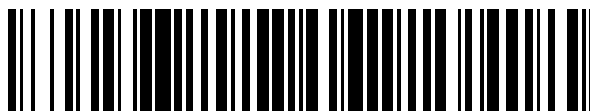


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 448 468**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2005 E 05747985 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 1765396**

54 Título: **Anticuerpos anti-PSGL-1**

30 Prioridad:

10.05.2004 US 569892 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.03.2014

73 Titular/es:

**ABGENOMICS COÖPERATIEF U.A. (100.0%)
STRAWINSKYLAAN 3111
1077 ZX AMSTERDAM, NL**

72 Inventor/es:

**LIN, RONG-HWA;
CHANG, CHUNG NAN;
CHEN, PEI-JIUN y
HUANG, CHIU-CHEN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 448 468 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

Anticuerpos anti-PSGL-1

5 ANTECEDENTES

10 Células T excesivamente agresivas conducen a menudo a respuestas inmunes indeseadas, las cuales, a su vez, provocan diversos trastornos, p.ej., enfermedades autoinmunes, rechazos de trasplantes, enfermedades alérgicas y cánceres derivados de células T. Por lo tanto, el control de las células T agresivas es crítico para tratar este tipo de trastornos. La actividad de estas células puede ser contenida mediante inmunosupresión o mediante inducción de la tolerancia inmunológica. Una solución alternativa es la inducción de la apoptosis, que se piensa que está implicada en la eliminación de células indeseadas, incluidas células T excesivamente agresivas. Véase, p. ej., Kabelitz et al. (1993) *Immunol Today* 14, 338-340; y Raff (1992) *Nature* 356, 397-399.

15 El documento US2003049252 describe que compuestos que se unen a P-selectina glicoproteína ligando-1 (PSGL-1 – siglas en inglés) sobre la superficie de células T o células asesinas naturales (NK – siglas en inglés) se pueden utilizar para inducir el agotamiento de células T o células NK y/o para inducir la apoptosis de células T o células NK. Moore KL et al. *J Cell Biol*, febrero de 1995 ; 128(4) :661-71 describe que P-selectina glicoproteína ligando-1 media en la rodadura de neutrófilos humanos sobre P-selectina. Li F et al, *J Biol Chem*, marzo de 1996 15; 20 271(11) :6342-8 describe la visualización de P-selectina glicoproteína ligando-1 como una molécula ampliamente extendida y la representación en mapa de epítomos de la proteína para anticuerpos monoclonales. Yanmg J et al, *Thromb Haemost*, enero de 1999; 81(1):1-7 describe la biología de P-selectina glicoproteína ligando-1: su papel como un contrarreceptor de selectina en interacciones leucocitos-endotelio y leucocitos-plaquetas.

25 SUMARIO

Esta invención se refiere a anticuerpos y sus derivados que inducen la apoptosis tras la unión a P-selectina glicoproteína ligando-1 (PSGL-1) sobre células T activadas.

30 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a P-selectina glicoproteína ligando-1 humano sin interferir en la unión entre P-selectina glicoproteína ligando-1 y P-selectina, en donde el anticuerpo, tras la unión a P-selectina glicoproteína ligando-1 sobre una célula T activada induce la muerte de la célula T activada, y en donde el anticuerpo comprende una primera cadena de inmunoglobulina, que es una cadena ligera, que contiene SEQ ID NOs: 1-3, y una segunda cadena, que es una cadena pesada, que contiene 35 SEQ ID NOs: 4-6.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a P-selectina glicoproteína ligando-1 humano sin interferir en la unión entre P-selectina glicoproteína ligando-1 y P-selectina, en donde el anticuerpo, tras la unión a P-selectina glicoproteína ligando-1 sobre una célula T activada induce la 40 muerte de la célula T activada, y en donde el anticuerpo se une específicamente a los residuos aminoácidos 115-126 de P-selectina glicoproteína ligando-1 humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo cualquiera de la invención en la fabricación de un medicamento para modular una respuesta inmune mediada por células T en un 45 sujeto que tiene o que está en riesgo de tener una afección relacionada con una respuesta inmune excesiva mediada por células, en donde la afección es una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, una enfermedad alérgica o un cáncer de células T.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo cualquiera de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir un rechazo de trasplante alogeneico o 50 xenogeneico.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención.

55 En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para uso en modular una respuesta inmune mediada por células T en un sujeto que tiene o que está en riesgo de tener una afección relacionada con una respuesta inmune excesiva mediada por células, en donde la afección es una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, una enfermedad alérgica o un cáncer de células T.

60

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para uso en el tratamiento o prevención de un rechazo de trasplante alogeneico o xenogeneico.

5 En un aspecto, la descripción recoge una cadena de inmunoglobulina que tiene tres secuencias que (i) contienen, respectivamente, RSSQSIVHNDGNTYFE, KVSNRFS y FQGSYVPLT (SEQ ID Nos. 1-3); (ii) contienen, respectivamente, SFGMH, YINGGSSTIFYANAVKG y YASYGGGAMDY (SEQ ID NOS: 4-6); (iii) contienen, respectivamente, RASSTVNSTYLH, GSSNLAS y QQYSGYPLT (SEQ ID NOS: 7-9); (iv) contienen, respectivamente, AYYIH, VNPNTGGTSYNPKFKG y SGSPYYRYDD (SEQ ID NOS: 10-12); (v) contienen, respectivamente, RSSQSIVNSNGNTYLE, KVSNRFS y FQGSHPVWT (SEQ ID NOS: 13-15); o (vi) contienen, respectivamente, TNAMNWVRQAPGKLE, TYYADSVKD y GGSYWYFDV (SEQ ID NOS: 16-18).

15 Cada uno de los seis conjuntos de secuencias recién descritos corresponde a las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDRs – siglas en inglés) de cadena ligera o pesada de un anticuerpo que se une a PSGL-1, tales como las de los tres anticuerpos 15A7, 43B6 y 9F9 descritos en los ejemplos que figuran más adelante. En lo que sigue se muestran las regiones variables (V) de cadena ligera y cadena pesada de estos tres anticuerpos (SEQ ID NOS: 19-26, las CDRs están subrayadas y destacadas):

SEQ ID NO: 19 (región V de la cadena ligera de 15A7 de ratón):

```

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

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

121 TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAATGATGGAAACACCTATTTTGAATGGTAC
41 S C RSSQSIVHNDGNTYFE W Y

181 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAACCTCTGATCTACAAAGTTTCCAATCGATTTTCT
61 L Q K P G Q S P K L L I Y QVSNRFS

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

301 AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTTCATATGTTGCTCTC
101 R V E A E D L G I Y Y C QVSNRFS

361 ACGTTCGGTGTCTGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
121 QVSNRFS F G A G T K L E L K
    
```

