de dicho agente. El compuesto terapéutico se puede administrar al paciente de manera adecuada en una sola vez o a lo largo de una serie de tratamientos.

Uso de un animal transgénico no humano deficiente en PSGL1

Los autores de la invención han observado que los ratones deficientes en PSGL-1 pueden ser utilizados como modelo de una enfermedad autoinmune, tal como la esclerosis sistémica o esclerodermia, así como para analizar la posible utilidad de diferentes compuestos para el tratamiento de dichas patologías o para el retraso en su aparición. Así, tal como se muestra en el Ejemplo (véase apartado 2.2.), se observa que los ratones deficientes en PSGL-1 desarrollan espontáneamente esclerodermia, siendo un modelo para dicha enfermedad autoinmune, así como para otras enfermedades autoinmunes.

La esclerosis sistémica o esclerodermia es una de las enfermedades autoinmunes más graves y que afecta a múltiples órganos. Para su estudio se utilizan modelos en los que se trata localmente con determinados agentes químicos que inducen la acumulación de colágeno en el órgano o tejido tratado, lo que permite el estudio de terapias para tratar la fibrosis producida en dicho órgano. Sin embargo, en los pacientes con esclerodermia se produce una fibrosis progresiva multiorgánica que se agrava con el tiempo, además de que se produce daño vascular debido a la apoptosis de las células endoteliales, debilidad muscular, etc. Actualmente no existe ningún modelo animal que desarrolle espontáneamente una enfermedad autoinmune, tal como esclerodermia.

Por tanto, un aspecto la invención se relaciona con el uso de un animal transgénico deficiente en PSGL-1 para (i) estudiar una enfermedad autoinmune y/o una enfermedad inflamatoria; (ii) evaluar la progresión de una enfermedad autoinmune y/o una enfermedad inflamatoria; y (iii) identificar y evaluar compuestos potencialmente terapéuticos frente a una enfermedad autoinmune y/o una enfermedad inflamatoria.

Dicho animal deficiente en PSGL-1 presenta la delección de ambos alelos del gen PSGL-1 y puede servir como modelo animal para cualquier enfermedad en la que el gen PSGL-1 se encuentre reprimido. En una realización particular, el animal transgénico es un primate no humano o un roedor. En una realización preferida dicho animal es un roedor, tal como un ratón o una rata. Métodos para generar ratones transgénicos deficientes en PSGL-1 son ampliamente conocidos en el estado de la técnica. Un ejemplo de dicho método se describe en Yang, *J et al.* J. Exp. Med. 190: 1769–1782.

En una realización particular, la invención contempla el uso de un animal transgénico deficiente en PSGL-1 para (i) estudiar la esclerodermia; (ii) evaluar la

progresión de dicha enfermedad; y (iii) identificar y evaluar compuestos potencialmente terapéuticos frente a la esclerodermia.

Los animales transgénicos de la invención son deficientes en PSGL-1 y por tanto, presentan un fenotipo alterado que se corresponde con el fenotipo de una enfermedad inflamatoria o autoinmune. Dicho fenotipo se puede utilizar para estudiar o analizar en detalle dichas enfermedades, así como para evaluar la progresión de las citadas enfermedades e incluso para identificar y evaluar la reversión del fenotipo de los animales transgénicos deficientes y por tanto se pueden identificar compuestos útiles para el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente.

En una realización particular la enfermedad autoinmune es la esclerodermia o esclerosis sistémica.

El siguiente Ejemplo sirve para ilustrar la invención y no debe ser considerado como limitativo del alcance de la misma.

EJEMPLO 1

Evaluación de la colitis ulcerosa inducida en un modelo animal

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Reactivos y anticuerpos monoclonales

Los siguientes anticuerpos conjugados (Ac) se obtuvieron de BD Pharmingen (San José, CA, EE.UU.): anti-CD11c-PECy7, F4/80-biotina, MHC-FITC, CD4-PE, CD8-APC, CD25-biotina, B220-FITC, Gr1-APC, DX5 α -biotina, CD3-FITC, IL-12-PE, IL-10-PE, IFN γ -FITC, IL-4-APC, IL-17-PE y estreptavidina-PerCP. El DSS (dextrán sulfato sódico) procedía de MP Biomedicals, LLC (Illkirch, Francia). Colagenasa IA, dispasa, ADNasa I y el reactivo TRI[®] procedían de Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, EE.UU.). El kit Th1/Th2 10plex de ratón procedía de Bender Medsystems GmbH (Viena, Austria). Las proteínas tisulares se extrajeron con tampón de extracción de proteínas tisulares T-PER[®] de Thermo Scientific (Rockford, IL, EE.UU.), y se cuantificaron con el kit de ensayo de proteínas BCA[™] (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.).

1.2 Ratones

Los ratones C57B1/6 PSGL-1^{-/-} fueron proporcionados amablemente el Dr. M. K. Wild y el Dr. D. Vestweber (Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Münster, Alemania). Los ratones C57B1/6 WT se obtuvieron de “The Jackson Laboratory”. Se
5 criaron los ratones en las instalaciones para animales de los inventores durante de 3 a 4 meses antes de usarse para los experimentos, y todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las directrices nacionales e institucionales para el cuidado de los animales.

10 1.3 Preparación de células a partir de tejidos y análisis

Se obtuvieron suspensiones celulares a partir de ganglios linfáticos mesentéricos y poplíteos (GLm y GLp), bazo y placas de Peyer (PP) mediante desagregación por fricción entre dos portaobjetos de microscopio. Se procesaron las suspensiones celulares para determinar el recuento celular, tinción de anticuerpos y análisis de FACS
15 (citometría de flujo). Se analizaron los linfocitos de sangre periférica con un analizador hematológico automático Junior Vet de ABACUS o se tiñeron para el análisis de FACS.

Para preparar suspensiones celulares a partir de Lámina Propia (LP), se extirparon los colon, se lavaron con PBS (tampón fosfato salino), se cortaron en trozos de 1 mm y se incubaron en medio RPMI suplementado con suero de ternera fetal al 4% y
20 colagenasa IA 1 mg/ml, dispasa 1 mg/ml y ADNasa I 40 µg/ml en un baño con agitación a 37°C durante 1 h. Después se lavaron las células, se suspendieron en PBS que contenía BSA (albúmina de suero bovino) al 1%, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0,5 M y se inmunotiñeron de la siguiente manera: en primer lugar se añadió anticuerpo biotinilado y se incubaron las muestras a 4°C durante 15 min. Entonces se fijaron las
25 células, se permeabilizaron y simultáneamente se marcaron con estreptavidina-PerCP y los anticuerpos conjugados indicados. Se analizaron las células marcadas en un citómetro de flujo FACSCalibur. Para medir las citocinas, se congelaron los colon y GLm en nitrógeno líquido, se pulverizaron y se suspendieron en tampón de lisis de extracción de proteínas. Se cuantificó el contenido en proteína con el kit BCATM y se determinaron los
30 niveles de citocinas con el kit 10plex de ratón para citocinas, siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.4 Inducción de colitis ulcerosa y evaluación de la enfermedad

Se indujo colitis ulcerosa (CU) mediante administración diaria de DSS al 4% o al 1% (peso molecular de 30.000 a 40.000 Da) disuelto en el agua de bebida. Los parámetros clínicos usados para puntuar la enfermedad (índice de actividad de la enfermedad o DAI) fueron la pérdida de peso, heces sueltas/diarrea y presencia de hemorragia oculta/macros cópica (Cooper H *et al.* Laboratory Investigation 1993;69: 238-249). Se pesaron los animales antes de iniciar el tratamiento (peso inicial) y cada día hasta el final del tratamiento. También se revisaron los animales diariamente para determinar la consistencia de las heces y detectar la presencia de sangre en las heces. Al final del tratamiento, se procesaron los colon para realizar un análisis histológico para comprobar la presencia de infiltrado en la LP.

1.5 Análisis estadístico

Se estimó la significación estadística aplicando la prueba de la U de Mann-Whitney. Las diferencias se consideraron significativas a $*p < 0,05$.

2. RESULTADOS

2.1 La deficiencia de PSGL-1 altera la homeostasis del sistema inmunitario

Aunque las selectinas y sus ligandos participan en la recirculación (*homing*) de leucocitos a diferentes tejidos, no se ha descrito el papel exacto de PSGL-1 en el establecimiento de poblaciones de células inmunitarias residentes en el tejido linfoide asociado al intestino. Por tanto se analizó la celularidad de órganos linfoides y la distribución de poblaciones de leucocitos en ratones deficientes en PSGL-1. Se observó que los bazos de esos animales contenían un número aumentado de células en comparación con bazos WT, tal como se muestra en la Figura 1A. En cambio, el número de células en GLp y GLm así como las PP de animales PSGL-1^{-/-} (PSGL-1 KO) estaba significativamente disminuido (Figura 1A). La sangre de los ratones PSGL-1^{-/-} mostró un aumento significativo, por ml de sangre, de granulocitos, CD y monocitos (Figura 1B), alterando las proporciones homeostáticas en la sangre de las diferentes poblaciones leucocitarias, reduciendo la proporción de linfocitos. Además, los GLm procedentes de ratones deficientes en PSGL-1 contenían un número reducido de linfocitos T CD4- y

células NKT CD8⁺ (Figura 1C). Finalmente, las PP de estos animales mostraron una reducción significativa en el número de células NKT CD8⁺ o CD4⁺ y CDp (Figura 1D). Estos resultados sugieren que PSGL-1 ejerce un importante papel regulador en la distribución tisular de diferentes subconjuntos de leucocitos.

5

2.2 PSGL-1 participa en la distribución y el estado de activación de leucocitos de la LP y de la piel

Dadas las frecuencias alteradas de células inmunitarias en GLm y PP de ratones PSGL-1^{-/-} en condiciones de estado estacionario, a continuación se analizó el fenotipo de los leucocitos en la LP del colon y en la piel, puesto que se observó que un 30% de los animales deficientes para PSGL-1 presentaban heridas en la piel que no eran debidas a infección por estreptococos. En la lámina propia se observaron números relativos aumentados de granulocitos, células CD8⁺ y células B (Figura 2A) y, en cambio, se observó un número disminuido de macrófagos (F4/80⁺), CD (negativas para linaje, CD11c⁺) y linfocitos NK (DX5α⁺) en la LP de ratones deficientes en PSGL-1 (PSGL-1 KO). Asimismo, en la piel se encontraron números relativos aumentados de granulocitos y linfocitos B, y números relativos disminuidos de macrófagos y de linfocitos CD8⁺. Además, mientras que en la lámina propia de ratones WT se detectaron dos subconjuntos (MHC-II^{dim} y MHC-II^{high}) tanto de macrófagos como de CD, en la LP de ratones deficientes en PSGL-1 sólo se observaron células MHC-II^{med}, indicando la ausencia de la población no activada (Figura 2B). Además, todos los macrófagos PSGL-1^{-/-} expresaron la molécula co-estimulante CD86, mientras que sólo el 20% de los macrófagos de los ratones WT eran positivos para esta molécula (Figura 2B). En el caso de la piel, los macrófagos presentan fenotipo proinflamatorio (CD11c^{high}Gr1^{high}), y presentan mayores niveles de expresión del marcador de activación CD69, al igual que las CD, que también expresan mayores niveles de MHC-II y CD86. Estos datos sugieren que en la LP del colon y en la piel de ratones PSGL-1^{-/-} la mayoría de las CD y los macrófagos están en estado activado, actuando probablemente como células presentadoras de antígenos eficaces.

30

2.3 El tratamiento *in vivo* con anticuerpo anti-PSGL-1 reduce el reclutamiento de macrófagos, células dendríticas y linfocitos B a la lámina propia del colon y reduce su estado de activación.

Se analizó el papel del tratamiento por vía intravenosa con anticuerpo anti-PSGL-1 en ratones WT. Para ello se realizaron, en días alternos, tres inyecciones (200 µg/inyección) del anticuerpo anti-PSGL-1 4RA-10 o del control de isotipo. Los animales se sacrificaron 18 horas después de la última inyección y se analizaron en ellos las poblaciones leucocitarias en la LP del colon. Como se observa en la Figura 3A, el tratamiento con anti-PSGL-1 por vía sanguínea, redujo la presencia de linfocitos B, macrófagos y CD en el colon, pero a diferencia de lo que ocurre en el KO de PSGL-1, los macrófagos y las células dendríticas presentaban niveles más bajos de MHC-II y de los marcadores de activación CD69 y CD86, indicando que la unión del anticuerpo anti-PSGL-1 induce señales que inhiben la activación de estas células (Figura 3B), lo que se traduce en menor porcentaje de macrófagos, presentes en la LP, que producen citocinas proinflamatorias como IL-12 e IFN γ (Figura 3C)

2.4 La deficiencia de PSGL-1 genera un entorno proinflamatorio en la LP del colon, con niveles aumentados de citocinas Th1 y Th2 y números reducidos de Treg

Se evaluó el perfil de producción de citocinas mediante macrófagos y CD residentes en la LP del colon de ratones WT y PSGL-1^{-/-} en condiciones de estado estacionario. Tal como se muestra en la Figura 4A, la mayoría de las CD y macrófagos de ratones WT sintetizaron interleucina 10 (IL-10), produciendo sólo un pequeño porcentaje de células IL-12, IL-4, IL-17 o IFN γ (interferón γ). En cambio, en ratones deficientes en PSGL-1 el número de macrófagos y CD IL-10⁺ se redujo notablemente, mientras que la proporción de células que producían IL-12, IL-4 e IL-17 aumentó, un perfil de citocinas que puede favorecer la generación de fenómenos inflamatorios.

También se estudiaron las características de los linfocitos T residentes en la LP del colon. Tal como se muestra en la Figura 4B, se detectó un número aumentado de linfocitos T CD4 IFN- γ ⁺ o IL-4⁺ en ratones PSGL-1^{-/-}. Además, se observó una proporción aumentada de células T CD8 IL-4⁺ en estos animales (Figura 4B). Asimismo, el porcentaje de células T con fenotipo regulador (CD25^{high} Foxp-3⁺) se redujo significativamente en la LP de ratones deficientes en PSGL-1 (Figura 4C).

2.5 Los ratones PSGL-1^{-/-} desarrollan una forma exacerbada de colitis ulcerosa

Para evaluar la influencia de la homeostasis de intestino alterada de ratones deficientes en PSGL-1 sobre el inicio y la evolución de la enfermedad inflamatoria del intestino, se utilizó un modelo de colitis ulcerosa experimental inducida por dextrán sulfato sódico (DSS). La adición de DSS al 1% al agua de bebida provoca síntomas apenas detectables en el día siete del tratamiento en ratones C57/B16, mientras que el tratamiento con DSS al 4% provoca enfermedad aguda con síntomas clínicos e histológicos graves (Cooper *et al.* citado *ad supra*). A cualquier dosis, los síntomas clínicos comenzaron más temprano en ratones PSGL-1^{-/-} (Figura 5A, B y E). El examen de la enfermedad inducida por DSS al 4% mostró que la enfermedad evolucionaba más rápido y era más grave en ratones PSGL-1^{-/-}: en el día 5 de tratamiento los ratones deficientes habían perdido en promedio el 20% de su peso inicial (Figura 5A), tenían un alto índice de actividad de la enfermedad (Figura 5B) y mostraban inflamación de colon más grave que los WT (Figura 5C). Además, tres de los 16 ratones deficientes murieron en el día 5 antes de completar el análisis. El análisis histológico mostró que los colon de los ratones PSGL-1^{-/-} estaban más distendidos y mostraban una mayor infiltración y un grado más alto de destrucción de la cripta que los de los ratones WT (Figura 5D). El tratamiento con DSS al 1% indujo síntomas clínicos en ratones PSGL-1^{-/-} que comenzaron a los 3 días, y se alcanzó el DAI máximo en el día 8, presentando todos los animales heces sueltas y hemorragia (Figura 5E). El análisis histológico mostró más puntos de infiltración en la LP de los ratones deficientes en PSGL-1 (Figura 5E). Estos resultados indican que los ratones deficientes en PSGL-1 inician la colitis ulcerosa más temprano y desarrollan una enfermedad más grave que los ratones WT.

25

2.6 La deficiencia de PSGL-1 altera los perfiles de subpoblaciones de células inmunitarias inflamatorias en la LP del colon afectada por CU

Se analizó el infiltrado de células inflamatorias del colon inducido por el tratamiento con DSS. Tal como se muestra en las Figuras 6A y 6B, se observó un número disminuido de CD y macrófagos en el infiltrado de células inflamatorias de ratones PSGL-1 KO. Sin embargo, se observó una expresión aumentada del marcador de activación CD69 en la población de macrófagos de estos animales (Figura 6C). Además,

30

se detectó una proporción aumentada de células NKT CD8⁺ en ratones deficientes en PSGL-1 (Figura 6B). El análisis de la producción de citocinas mostró que los porcentajes de macrófagos que producían IL-12, IL-4 e IFN γ eran superiores en los ratones PSGL-1^{-/-} (Figura 6D). Además, la proporción de CD IL-10⁺ era inferior en ratones deficientes en PSGL-1, mientras que el porcentaje de células que producían IL-4 estaba significativamente aumentado (Figura 6D). La baja proporción de CD, macrófagos y linfocitos NK que se ha detectado en la LP de ratones deficientes en PSGL-1 podría explicarse mediante el papel de PSGL-1 en el reclutamiento de leucocitos hacia LN, íleo y LP.

El perfil de citocinas y el fenotipo de estos macrófagos y CD indica que están en un estado activado (expresión de CD86 y MHC-II y síntesis aumentada de IL-4, IL-12 e IL-17, con una producción disminuida de IL-10), un fenómeno que podría asociarse causalmente con los números aumentados de granulocitos, células B y células T CD8⁺. Se ha descrito ampliamente que IL-10 es un potente supresor de la activación de macrófagos clásica, y los animales deficientes en esta citocina muestran inflamación intestinal espontánea así como síntesis aumentada de las citocinas proinflamatorias IL-12 y TNF α . Sin embargo, a pesar del entorno proinflamatorio detectado en la LP del colon de los ratones PSGL-1^{-/-}, estos animales no desarrollan espontáneamente inflamación intestinal o CU. Resulta viable que la proporción relativa baja de Treg observada en ratones deficientes en PSGL-1 es suficiente para limitar la proliferación de células efectoras Th1, Th2 y Th17 en condiciones de estado estacionario. Con respecto al papel de PSGL-1 sobre linfocitos T y el desarrollo de CU, se han observado resultados aparentemente opuestos. Por tanto, se ha mostrado que la deficiencia para PSGL-1 exagera el desarrollo de la inflamación en un modelo de colitis ulcerosa (CU) en ratón inducida por la transferencia adoptiva de células T indiferenciadas a huéspedes deficientes en RAG. Sin embargo, usando el mismo modelo de ratón, otro estudio notificó que no se requería PSGL-1 para iniciar CU.