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

1 ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCTTGTCCTTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAT
 1 M D S R L N L V F L V L I L K G V Q C D
 61 GTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCGGAAACTCTCC
 21 V Q L V E S G G G L V Q P G G S R K L S
 121 GTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTTTCGTCAGGCTCCA
 41 C A A S G F T F S ~~S F G M H~~ W V R Q A P
 181 GAGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGATACATTAATGGTGGCAGTAGTACCATCTTCTATGCA
 61 E K G L E W V A ~~V P L N G G S S T L F S W A~~
 241 AACGCAGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAATCCCAAGAATACCTGTTCCTG
 81 ~~N A V K K G~~ R F T I S R D N P K N T L F L
 301 CAAATGACCATTCTAAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGGAAGGTATGCTAGT
 101 Q M T I L R S E D T A I Y Y C G R ~~V P A M S~~
 361 TACGGAGGGGGTGCTATGGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
 121 ~~V P G G C A M D Y~~ W G Q G T S V T V S S

SEQ ID NO: 21 (región V de la cadena ligera de 43B6 de ratón):

1 ATGGATTTTCTGGTGCAGATTTTCAGCTTCTTGCTAATCAGTGCCTCAGTTGCAATGTCC
 1 M D F L V Q I F S F L L I S A S V A M S
 61 AGAGGAGAAAATGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAAAAG
 21 R G E N V L T Q S P A I M S A S P G E K
 121 GTCACCATGACCTGCAGGGCCAGCTCAACTGTAAATTCACCTTACTTGCACTGGTTCCAG
 41 V T M T C ~~R A S S S T L V N S T Y L H~~ W F Q
 181 CAGAAGTCAGGTGCCTCCCCAAACTCTGGATTTATGGCTCATCCAATTGGCTTCTGGA
 61 Q K S G A S P K L W I Y ~~G R S S S N L L A S~~ G
 241 GTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTACTCTCTCACAAATCAGCAGT
 81 V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S
 301 GTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTACAGTGGTTACCCACTCACC
 101 V E A E D A A T Y Y C ~~O P O Y S S G Y P L L T~~
 361 TTCGGTGCTGGGACCACGCTGGAGCTGAAA
 121 F G A G T T L E L K

5

SEQ ID NO: 22 (región V de la cadena pesada de 43B6 de ratón):

1 ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCCCTCCTGTCAGTCACTACAGGTGTCCACTCTGAG
 1 M E W S W V F L F L L S V T T G V H S E
 61 GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTTAGTGAAGATATCC
 21 V Q L Q Q S G P D L V K P G A L V K I S
 121 TGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGCCTACTACATTCACTGGGTGAAGCAGAGCCAT
 41 C K A S G Y S F T ~~A A V V Y T I H~~ W V K Q S H
 181 GGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTGTTAATCCTAATACTGGTGGTACTAGCTACAAC
 61 G K S L E W I G R ~~V A N P P E N A T A G G I G T S H V A N~~
 241 CCGAAGTTCAAGGGCAAGGCCATATTAATGTAGATAAGTCATCCAGCACAGCCTACATG
 81 ~~R K T E K G~~ K A I L N V D K S S S T A Y M
 301 GAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGGGATCC
 101 E L R S L T S E D S A V Y Y C A R ~~S A G S~~
 361 CCCTACTATAGGTACGACGACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
 121 ~~P Y Y R Y D D~~ W G Q G T T L T V S S

SEQ ID NO: 23 (región V de la cadena ligera de 9F9 de ratón):

1 ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGCTTCCAGCAGTGAT
 1 M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D
 61 GTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATC
 21 V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I
 121 TCTTGAGATCTAGTCAGAGCATTGTAATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTAC
 41 S C ~~R S S O S I V N S N G C N T Y D E~~ W Y
 181 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCT
 61 L Q K P G Q S P K L L I Y ~~K V S N R F S~~
 241 GGGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCACACTCAAGATCAGC
 81 G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S
 301 AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTGG
 101 R V E A E D L G V Y Y C ~~R Q C S H V P W~~
 361 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
 121 ~~I~~ F G G G T K L E I K

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

```

1  ATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTTCTTTGTTGTTTTTATCAAGGTGTGCATTGTGAG
1  M L L G L K W V F F V V F Y Q G V H C E
61  GTGCAGCTTGTGAGACTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGGTCATTGAAACTCTCA
21  V Q L V E T G G G L V Q P K G S L K L S
121 TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCAATACCAATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCA
41  C A A S G F T F N Q V N E A M E N W N A R Q C A A R
181 GGAAAGGGTTTGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAACATAT
61  G A K A G L L E W V A R I R S K S N N Y A D A M Y
241 TATGCCGATTCAGTGAAGACAGGTTCCACCATCTCCAGAGATGATACACAAAGCATGATC
81  Y A A R D N E S E V Z K E D R F T I S R D D T Q S M I
301 TATCTGCAAATGAACAACCTTGAAAACCTGAGGACACAGGCATGTATTACTGTGTGAGAGGG
101 Y L Q M N N L K T E D T G M Y Y C V R E
361 GGAAGCTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
121 G A S Y A W F Y A T A D A V W G A G T T V T V S S

```

Dado que la especificidad de unión a antígeno de un anticuerpo viene determinada por sus CDRs de cadenas ligera y pesada, las CDRs anteriores se pueden utilizar para generar derivados de anticuerpos que conserven la especificidad de unión al antígeno. Ejemplos de derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y sus equivalentes funcionales. Se muestran a continuación la región V de la cadena ligera (SEQ ID NO: 25) y la región V de la cadena pesada (SEQ ID NO: 26) de un anticuerpo 15A7 humanizado, que incluye las SEQ ID NOs: 1-3 y las SEQ ID NOs: 4-6, respectivamente:

5 10 SEQ ID NO: 25 (región V de la cadena ligera de 15A7 humanizado):

```

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRSSGSIWINDGNLYFEWYQOKPGKAPKLLIYKVSNTESGVPSRFSGSG
SGTHFTLTISSLPEDFATYYCROGSYVPLIFGQGTKVEIK

```

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

```

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRGMHWVRQAPGKGLEWVAITNGGSSITLYANAVKGRFTIS
RDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVASYCGGAMDYWGQGTLVTVSS

```

20 La descripción también recoge un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia que codifica una de las cadenas de inmunoglobulina arriba descritas. El término "anticuerpo" o la expresión "cadena de inmunoglobulina" se refiere a un polipéptido aislado, es decir, un polipéptido que ha sido sustancialmente separado de otras proteínas, lípidos y ácidos nucleicos con los que está asociado de forma natural. El polipéptido puede constituir al menos el 50, 70 ó 95% en peso seco de la preparación purificada. Un "ácido nucleico aislado" se refiere a un ácido nucleico, cuya estructura no es idéntica a la de cualquier ácido nucleico que se produzca de forma natural o a la de cualquier fragmento de un ácido nucleico genómico que se produzca de forma natural. Por lo tanto, la expresión cubre, por ejemplo, (a) un ADN que tiene la secuencia de parte de una molécula de ADN genómico que se produce de forma natural, pero que no está flanqueada por las dos secuencias codificadoras que flanquean esa parte de la molécula en el genoma del organismo en el que se produce de forma natural; (b) un ácido nucleico incorporado en un vector o en el ADN genómico de un procarionte o eucariote de una manera tal que la molécula resultante no es idéntica a cualquier vector a ADN genómico que se produce de forma natural; (c) una molécula separada tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido por reacción en cadena de la polimerasa (PCR – siglas en inglés), o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia de nucleótidos recombinantes que es parte de un gen

híbrido, es decir, un gen que codifica una proteína de fusión. El ácido nucleico de esta descripción se puede utilizar para expresar un polipéptido de esta descripción. Para este fin, se puede enlazar operativamente el ácido nucleico a secuencias reguladoras adecuadas para generar un vector de expresión.

5 Un vector se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está enlazado, y también capaz de replicación autónoma o integración en un ADN hospedante. Ejemplos incluyen un plásmido, cósmido y un vector viral. Un vector de esta descripción incluye un ácido nucleico en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula hospedante. Preferiblemente, el vector incluye una o más secuencias reguladoras operativamente enlazadas a la secuencia del ácido nucleico a expresar. Ejemplos de
10 una secuencia reguladora incluyen promotores, reforzadores y otros elementos para el control de la expresión (p. ej., señales de poliadenilación). Secuencias reguladoras también incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos, así como secuencias reguladoras específicas para el tejido y/o inducibles. El diseño de un vector de expresión de este tipo se basa en consideraciones que incluyen la elección de la célula hospedante para transformar y del nivel de expresión deseado. Un vector de expresión se puede introducir en células hospedantes para producir un polipéptido de esta descripción. La descripción también incluye una célula hospedante que contiene el ácido nucleico arriba descrito. Una célula hospedante se refiere a una célula que contiene una secuencia codificadora o una secuencia no codificadora exógena. Una secuencia exógena se puede introducir en una célula mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano o electroporación. Células hospedantes adecuadas incluyen células bacterianas (p. ej., *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhimurium*), células de levaduras (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*), células vegetales (p. ej., *Nicotiana tabacum* y *Gossypium hirsutum*) y células de mamíferos (p. ej., células de hibridoma murinas, células CHO y fibroblastos 3T3).

Para producir una cadena de inmunoglobulina de esta descripción, se puede disponer una célula hospedante en un cultivo bajo condiciones que permitan la expresión de un polipéptido codificado por un ácido nucleico arriba descrito y aislar el polipéptido a partir del cultivo. Alternativamente, un ácido nucleico de esta descripción se puede transcribir y traducir in vitro, por ejemplo utilizando secuencias reguladoras del promotor T7 y T7 polimerasa.

Un anticuerpo se encuentra dentro del alcance de esta invención. Éste se forma mediante una primera cadena de inmunoglobulina y una segunda cadena de inmunoglobulina que contienen, respectivamente, las CDRs de la cadena ligera y las CDRs de la cadena pesada del anticuerpo 15A7, 43B6 o 9F9 de ratón arriba mencionado. Preferiblemente, este anticuerpo se forma mediante las cadenas ligera y pesada de 15A7.

También dentro del alcance de esta descripción se encuentra otro anticuerpo que (i) se une específicamente a P-selectina glicoproteína ligando-1 sin interferir en la unión entre P-selectina glicoproteína ligando-1 y P-selectina, y (ii) tras la unión a P-selectina glicoproteína ligando-1 sobre una célula T activada, induce la muerte de la célula T. En una realización, este anticuerpo se une específicamente a P-selectina glicoproteína ligando-1.

Además, dentro del alcance de esta invención se encuentra otro anticuerpo que se une específicamente a los residuos aminoácidos 115-126 de P-selectina glicoproteína ligando-1 humano maduro. Preferiblemente, el anticuerpo se une específicamente a los residuos aminoácidos 117-123. Más preferiblemente, se une específicamente a los residuos aminoácidos 119-121, una secuencia consenso entre todos los epítomos sometidos a ensayo. De hecho, la mutación de uno o más de estos tres residuos aminoácidos anula la unión del anticuerpo. En un ejemplo, este anticuerpo, tras la unión a P-selectina glicoproteína ligando-1 sobre una célula T activada,
45 induce la muerte de la célula T.

En una realización, uno de los dos anticuerpos mencionados inmediatamente arriba se forma mediante una cadena ligera y una cadena pesada que contienen, respectivamente, SEQ ID NOs: 1-3 y SEQ ID NOs: 4-6 (p. ej., SEQ ID NOs: 19 y 20, o SEQ ID NOs: 25 y 26).

En un aspecto adicional, la invención recoge un método para inducir la muerte de una célula T activada. El método incluye poner en contacto uno de los tres anticuerpos arriba descritos con una célula T activada, en que la unión del anticuerpo a la célula T activada induce la muerte de la célula.

La descripción recoge también un método para modular una respuesta inmune, mediada por células T, en un sujeto. El método incluye (1) identificar un sujeto que tenga o que esté en riesgo de tener una afección relacionada con una respuesta inmune excesiva mediada por células T, y (2) administrar al sujeto una cantidad eficaz de uno de los tres anticuerpos arriba descritos. Una "respuesta inmune excesiva mediada por células T" se refiere a una respuesta provocada por un nivel excesivo de células T activadas. Un nivel excesivo se refiere a (1) un nivel mayor que un nivel normal, y (2) un nivel mayor que el deseado en un individuo, incluso a pesar de que no sea mayor que

un nivel normal. Ejemplos de la afección incluyen una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, una enfermedad alérgica, o un cáncer de células T, así como una situación en la que un sujeto ha recibido o se contempla que reciba un trasplante alogeneico o xenogeneico.

- 5 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se recogen en la descripción que se acompaña a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

10 Esta invención se basa, al menos en parte, en un descubrimiento inesperado de que células T activadas pueden ser inducidas a sufrir una apoptosis y pueden ser agotadas mediante la unión de anticuerpos o sus derivados a PSGL-1 sobre las células activadas. Los anticuerpos y derivados son útiles para tratar afecciones asociadas con una respuesta inmune excesiva o indeseada mediada por células T o una proliferación de células T.

15 Por consiguiente, la invención recoge polipéptidos que contienen CDRs de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina de anticuerpos anti-PSGL-1, así como ácidos nucleicos que los codifican. Tanto las cadenas de inmunoglobulina como los ácidos nucleicos se pueden utilizar para producir los anticuerpos y derivados arriba mencionados.

20 Una cadena de inmunoglobulina de la invención se puede obtener como un polipéptido sintético o polipéptido recombinante. Para preparar un polipéptido recombinante, un ácido nucleico que lo codifica puede ser enlazado a otro ácido nucleico que codifica un participante en la fusión, p. ej. glutatión-S-transferasa (GST – siglas en inglés), 6x etiqueta de epítipo His, proteína gen 3 de M13, o una región constante la cadena pesada de inmunoglobulina. El ácido nucleico de fusión resultante se puede introducir en una célula para la expresión de proteínas. La proteína de fusión puede aislarse a partir de la célula hospedante por métodos bien conocidos en la técnica. La proteína de fusión aislada puede ser tratada adicionalmente, p. ej., mediante digestión enzimática para separar el participante en la fusión y obtener el polipéptido recombinante de interés. Alternativamente, se puede obtener una cadena de inmunoglobulina a partir de una célula hospedante adecuada, activando la expresión endógena de un ácido nucleico que codifica la cadena.