2.7 La respuesta de células T en la LP del colon durante la CU se exagera en ratones deficientes en PSGL-1

A continuación se llevó a cabo un análisis de múltiples citocinas de homogeneizados de colon. Resulta interesante que los niveles de IL-1 α , IL-22 e IL-6

inducidos mediante tratamiento con DSS fueron notablemente superiores en el colon de ratones PSGL-1^{-/-} (Figura 7A). Además, se detectó un número aumentado de células T CD4⁺ que producían IFN- γ e IL-17 (células Th1 y Th17, respectivamente) en ratones deficientes en PSGL-1 (Figura 7B). El análisis de linfocitos T CD8⁺ mostró un aumento similar en células IFN- γ ⁺ e IL-17⁺ (Figura 7B). En cambio, se observaron niveles similares de células Treg en ratones WT y PSGL-1^{-/-} (Figura 7C).

2.8 Presencia de autoanticuerpos en el suero sanguíneo de los ratones deficientes para PSGL-1.

Se obtuvo suero sanguíneo a partir de la sangre de ratones WT y KO, y se analizó, mediante ensayos de inmunofluorescencia, la presencia de anticuerpos que reconocen proteínas nucleares y/o citoplasmáticas, que es prueba diagnóstica de autoinmunidad. Como se observa en la Figura 8, el suero procedente de ratones WT no reconoce ningún antígeno nuclear ni citoplasmático (panel superior)), mientras que el suero procedente de ratones PSGL-1^{-/-} KO tiene una alta reactividad con antígenos nucleares y, en algunos ratones, también citoplasmáticos (panel inferior).

2.9 Presencia de infiltrado leucocitario y acumulación de matriz extracelular en la dermis y en los pulmones de los ratones deficientes para PSGL-1, compatible con esclerodermia

Dado que el 30% de los ratones deficientes en PSGL-1 presentaban heridas en la piel, se tiñeron cortes de piel incluida en parafina con Hematosilina-Eosina. El análisis comparativo de la piel obtenida de ratones WT y KO mostró que la piel de los ratones PSGL-1^{-/-} presentaba mayor infiltrado leucocitario y además presentaba un engrosamiento de la dermis por acúmulo de colágeno (panel superior), lo que es una prueba diagnóstica de esclerosis sistémica o esclerodermia. También se realizó un experimento de envejecimiento, y a partir de los 20 meses comenzaron a presentar síntomas graves de dolor, falta de reactividad, adelgazamiento, malestar y muerte en el 20% de los casos, por lo que hubo que sacrificarlos. El análisis comparativo de los pulmones de estos ratones de 20 meses con los de ratones WT de la misma edad (panel inferior) indicó que en todos los casos presentaban infiltrado leucocitario y fibrosis, lo que también es característico de la esclerosis sistémica.

Por consiguiente, en la presente invención se demuestra que PSGL-1 tiene un papel relevante en el mantenimiento del equilibrio entre la tolerancia y la inmunidad, tanto en la piel como en el intestino, debido a que se ha visto que los ratones deficientes en PSGL-1 muestran un tamaño reducido de órganos linfoides asociados al intestino, y que su perfil de poblaciones de células inmunitarias es anómalo, lo que sugiere una homeostasis alterada.

A pesar del número relativamente bajo de macrófagos y células dendríticas en la LP y en la piel de ratones deficientes en PSGL-1, en condiciones de estado estacionario, estos animales desarrollan rápidamente una forma agresiva de CU tras el tratamiento con DSS y, espontáneamente, esclerosis sistémica. Este fenómeno sugiere que estos ratones tienen una capacidad aumentada para generar respuestas inmunitarias innatas, y concuerda con el fenotipo activado de macrófagos de la LP y de la piel. Con respecto a esto, se ha descrito que las CD inmunogénicas y los macrófagos activados pueden sintetizar las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-1, que inducen la diferenciación de células Th17. Por tanto, es muy probable que en ratones deficientes en PSGL-1, la presencia de un gran número de macrófagos activados en condiciones de estado estacionario favorezca la diferenciación de linfocitos Th17, en presencia de un factor desencadenante tal como DSS. A su vez, los linfocitos Th17 serían responsables de la sobreproducción observada de IL-22, que junto con IL-17 ejerce un importante efecto proinflamatorio. Resulta interesante que estudios recientes en seres humanos con EII han detectado niveles aumentados de ARNm de IL-17, IL-1 e IL-6 en la mucosa intestinal y una razón reducida de Treg/Th17 circulante.

También se ha observado en ratones deficientes en PSGL-1 con CU que a pesar de un número aumentado de linfocitos IL-17⁺ e IFN- γ ⁺ efectores de LP, estos animales muestran una proporción similar de células Treg que los ratones WT, lo que indica que el balance Treg/Teff está muy disminuido. Estos datos soportan adicionalmente que los ratones deficientes en PSGL-1 tienen una generación defectuosa de células Treg, un fenómeno que contribuye muy probablemente al daño tisular aumentado observado tras la inducción de CU. Por tanto, estos hallazgos indican que el acoplamiento de PSGL-1 en CD y macrófagos es necesario para la regulación de respuestas de células inmunitarias innatas así como para la modulación de respuestas de células T adaptativas y el inicio/resolución de los fenómenos inflamatorios. Como consecuencia, esto sitúa a la

PSGL-1 como una diana potencial novedosa para la intervención farmacológica para mejorar o resolver enfermedades inflamatorias tales como EII y autoinmunes como la esclerosis sistémica.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un agente activador de PSGL-1 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad seleccionada entre una enfermedad inflamatoria y una enfermedad autoinmune, en donde dicho activador de PSGL-1 es un anticuerpo anti-PSGL-1.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria del intestino.

10

3. Uso según la reivindicación 2, en el que dicha enfermedad inflamatoria del intestino se selecciona del grupo formado por colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por diversión, síndrome de Behçet, colitis indeterminada, gastroenteritis y enfermedad de Crohn.

15

4. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad autoinmune se selecciona del grupo formado por esclerosis sistémica, alopecia areata, espondilitis anquilosante, cardiomiopatía autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedad autoinmune del oído interno, síndrome linfoproliferativo autoinmune, neuropatía periférica autoinmune, pancreatitis autoinmune, síndrome poliendocrino autoinmune, dermatitis autoinmune por progesterona, púrpura trombocitopénica autoinmune, uveítis autoinmune, enfermedad celiaca, enfermedad de la aglutinina fría, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, diabetes mellitus tipo I, fascitis eosinofílica, penfigoide gastrointestinal, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, lupus eritematoso, síndrome Miller-Fisher, enfermedad mixta del tejido conectivo, miastenia grave, narcolepsia, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, psoriasis, artritis psoriática, policondritis recidivante, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren's, arteritis temporal, colitis ulcerosa, vasculitis y granulomatosis de Wegener.

30

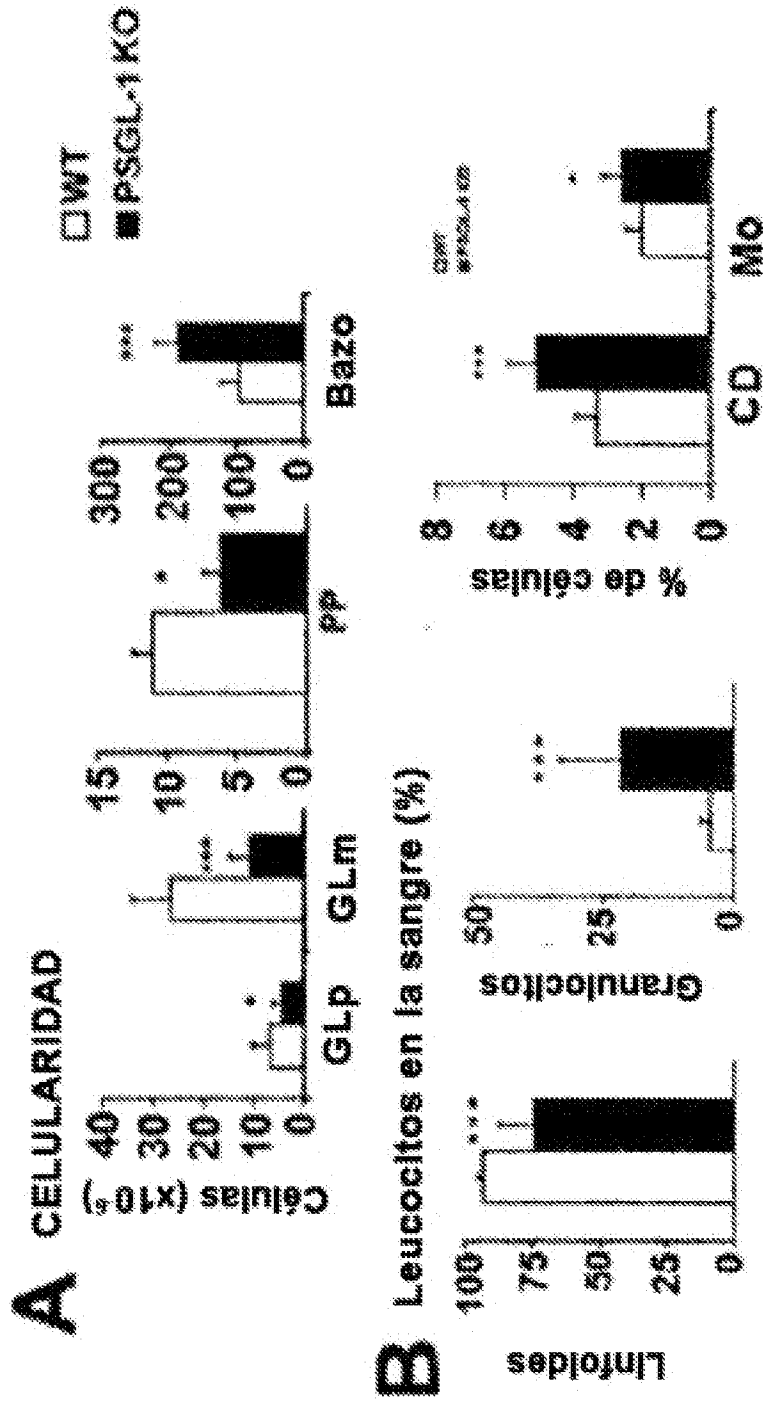


FIGURA 1

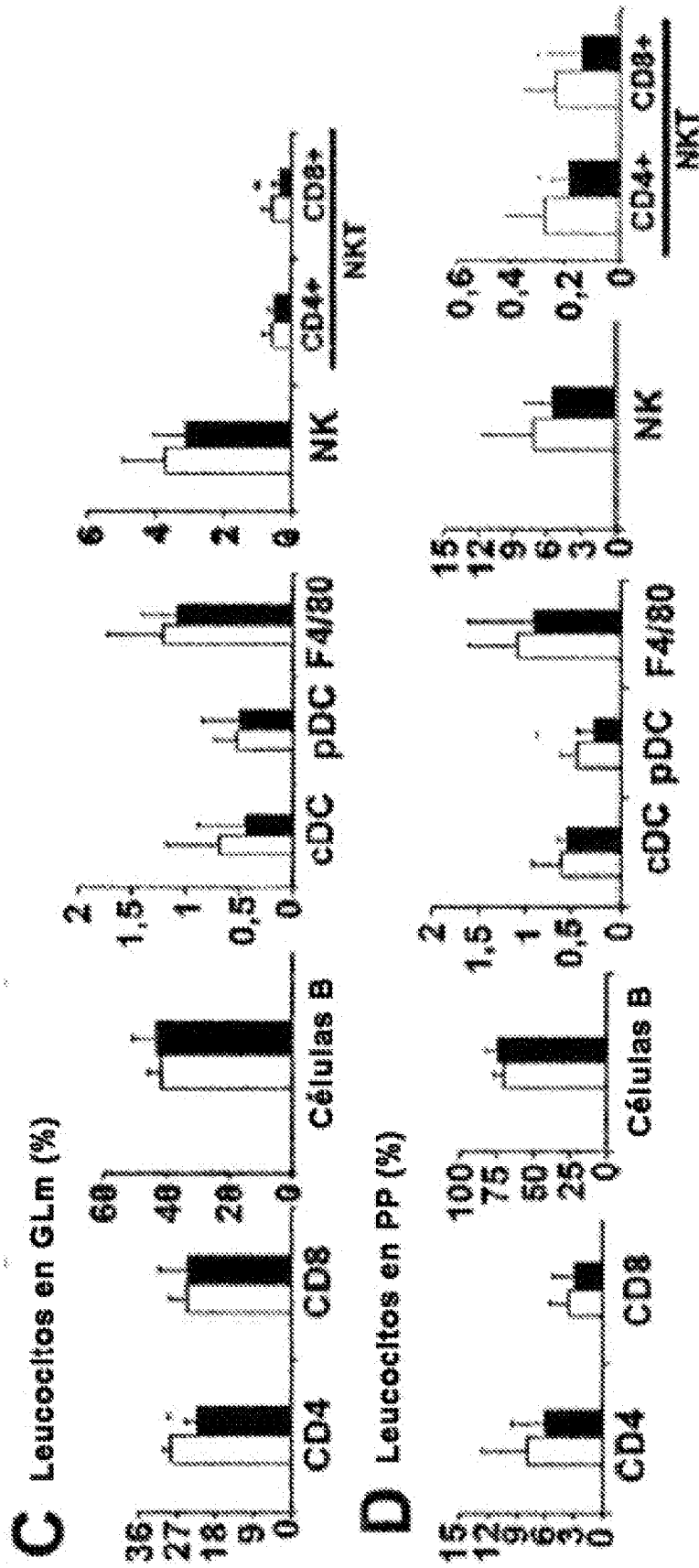


FIGURA I (cont.)