25 La composición de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina de la invención puede variar sin interrumpir la capacidad de formar un anticuerpo capaz de unirse a PSGL-1. Por ejemplo, una variante de este tipo puede contener una o más sustituciones de aminoácidos conservativas. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el residuo aminoácido es reemplazado por un residuo aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Familias de residuos aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales de carácter básico (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales de carácter ácido (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej. glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, un residuo aminoácido no esencial predicho en un polipéptido es preferiblemente reemplazado por otro residuo aminoácido de la misma familia de las cadenas laterales. Alternativamente, se pueden introducir mutaciones al azar a lo largo de la totalidad o parte de un polipéptido de esta invención, tal como mediante mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes se pueden rastrear en cuanto a la capacidad de formar un anticuerpo capaz de unirse a PSGL-1 para identificar variantes de esta invención según se describe más adelante en los ejemplos.

30 Las cadenas y variantes de inmunoglobulina arriba descritas pueden utilizarse para producir un anticuerpo de esta invención o sus derivados. Un "anticuerpo" incluye moléculas intactas así como fragmentos de las mismas tales como Fab, F(ab')₂, Fv, scFv (anticuerpo de cadena sencilla), y dAb (anticuerpo de dominio; Ward, et. al. (1989) Nature, 341, 544). Un derivado de un anticuerpo se refiere a una proteína o a un complejo de proteínas que tiene una variante de polipéptido de esta invención. Un anticuerpo o derivado de esta invención se puede producir co-expresando polipéptidos que contienen CDRs de las cadenas ligera y pesada correspondientes en una célula hospedante adecuada según se describe en los ejemplos que figuran más adelante. Alternativamente, se pueden producir por métodos conocidos en la técnica de preparar anticuerpos monoclonales y policlonales y fragmentos. Véase, p. ej., Harlow y Lane, (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York.

35 Para producir un anticuerpo de esta invención, PSGL-1 o su fragmento antigénico se puede acoplar a una proteína soporte tal como KLH, mezclar con un adyuvante o inyectar en un animal hospedante. Anticuerpos producidos en

ese animal pueden luego modificarse mediante cromatografía de afinidad de péptidos. Animales hospedantes comúnmente empleados incluyen conejos, ratones, cobayas y ratas. Se pueden utilizar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica dependiendo de la especie hospedante, e incluyen adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite, hemocianina de la lapa bocallave y dinitrofenol. Adyuvantes humanos útiles incluyen BCG (bacilos de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Anticuerpos policlonales, poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos, están presentes en los sueros de los sujetos inmunizados. Anticuerpos monoclonales, poblaciones homogéneas de anticuerpos contra un antígeno particular, se pueden preparar utilizando la tecnología del hibridoma estándar. Véase, p. ej., Kohler et al. (1975) *Nature* 256, 495; Kohler et al. (1976) *Eur. J. Immunol.* 6, 511; Kohler et al. (1976) *Eur. J. Immunol.* 6, 292; y Hammerling et al. (1981) *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier, N.Y. En particular, anticuerpos monoclonales se pueden obtener por cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos por parte de líneas celulares continuas en cultivo tal como se describe en la patente de EE.UU. N° 4.376.110; la técnica del hibridoma de células B humanas (Kosbor et al. (1983) *Immunol Today* 4, 72; Cole et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2026) y la técnica del hibridoma de EBV (Cole et al. (1983) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Anticuerpos de este tipo pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluidas IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce los anticuerpos monoclonales de la invención se puede cultivar *in vitro* o *in vivo*. La capacidad de producir elevados títulos de anticuerpos monoclonales *in vivo* le hace un método particularmente útil de producción.

Además, se pueden utilizar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos". Véase, p. ej., Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851; Neuberger et al. (1984) *Nature* 312, 604; y Takeda et al. (1984) *Nature* 314, 452. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes se derivan de diferentes especies animales tales como las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Alternativamente, técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patentes de EE.UU. N° 4.946.778 y 4.704.692) se pueden adaptar para producir un banco de fagos de anticuerpos Fv de cadena sencilla. Los anticuerpos de cadena sencilla se forman enlazando los fragmentos de las cadenas pesada y ligera de la región Fv a través de un puente aminoácido. Además de ello, se pueden generar fragmentos de anticuerpos por técnicas conocidas. Por ejemplo, fragmentos de este tipo incluyen, pero no se limitan a fragmentos F(ab')₂, los cuales se pueden producir mediante la digestión de pepsina de una molécula de anticuerpo y fragmentos Fab que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de fragmentos F(ab')₂. Los anticuerpos también pueden ser humanizados por métodos descritos en los ejemplos que figuran más adelante o conocidos en la técnica. Por ejemplo, anticuerpos monoclonales con una especificidad de unión deseada pueden ser humanizados comercialmente (Scotgene, Escocia; y Oxford Molecular, Palo Alto, Calif.). Anticuerpos totalmente humanizados tales como los expresados en animales transgénicos se encuentran dentro del alcance de la invención (véase, p. ej., Green et al. (1994) *Nature Genetics* 7, 13; y patentes de EE.UU. N°s 5.545.806 y 5.569.825).

También se encuentra dentro del alcance de esta descripción un método para inducir la muerte de células T activadas, p. ej. poniendo en contacto células T activadas con un anticuerpo de la invención *in vitro* y administrando a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz del anticuerpo. Sujetos a tratar se pueden identificar como que tienen o que están en riesgo de tener una afección relacionada con una respuesta inmune excesiva o indeseada mediada por células T, p. ej. pacientes que padecen enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplantes, enfermedades alérgicas o cánceres derivados de células T. Este método se puede realizar solo o en unión con otros fármacos o terapia.

El término "tratar" se refiere a la administración de una composición a un sujeto con el fin de curar, aliviar, remediar, prevenir o mejorar un trastorno, el síntoma del trastorno, el estado patológico secundario al trastorno o la predisposición al trastorno. Una "cantidad eficaz" es una cantidad de la composición que es capaz de producir un resultado médicamente deseable en un sujeto tratado.

Enfermedades ilustrativas a tratar incluyen diabetes mellitus, artritis (incluida artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis y artritis psoriática), esclerosis múltiple, encefalomiелitis, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmune, dermatitis (incluida dermatitis atópica y dermatitis eczematosa), psoriasis, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, diabetes de tipo I, enfermedades del intestino inflamatorio, colitis ulcerosa, asma, asma alérgica, lupus eritematoso cutáneo, escleroderma, vaginitis, proctitis, erupciones de fármacos, reacciones inversas leprosas, eritema nodoso leproso, uveítis autoinmune, encefalomiелitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, pérdida de audición sensorineural progresiva bilateral idiopática, anemia aplásica, anemia de glóbulos rojos pura, trombocitopenia

idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, síndrome de Stevens-Johnson, esteatorrea idiopática, liquen plano, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveitis posterior, fibrosis pulmonar intersticial, enfermedad de injerto frente a hospedante, casos de trasplante (incluido trasplante utilizando tejidos alogeneicos o xenogeneicos) tal como trasplante de la médula ósea, trasplante de hígado o el trasplante de cualquier órgano o tejido, alergias tales como alergia atópica, SIDA y neoplasmas de células T tales como leucemias o linfomas.

En una estrategia in vivo, se administra al sujeto una composición terapéutica (p. ej., una composición que contiene a un anticuerpo de la invención). Generalmente, el anticuerpo se suspende en un soporte farmacéuticamente aceptable (p. ej., solución salina fisiológica) y se administra por vía oral o mediante infusión intravenosa, o se inyecta o implanta por vía subcutánea, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intrarrectal, intravaginal, intranasal, intragástrica, intratraqueal o intrapulmonar.

La dosificación requerida depende de la elección de la vía de administración; de la naturaleza de la formulación; de la naturaleza de la enfermedad del sujeto; del tamaño, peso, superficie específica, edad y sexo del sujeto; otros fármacos que estén siendo administrados; y el juicio del médico que le atienda. Dosificaciones adecuadas se encuentran en el intervalo de 0,01-100,0 mg/kg. Son de esperar variaciones en la dosificación necesaria a la vista de la diversidad de composiciones disponibles y de las diferentes eficacias de diversas vías de administración. Por ejemplo, sería de esperar que la administración oral requiriera dosificaciones mayores que la administración mediante inyección intravenosa. Pueden ajustarse variaciones en estos niveles de dosificación utilizando rutinas empíricas convencionales para la optimización, tal como se entiende bien en la técnica. La encapsulación de la composición en un vehículo de suministro adecuado (p. ej., micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) pueden aumentar la eficacia del suministro, particularmente para el suministro por vía oral.

También dentro del alcance de esta invención se encuentra una composición farmacéutica que contiene un soporte farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención. La composición farmacéutica se puede utilizar para tratar enfermedades descritas anteriormente. El soporte farmacéuticamente aceptable incluye un disolvente, un medio de dispersión, un revestimiento, un agente antibacteriano y antifúngico y un agente isotónico y retardador de la absorción.

La composición farmacéutica de la invención se puede formular en formas de dosificación para diferentes vías de administración utilizando métodos convencionales. Por ejemplo, se puede formular en una cápsula, un sello de gel o un comprimido para la administración oral. Las cápsulas pueden contener cualesquiera materiales farmacéuticamente aceptables estándares tales como gelatina o celulosa. Los comprimidos se pueden formular de acuerdo con procesos convencionales comprimiendo mezclas de la composición con un soporte sólido y un lubricante. Ejemplos de soportes sólidos incluyen almidón y azúcar bentonita. La composición también se puede administrar en una forma de un comprimido con envuelta dura o una cápsula que contiene un aglutinante, p. ej., lactosa o manitol, una carga convencional y un agente para la formación de comprimidos. La composición farmacéutica se puede administrar a través de la vía parenteral. Ejemplos de formas de dosificación parenterales incluyen disoluciones acuosas, solución salina isotónica o glucosa al 5% del agente activo, u otro excipiente farmacéuticamente aceptable, bien conocido. Ciclodextrinas u otros agentes solubilizantes bien conocidos para los que están familiarizados con la técnica se pueden utilizar como excipientes farmacéuticos para el suministro del agente terapéutico.

La eficacia de una composición de esta invención se puede probar tanto in vitro como in vivo. Véanse, p. ej., los ejemplos que figuran más adelante. En síntesis, la composición se puede someter a ensayo en cuanto a su capacidad para inducir la muerte de células T activadas in vitro. Para estudios in vivo, la composición se puede inyectar en un animal (p. ej., un modelo de ratón) y luego se puede acceder a sus efectos terapéuticos. En base a los resultados, se puede determinar un intervalo de dosificación y una vía de administración apropiados.

Los ejemplos específicos que figuran a continuación han de considerarse como meramente ilustrativos y no limitativos del resto de la descripción de modo alguno. Sin una elaboración ulterior, se piensa que un experto en la técnica puede, en base a la descripción en esta memoria, utilizar la presente invención en su mayor medida.

EJEMPLO 1: Anticuerpos monoclonales 15A7, 43B6 y 9F9 de ratón

Generación de anticuerpos anti-PSGL-1

Se utilizaron técnicas convencionales para generar anticuerpos monoclonales de ratón que se unen específicamente a PSGL-1 humano (hCD162). Más específicamente, ratones fueron inmunizados con la fracción

de membrana de células T humanas activadas con PHA y fueron sacrificados para generar líneas celulares de hibridoma. Sobrenadantes procedentes de las líneas celulares de hibridoma resultantes se rastrearon en cuanto a la unión a células CHO que expresan establemente hCD162. Se identificaron, subclonaron y analizaron ulteriormente, tal como se describe más adelante, aquellas líneas productoras de anticuerpos que se unían a células CHO que expresan hCD162 pero no a las células CHO parentales.

Entre las líneas identificadas se encontraban m152-15A7, m166-43B6 y m128-9F9. Éstas producían anticuerpos de IgG1 15A7, 43B6 y 9F9, respectivamente. El ensayo de la inmunotransferencia demostró que estos tres anticuerpos extraían de un lisado de células T activadas una proteína que podía ser detectada por un anticuerpo anti-hCD162 (kpl-1, PharMingen, San Diego, CA).

Los tres anticuerpos recién descritos se sometieron a ensayo en cuanto a sus capacidades para inducir la apoptosis de células T activadas. Sobrenadantes del cultivo que contenían anticuerpos monoclonales secretados por las tres líneas celulares de hibridoma se incubaron respectivamente con células T humanas no activadas (día 0) o células T humanas activadas in vitro (día 7) durante 6 horas. Las células fueron luego teñidas con anexina V y fueron sometidas a análisis FACS. Células CD3-positivas fueron reguladas para asegurar el recuento de células T humanas activadas in vitro o células T humanas en reposo. Las células apoptóticas eran anexina V tinción-positivas.

La Tabla 1 resume el porcentaje de células T apoptóticas entre la totalidad de las células T escaneadas.

Tabla 1 Porcentaje de células T apoptóticas

	No tratadas	Anti-myc	m128-9F9	No tratadas	Anti-myc	m152-15A7	M166-43B6
Día 0	4,17	6,67	5,82	18,18	15,52	5,23	6,57
Día 7	12,63	13,36	28,71	24,18	23,08	51,66	49,44

Estos resultados indican que los anticuerpos 15A7, 43B6 y 9F9 de ratón (1) son específicos para hCD162 y (2) se pueden unir a células T activadas humanas y pueden inducir la apoptosis de células T activadas, pero no células T humanas en reposo.

El ensayo de la apoptosis también se realizó en células mononucleares de sangre periférica humana activadas con PHA (PBMC – siglas en inglés). Se encontró que los anticuerpos sólo inducían la apoptosis en células T activadas, pero no en células T en reposo, en células B o en neutrófilos.