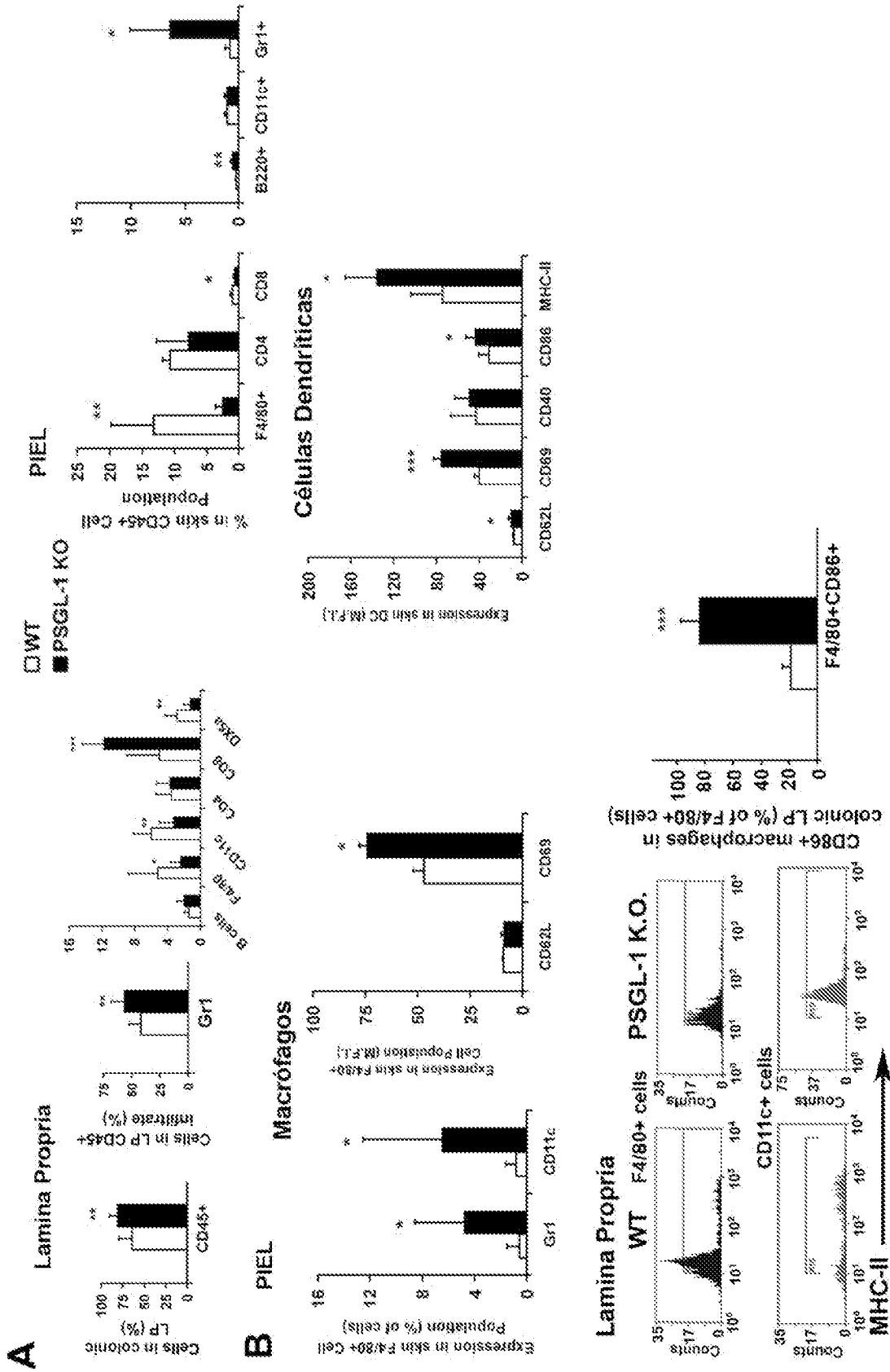


FIGURA 2

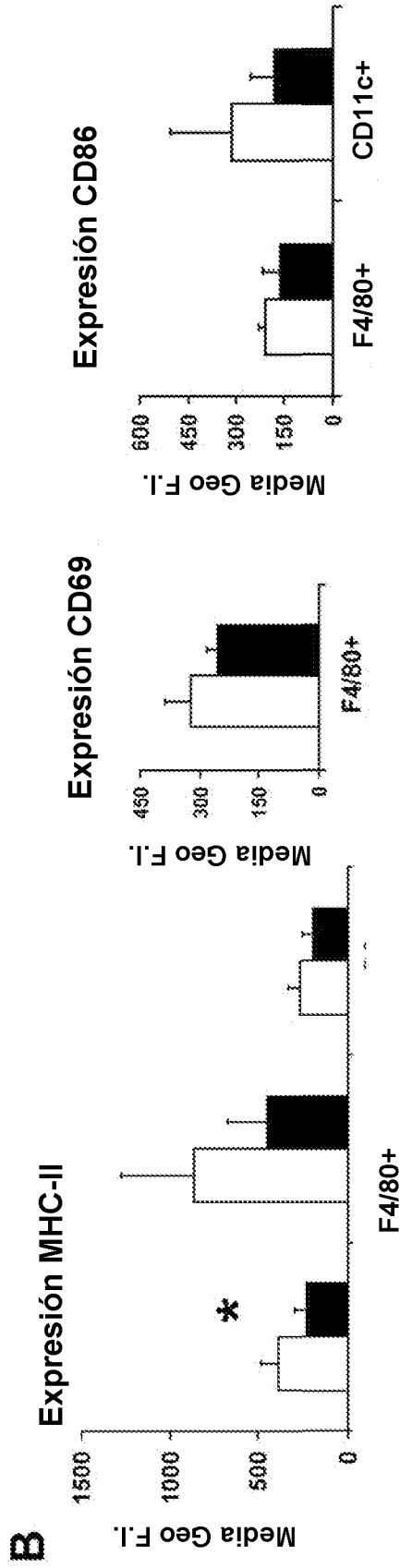
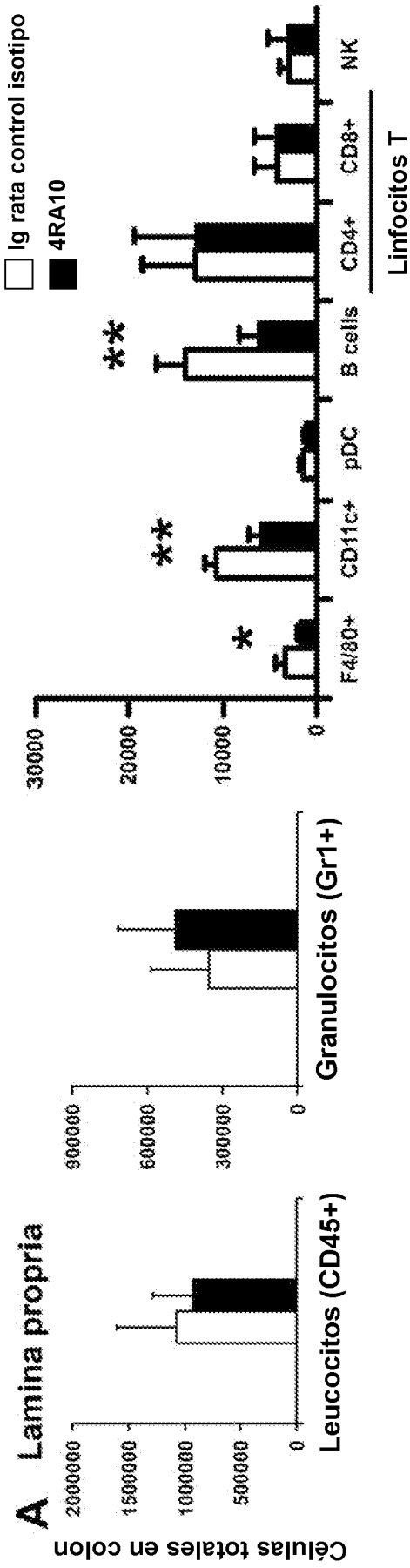


FIGURA 3

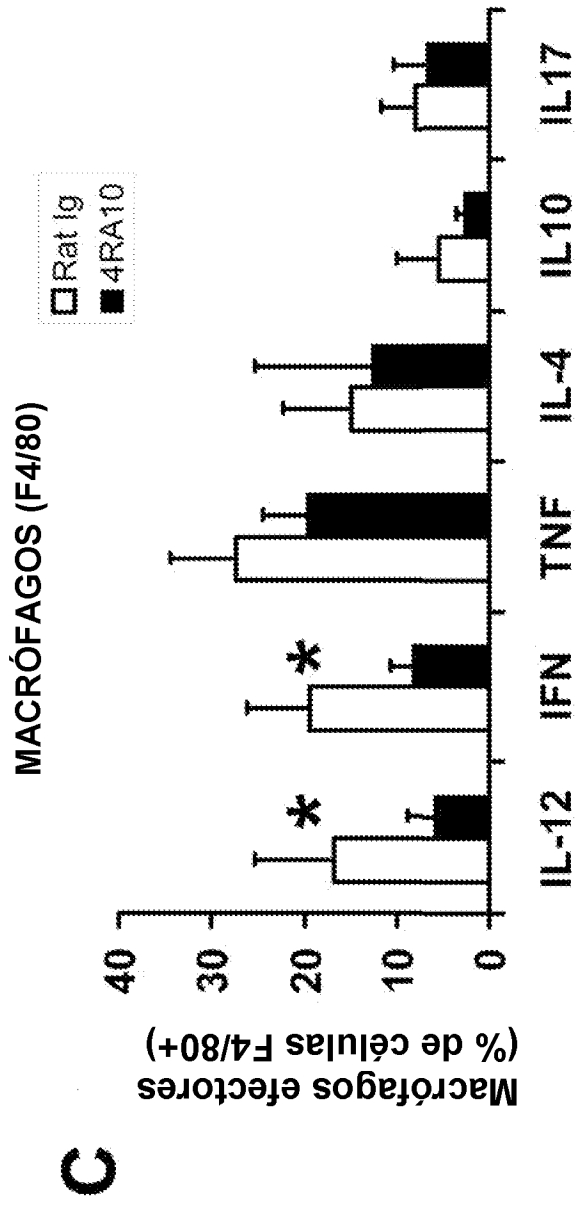


FIGURA 3 (Cont.)

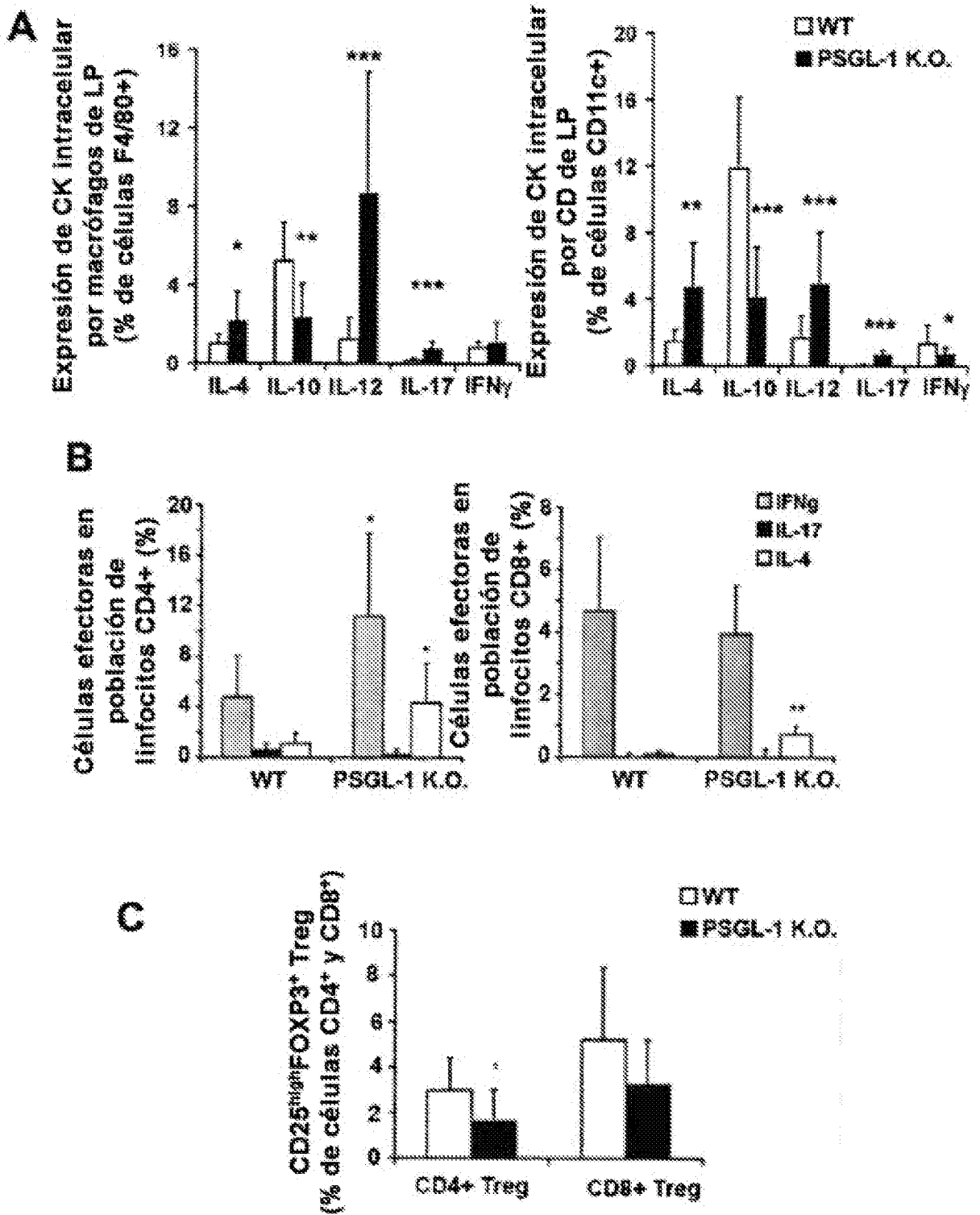


FIGURA 4

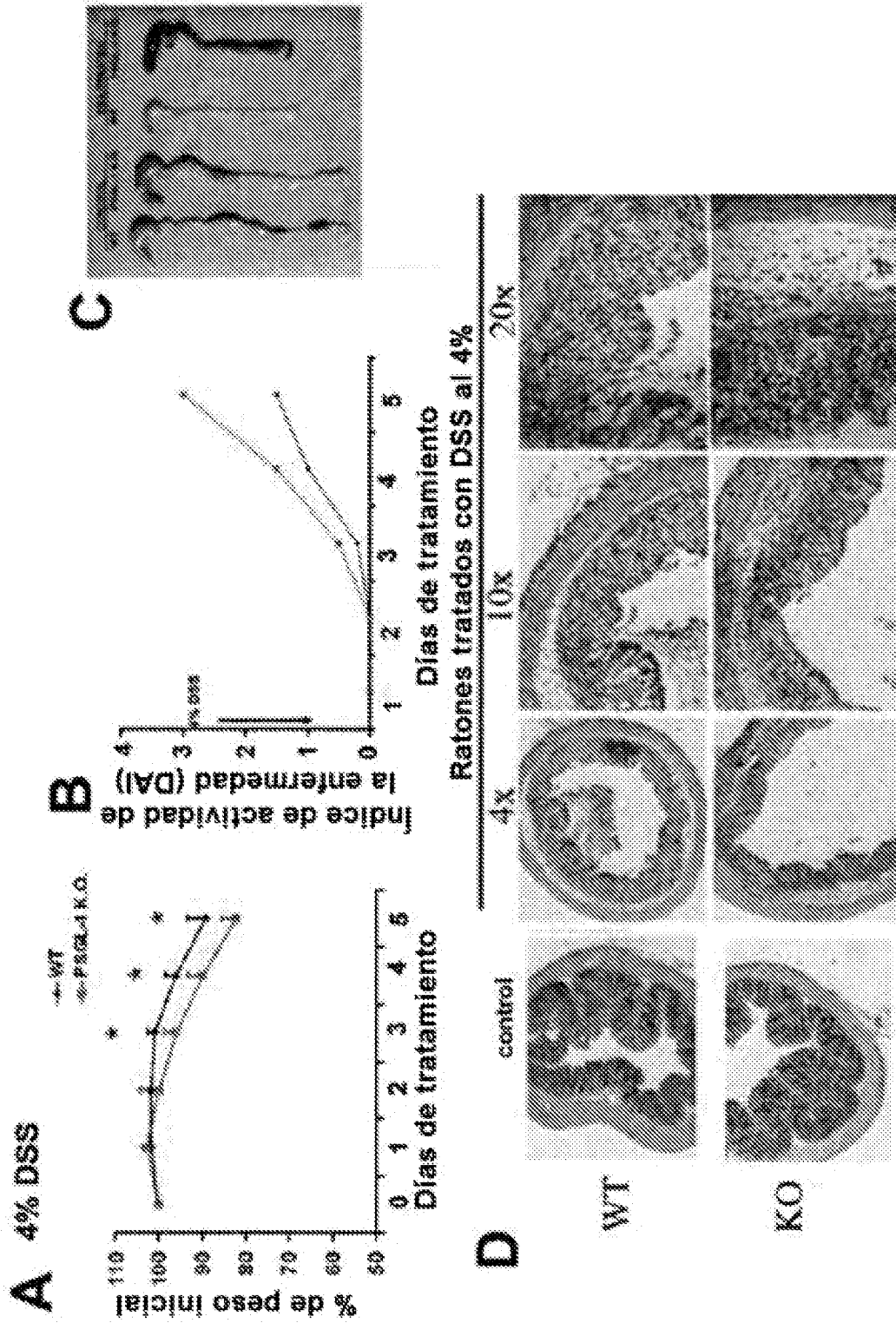


FIGURA 5

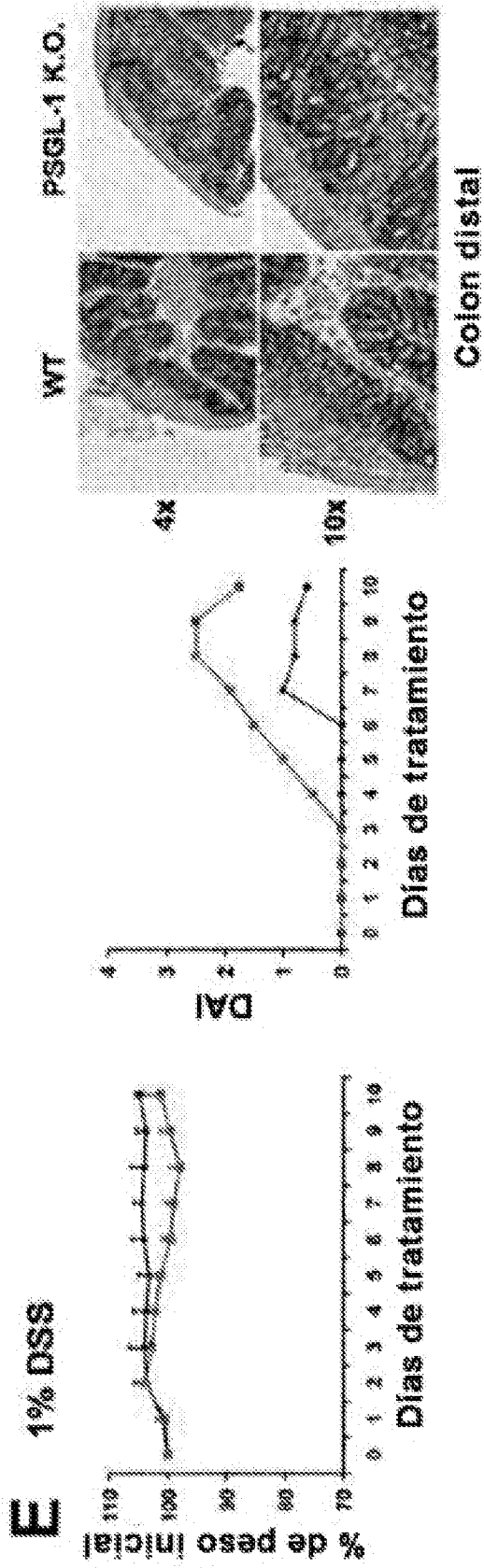


FIGURA 5 (Cont.)