Es sabido que los anticuerpos que agotan células T, tales como anti-CD3, son capaces de inducir la producción de factores solubles. La terapia utilizando anticuerpos de este tipo resulta habitualmente en un síndrome de citocina deletéreo. Para someter a ensayo si un anticuerpo anti-PSGL-1 también provocaba efectos secundarios asociados a citocinas, PBMC humanas, aisladas recientemente, fueron cultivadas con 15A7 durante 24, 48 ó 72 horas. Después se determinaron los niveles de citocinas en el sobrenadante. Cantidades considerables de IL-2, TNF- α e IFN- γ se produjeron en PBMC activadas con PHA (control positivo), mientras que niveles de estas citocinas procedentes de células tratadas con 15A7 no eran detectables. Estos resultados sustentaron que anti-PSGL-1 no tiene o tiene un efecto pequeño sobre los glóbulos rojos periféricos en reposo tanto en aspectos de la inducción apoptótica como en la activación de células.

Dado que los anticuerpos arriba descritos inducen selectivamente la apoptosis de células T activadas sin provocar efectos adversos sobre células T en reposo u otras células inmunes, la administración de los mismos a un sujeto no es probable que dé como resultado una linfopenia o una inmunodeficiencia amplia tal como lo hace anti-CD3 o un agente inmunosupresor.

Representación en mapa de los epítomos de anticuerpos anti-CD162

Para representar en mapa los epítomos de unión de 15A7, 43B6 y 9F9 de ratón sobre CD162 humano, se expresaron y purificaron una serie de proteínas de fusión que cubrían diversas regiones de CD162 humano. Las interacciones entre las proteínas de fusión y estos anticuerpos monoclonales se examinaron mediante el análisis con enzima unida a inmunosorbente (ELISA) sándwich.

En síntesis, fragmentos que cubren diversas regiones del gen CD162 humano fueron expresados como proteínas de fusión con la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina gamma 1 humana en *E. coli*. ADNc que codifica la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina gamma 1 humana fue amplificada mediante

5 PCR con cebadores que tienen un sitio *Bgl*II y un sitio *Bam*HI. El producto de la PCR se cortó mediante *Bgl*II y *Bam*HI y se subclonó en un vector pET-32a (Novagen) que había sido digerido por las mismas enzimas. Después se amplificaron mediante PCR ADNcs que codifican diversas regiones de hCD162 con cebadores que tienen un sitio *Nde*I en el extremo 5' y un sitio *Bgl*II en el extremo 3'. Los productos de la PCR se cortaron mediante las correspondientes enzimas y se fusionaron en marco a la secuencia que codifica la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina gamma 1 humana en el vector pET-32a. Los cebadores utilizados en cada una de las construcciones se listan en la Tabla 2, y las secuencias de los cebadores se listan en la Tabla 3.

Tabla 2 Nombres de cebadores utilizados en cada uno de los experimentos

Para secuencias amplificadoras que codifican:	Cebador directo	Cebador inverso
Fragmentos de hCD162 expresados en E. coli		
42-119	AB1001	AB1005
42-80	AB1001	AB1008
61-99	AB1003	AB1009
81-119	Ab1004	AB1005
42-70	AB1001	AB1007
42-60	AB1001	AB1006
50-80	AB1002	AB1008
50-70	AB1002	Ab1007
42-319	AB1001	Ab1010
115-126	AB1022	AB1023
115-126EtoR	AB1024	AB1025
Región V de ADNcs		
Cadena ligera	AB1058	AB1059
Cadena pesada	AB1058	AB1060
Fragmentos de hCD162 expresados en mamíferos		
1-119	AB1011	AB1013
1-319	AB1011	AB1012
110-319	AB1058	AB1059
94-148	AB1020	AB1021
119-222	AB1018	AB1019
174-269	AB1016	AB1017
214-317	AB1014	AB1015
Cadenas quiméricas		
Cadena ligera de 15A7	AB1030	AB1031
Cadena pesada de 15A7	AB1032	AB1033
Cadena ligera de 9F9	AB1026	AB1027
Cadena pesada de 9F9	AB1028	AB1029
Cadena ligera de 43B6	AB1034	AB1035
Cadena pesada de 43B6	Ab1036	AB1037
Cadenas humanizadas		
Cadena ligera de 15A7		
Cadena ligera de 15A7 1º par	AB1048	AB1057
Cadena ligera de 15A7 2º par	AB1049	AB1050
Cadena ligera de 15A7 3º par	AB1051	AB1052
Cadena ligera de 15A7 4º par	AB1053	AB1054
Cadena ligera de 15A7 4º par	AB1055	Ab1056
Cadena pesada de 15A7	AB1038	AB1047
Cadena pesada de 15A7 1º par	AB1039	AB1040
Cadena pesada de 15A7 2º par	AB1041	AB1042

Cadena pesada de 15A7 3º par	AB1043	AB1044
Cadena pesada de 15A7 4º par	AB1045	AB1046