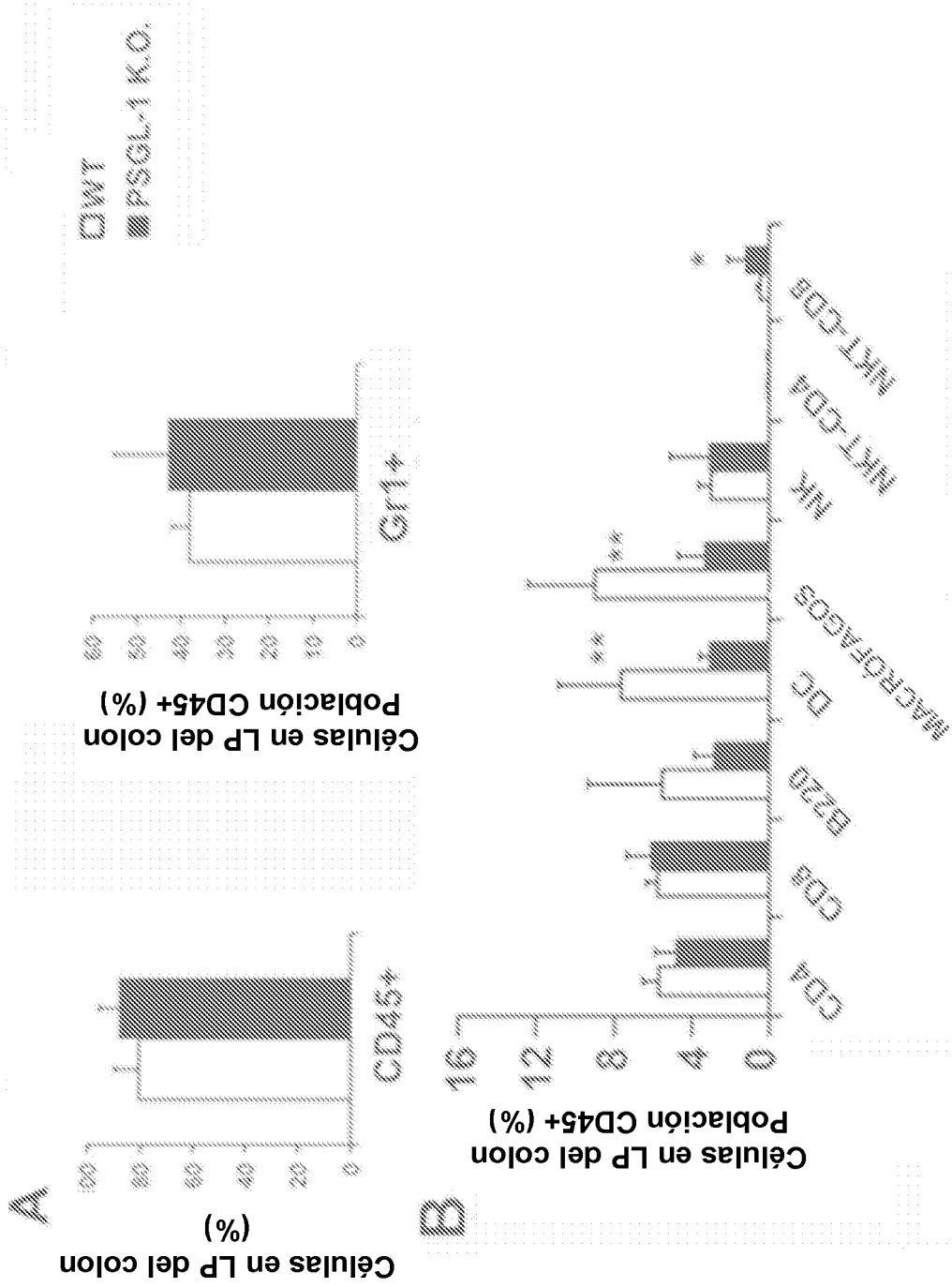


FIGURA 6

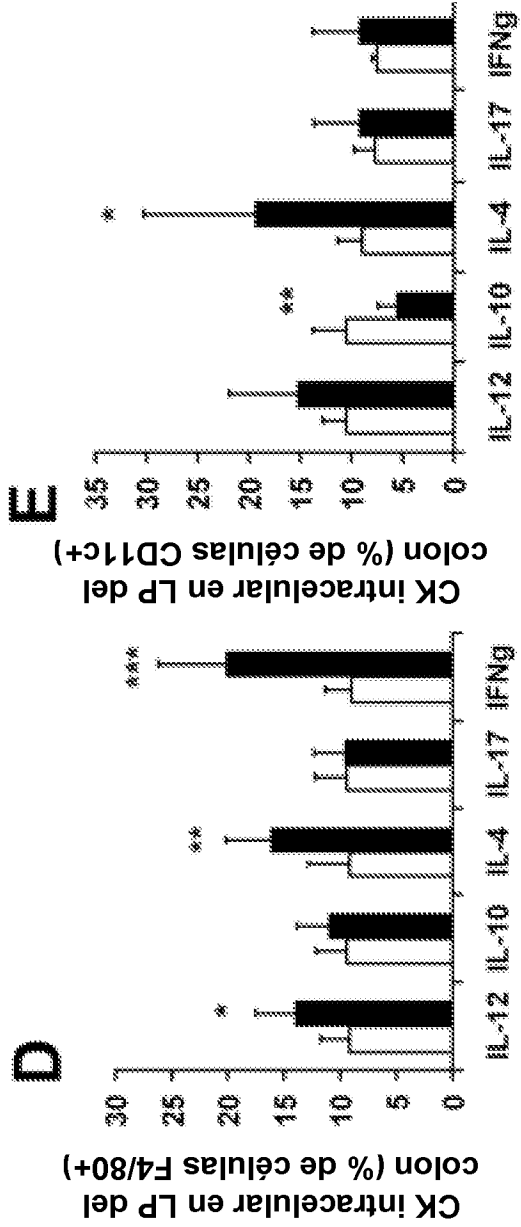
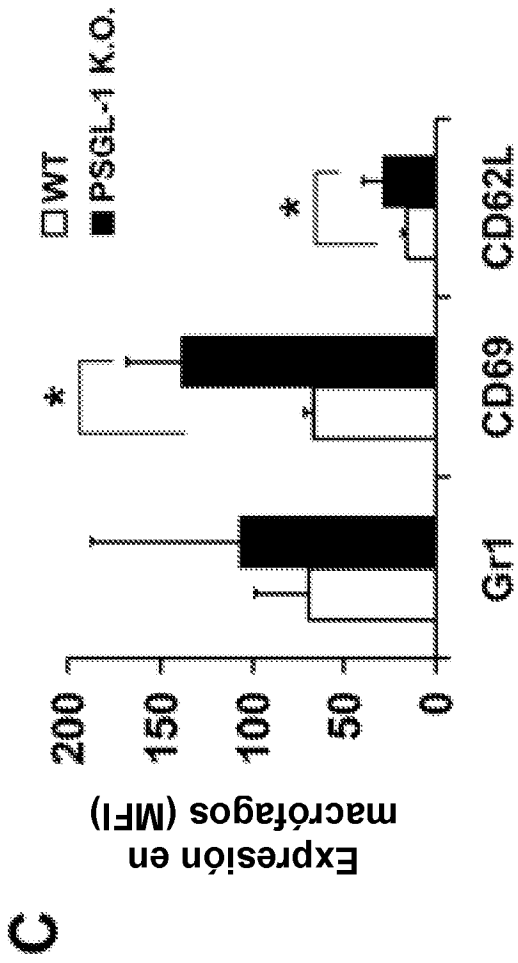


FIGURA 6 (Cont.)