Tabla 3. Secuencias de cebadores

Nombre	Secuencia
AB1001	cccgggacCATATGcaggccaccgaatatgagtacc
AB1002	tatgagCATATGgattatgatttccctgccagaaacgg
AB1003	aaacggagCATATGgaaatgctgaggaacagcactgacacc
AB1004	aaccctCATATGaccactgtggagcctgtgcaaggcg
AB1005	gtggtcAGATCTtccatagctgctgaatcctggacagg
AB1006	GTTCCTCAGATCTTCTGGAGGCTCCGTTTCTGGCAGG
AB1007	AGGCCCAAGATCTGGAGTGGTGTGAGTGTCTGTTCCCTC
AB1008	ggtcccAGATCTgtagactcaggggttccaggccc
AB1009	gtggtcAGATCTgtgactgcccctcctgcattccaggcc
AB1010	GCCAGCAGATCTTGCTTCCAGAGATGTGGTCTGGGG
AB1011	cgcggtccatgcctctgcaactcctcctgttgc
AB1012	GCCAGCCTCGAGCTTCCAGAGATGTGGTCTGGGG
AB1013	GGTCTGctcgagCATAGCTGCTGAATCCGTGGACAGGTTCC
AB1058	agacaggccaccgaagggaacctgtccacg
AB1059	egtggacaggttcccttcgggtggcctgtct
AB1014	ccgctcgagcgccaagattaggatggc
AB1015	cgggatccactcaaaccacagccatgg
Ab1016	ccgctcgagtggttagtaggttccatgg
Ab1017	cgggatcaactcaaccacaggcctg
Ab1018	ctgtgcctcgagggtgtggtttgagtg
Ab1019	cgggatccatggagatacagaccactcaac
Ab1020	cgggatccgatgcaggaggggcagtcac
Ab1021	ggcctcactcgagttgtctgtgcctc
Ab1022	TatgGATTcAGCAGCTATGGAGATACAGACCACTCAACCAGcA
Ab1023	GATCTgcTGGTTGAGTGGTCTGTATCTCCATAGCTGCTGAATCCA
Ab1024	TatgGATTcAGCAGCTATGCGGATACAGACCACTCAACCAGcA
Ab1025	GATCTgcTGGTTGAGTGGTCTGTATCCGCATAGCTGCTGAATCCA
AB1026	CTAGTCTAGATGACCCAACTCCACTCTCCC
AB1027	CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTAGCATCAGCCGTTGATTTC
AB1028	TAACA'TtctagATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGG
AB1029	GGATAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACCGTGG
AB1030	CTAGTCTAGATGGAGACAGACACTCCTGTTATGGG
AB1031	CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTTTCCAGCTTGGTCCCCCTCC
AB1032	CTAGTCTAGATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTC
AB1033	CTAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACTGAGGttcc
AB1034	CTAGTCTAGATGGATTTTCTGGTGCAGATTTTCAGC
AB1035	CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTAGCATCAGCCGTTTCAGCTCC
AB1036	CTAGTCTAGATGGAAATGGAGCTGGGTCTTTCTC
AB1037	CTAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCACTTCCAGTGGATAGACTGATGG
AB1038	TCTATCTAGATGAACCTCGGGTCCAGCTTGATTTTCTTGTCTTGTTTAAAAGGTGTCCAGTG
AB1039	CCTTGTTTTAAAAGGTGCCAGTGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGG
AB1040	CTGAAAGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAAGCTTCTCCAGGCTGCACTAAGCCTCC
AB1041	GCCTCTGGATTCACCTTTCAGTACTTTGGAATGCACCTGGGTTCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTCGAG

```

AB1042 GCATAGAAGATGGTACTACTGCCACCATTAATGTATGCGACCCACTCGAGTCCCTTCCCTGGAGCC
AB1043 GTAGTACCATCTTCTATGCAAACGCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGATAATGCC
AB1044 CCTCAGCCCTCAGAGAATTCATTTGCAGGTACAGGGTGTCTTGGCATTATCTCTGGAGATGG
AB1045 GAATTCCTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCAAGATATGCTAGTTACGGAGG
AB1046 CTGTGACCAGGGTGCCTTGGCCCCAATAGTCCATAGCACCCCCCTCCGTAACCTAGCATATC
AB1047 ACCCTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACTGTGACCAGGGTGCCTTGGCC
AB1048 TCTATCTAGATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGC
AB1049 GCTGCTCTGGGTTCCAGGCTCCACTGGTGACATTGATGACCCAACTCTCCGAGCTCTTTG
AB1050 GATCTGCAGGTGATAGTGACCCTATCCCCTACAGACGCAGACAAAGAGCTCGGAGATTGG
AB1051 CACTATCAGCTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAATGATGGAACACCTATTTTGAATG
AB1052 GATGAGAAGCTTGGGTGCCTTTCTGGTTTCTGTTGGTACCATTCAAATAGGTGTTTC
AB1053 GCACCCAAGCTTCTCATCTATAAAGTTTTCCAATCGATTTTCTGGTGTCCCATCCAGGTTTGTAGTGGC
AB1054 GCAGAGAAGAGATGGTGAGGGTGAAGTGTGTCCAGACCCACTGCCACTAAACCTGGATGG
AB1055 CTCACCATCTCTTCTCTGCAGCCGGAGGATTTGCAACCTATTACTGTTTTCAAG
AB1056 CCTTGGTGCCTTGACCGAACGTGAGAGGAACATATGAACCTTGAAAACAGTAATAGG
AB1057 ACCCTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTACGTTTGATTTCCACCTTGGTGCCTTGACCC
AB1058 TATATCTAGAATCCCCCCCCCCCCCCCC
AB1059 TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC
AB1060 TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGAC (C/A/T) GATGGGG (C/G) TGT (C/T) GTTTTGGC

```

Las construcciones de expresión arriba descritas fueron transformadas en la cepa BL21 de *Escherichia coli* (DE3). Las células transformadas se recolectaron después de 6 horas de inducción con IPTG (2 mM) y se resuspendieron en PBS. Después de tratar mediante ultrasonidos las células y de centrifugar a 14.000 g durante 10 minutos, los sobrenadantes resultantes se recogieron para la purificación de las proteínas de fusión. Más específicamente, los sobrenadantes se incubaron primero con perlas de proteína G o de proteína A durante 3 horas a 4°C. Las perlas se centrifugaron después a 3.000 g y se lavaron con tampón de lavado I (Triton X-100 al 0,05%, Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, NaCl 400 mM, CaCl₂ 1 mM y 1 mg/ml de OVA) y tampón de lavado II (Triton X-100 al 0,05%, Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 y 150 mM de NaCl), cada vez durante 5 veces. Las proteínas ligadas se eluyeron luego con un tampón de elución que contenía 0,1 M de glicina-HCl, pH 2,7 y se neutralizaron con Tris-HCl 1 M, pH 8,6. Todas las proteínas de fusión purificadas se cuantificaron mediante el ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, N° de cat. 500-0006) y se verificaron mediante SDS-PAGE.

Se realizó un ELISA sándwich para estudiar la interacción entre los fragmentos de hCD162 y cada uno de 15A7, 9F9 y 43B6. Placas de microtitulación de 96 pocillos se revistieron con anticuerpo de IgG anti-humano de cabra (Southern Biotechnology, N° de cat. 2040-01) (2 µg/ml, 50 µl/pocillo) durante una noche a 4°C. Las placas se bloquearon mediante incubación con 0,25% de BSA en PBS (150 µl/pocillo) durante 1 hora a 37°C. Las placas bloqueadas se incubaron luego con proteínas de fusión que contenían diversos fragmentos de CD162 humano (2 µg/ml) durante 2 horas a la temperatura ambiente. Después de lavar 4 veces con PBS que contenía 0,05% de Tween 20 (PBST), las placas se incubaron con anticuerpos de ensayo (2 µg/ml) durante 1,5 horas a la temperatura ambiente. Después de la incubación, las placas se lavaron 4 veces con PBST, después se añadieron a cada uno de los pocillos 50 µl de IgG anti-ratón de cabra diluida a razón a de 1 a 3000 con fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology, N° cat. 1031-04), y las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C. La reacción enzimática se llevó a cabo añadiendo 50 µl de una disolución de sustrato de fosfatasa alcalina (1 comprimido de sustrato de fosfatasa alcalina disuelto en 5 ml de tampón sustrato que contiene 0,012 M de Na₂CO₃, 0,16 M de NaHCO₃ y 1 mM de MgCl₂ a pH 8,6), y se determinó la absorbancia a 405 nm.

Se encontró que 43B6 y 9F9 eran capaces de interactuar con todas las proteínas de fusión que contenían residuos 50 a 60 de CD162 humano maduro, indicando que los epítomos de 43B6 y 9F9 estaban situados entre los residuos 50-60. A diferencia de 9F9 y 43B6, 15A7 solamente se unía a la proteína de fusión que cubre los residuos 42 a 319, pero no a la proteína de fusión que cubre los residuos 42-119, indicando que el epítomo de 15A7 estaba situado entre los residuos 119 y 319. La localización del epítomo de 15A7 se estrechó luego a los residuos 115 a 126. El cambio de un aminoácido en la posición 120 (Glu → Arg) disminuía la interacción entre 15A7 y la proteína de fusión, indicando que el dominio de contacto primario de 15A7 sobre CD162 humano está situado en o junto a la posición 120, y el residuo Glu es esencial para la interacción.