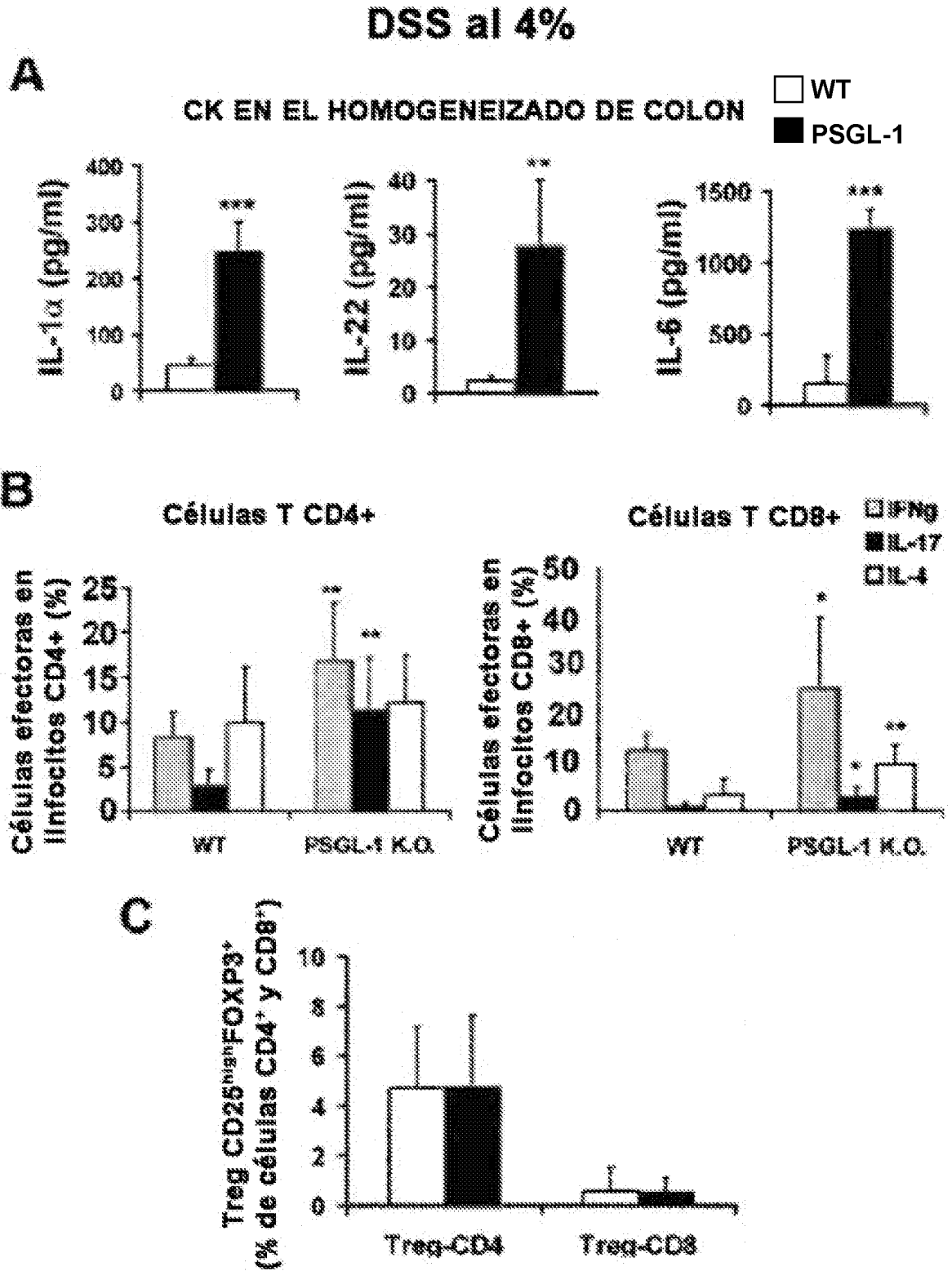


FIGURA 7

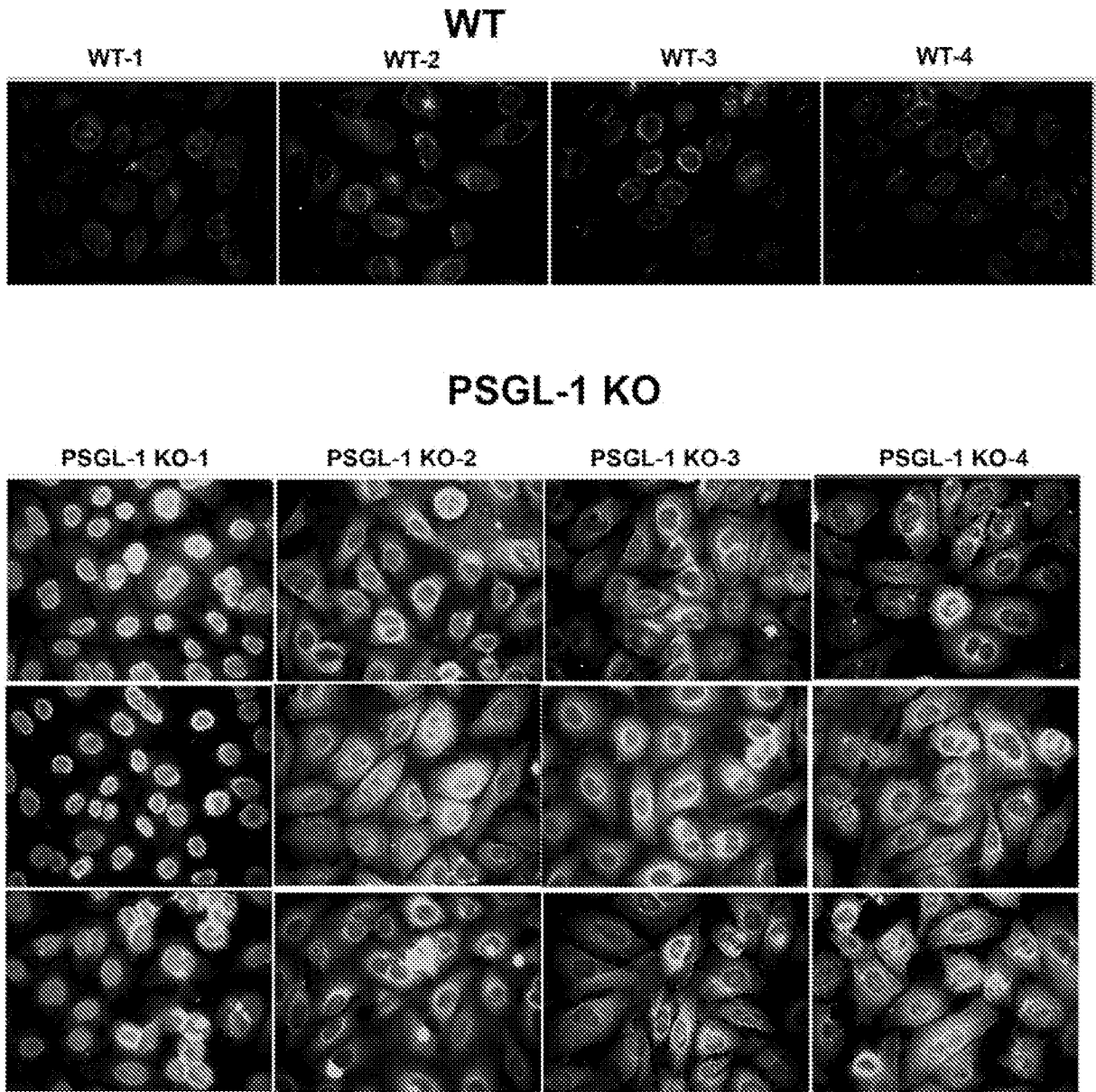


FIGURA 8

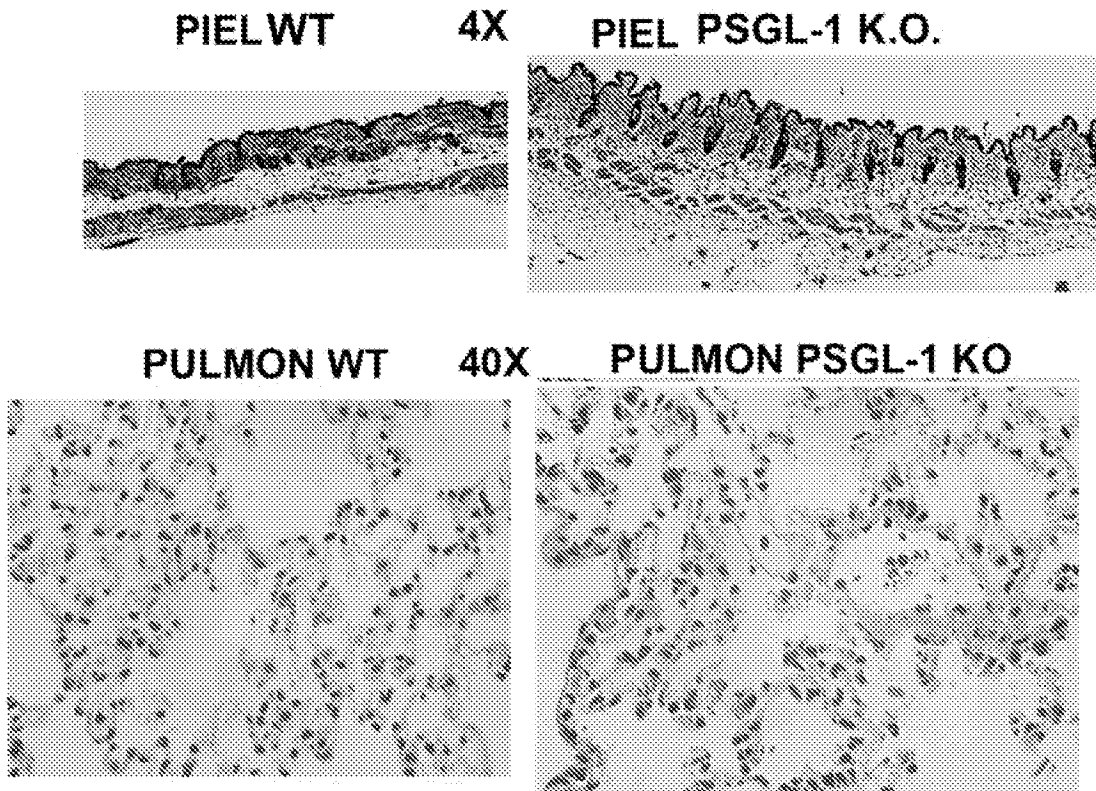


FIGURA 9



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031782

②② Fecha de presentación de la solicitud: 01.12.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C07K16/28** (2006.01)
A61K39/39 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2005110475 A2 (ABGENOMICS CORPORATION) 24.11.2005, todo el documento. Citado en la solicitud	1-4
X	WO 03013603 A1 (ABGENOMICS CORPORATION) 22.02.2003, todo el documento.	1-4
A	MATSUMOTO M. ET AL., "P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Negatively Regulates T-Cell Immune Responses", The Journal of Immunology, (2009), 183: 7204-7211, todo el documento. Citado en la solicitud.	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
02.08.2012

Examinador
M. Hernandez Cuellar

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 02.08.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 2-4	SI
	Reivindicaciones 1	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-4	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2005110475 A2 (ABGENOMICS CORPORATION)	24.11.2005
D02	WO 03013603 A1 (ABGENOMICS CORPORATION)	22.02.2003

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención se refiere al uso de un agente activador de PSGL-1 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad seleccionada entre una enfermedad inflamatoria y una enfermedad autoinmune, en donde dicho activador de PSGL-1 es un anticuerpo anti-PSGL-1.

1.- NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

Los documentos D01 y D02 describen anticuerpos agonista anti-PSGL-1 que al unirse a PSGL-1 inducen una ruta de señales de transducción que provocan la muerte de las células T y reducen la respuesta inmune mediadas por estas células. Estos anticuerpos son por tanto útiles para tratar enfermedades inflamatorias, autoinmunes y alérgicas.

En opinión de esta Oficina los anticuerpos y su uso descritos en D01 y D02 anticipan la novedad y la actividad inventiva de la reivindicación 1 que no cumple los requisitos del los Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986 respectivamente. Por su parte, esta Oficina considera que las reivindicaciones 2-4 son nuevas y cumplen el requisito del Art. 6.1 LP 11/1986.

En cuanto a la actividad inventiva de las reivindicaciones 2-4, a la vista de la información aportada en D01 y D02, resultaría obvio para el experto en la materia el extender el uso del anticuerpo activador de PSGL-1 a diferentes enfermedades inflamatorias y autoinmunes en las que como tales, existe una excesiva respuesta inmune mediada por células T. En consecuencia, esta Oficina considera que las reivindicaciones 2-4 no cumplen el requisito de actividad inventiva establecido en el Art. 8.1 LP 11/1986.