Proteínas de fusión que cubren diversas regiones de CD162 humano también se expresaron en células de mamíferos y se sometieron a ensayo en cuanto a su interacción con 15A7. Fragmentos que cubren estas regiones fueron expresados como proteínas de fusión con la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina gamma 1 humana en células de mamíferos. Primeramente, la región constante de la cadena pesada de

inmunoglobulina gamma 1 humana que codifica ADNc se insertó en un vector pcDNA3 (Invitrogen). En segundo lugar, ADNcs que codifican diversas regiones de hCD162 fueron amplificados mediante PCR con cebadores que introducen un sitio *Bam*HI en el extremo 5' y un sitio *Xho*I en el extremo 3'. Estos productos de la PCR fueron cortados mediante las enzimas correspondientes y fueron subclonados en el vector pcDNA3 que contenía la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina gamma 1 humana. El nombre y la secuencia para cada uno de los cebadores están listados en las Tablas 2 y 3 anteriores.

Los vectores de expresión en mamíferos recién descritos fueron transfectados transitoriamente en células COS-7 mediante Lipofectamine 2000 (Invitrogen, N° de cat. 11668-027) siguiendo las directrices del fabricante. Las células transfectadas se hicieron crecer en medio de Ig ultra-bajo (Invitrogen, N° de cat. 16250-078). Las proteínas expresadas fueron purificadas y sometidas a ELISA sándwich de la misma manera que la descrita anteriormente.

Los resultados del ELISA demuestran que sólo las proteínas de fusión que contienen residuos 94 a 148 eran capaces de interactuar con 15A7. Estos resultados son consistentes con la idea de que el epítipo de 15A7 está situado entre los residuos 115 y 126.

La totalidad de los resultados anteriores indica que los epítopos de 9F9, 43B6 y 15A7 son dependientes de proteínas, en lugar de dependientes de la modificación de hidratos de carbono, dado que los tres anticuerpos se unen a proteínas de fusión expresadas en bacterias. También indican que, a pesar de que 15A7, 9F9 y 43B6 muestran propiedades similares en términos de especificidad de unión y funcionan para inducir la apoptosis en células T activadas, actúan a través de diferentes dominios de CD162 humano y se comportan de manera diferente.

EJEMPLO 2: Anticuerpos quiméricos 15A7, 43B6 y 9F9

Clonación de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de anticuerpos anti-CD162

ADNcs que codifican las regiones variables de las cadenas ligera y pesada (V_L y V_H) de anticuerpos 15A7, 43B6 y 9F9 fueron amplificados mediante un método de PCR anclado. Los cebadores 3' se hibridaban a las regiones C, y los cebadores 5' se hibridaban a colas G fijadas al ADNc utilizando desoxittransferasa terminal. Los fragmentos de PCR se clonaron en un vector pCRII (Invitrogen). Se secuenciaron y compararon varios clones independientes para cada una de las cadenas. Se cogió una secuencia representada por la mayoría de los clones independientes. La secuencia de aminoácidos traducida se analizó luego para confirmar que la secuencia elegida poseía las características de la región V típica de la cadena ligera o pesada de ratón, y que pertenecía a un subtipo específico. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) se identificaron luego comparando las secuencias de aminoácidos traducidas con la secuencia consenso de cada uno de los subtipos. El nombre y la secuencia para cada uno de los cebadores utilizados se listan en las Tablas 2 y 3 anteriores. Las secuencias de aminoácidos deducidas de las regiones V de las cadenas ligera y pesada de 15A7, 43B6 y 9F9 (SEQ ID NOs: 19-24) se muestran en el Sumario.

Anticuerpos quiméricos

Para generar vectores para la expresión de anticuerpos quiméricos, ADNcs que codifican las regiones V_L y V_H de 15A7, 43B6 y 9F9 fueron amplificados mediante PCR utilizando cebadores para incluir la secuencia del péptido señal 5' y la señal de donante de corte y empalme 3'. Los cebadores también introducían sitios *Xba*I en los dos extremos de los productos de la PCR, que luego fueron cortados mediante la enzima *Xba*I y ligados en el vector pVk, pVg1, pVg2 o pVg4 digerido con *Xba*I. Más específicamente, los ADNcs de la región de V_L de 15A7, 43B6 y 9F9 se subclonaron en el plásmido pVk. Este plásmido contenía un promotor de CMV y una secuencia que codifica la región constante de la cadena ligera humana. Los ADNcs de la región V_H de 15A7, 43B6 y 9F9 se subclonaron en los plásmidos pVg1, pVg2 o pVg4. Cada uno de los tres plásmidos tenía un promotor de CMV. También contenían, respectivamente, las regiones constantes de la cadena pesada humana de IgG1, IgG2 e IgG4.

Cada uno de los plásmidos que codifican la cadena ligera arriba descritos fue co-transfectado con un plásmido que codifica la cadena pesada en células COS-7. Se recogieron los sobrenadantes de las células transfectadas. Anticuerpos quiméricos en los sobrenadantes fueron analizados en cuanto a su capacidad para unirse a CD162 humano y para inducir la apoptosis de células T activadas.

Se encontró que todos los anticuerpos quiméricos preparados a partir de 15A7, 43B6 y 9F9 se unían a transfectantes Sp2/0 que expresan establemente CD162 humano, pero no a células Sp2/0 parentales, indicando que conservaban la especificidad de la capacidad de unión a CD162 humano. Además de ello, se encontró que los

anticuerpos quiméricos inducían la apoptosis en células T que habían sido activadas durante 7 días, indicando que conservaban asimismo esta función de sus homólogos de ratón.

Anticuerpos humanizados

5 Se utilizó 15A7 de ratón para producir anticuerpos humanizados injertando sus CDRs sobre un armazón humano. Para conservar la afinidad de unión y la especificidad, es esencial conservar la conformación de la región V cuando se injertan las CDRs en el armazón humano. Para seleccionar un donante de armazón apropiado, se compararon las secuencias de aminoácidos de las regiones V de las cadenas ligera y pesada de 15A7 de ratón con las de 50 anticuerpos de ratón que habían sido humanizados.

10 Se encontró que un anticuerpo de ratón, mDREG-55, tenía una homología de la secuencia elevada con la región V de 15A7 de ratón, tanto en la cadena ligera como en la pesada. Se lista a continuación, una alineación de la secuencia de 15A7 de ratón frente a este anticuerpo mDREG-55 (las CDRs están destacadas):

15 Alineamiento de la cadena ligera

```

mDREG-55      DIVLTQSPASLSVSLGERASISCAASQSVDPYDCGDSMMNWYQKPGQPPKLLIYAASNLES
                DI++TQ+P SL VSLG++ASISC++SQS+ + DG++Y WY QKPGQ PKLLIY SN S
m15A7         DILMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSVHNDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
                GIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCOOSNEDEWTFGGGKLEIK
mDREG-55      G+P RFSGSGSGT FTLNI VE ED YYC Q + P TF GGKLE+K
m15A7         GVPDRFSGSGSGTHFTLNISRVEAEDLGIYYCFQGSYVPETFGAGTKLELK
    
```

Alineamiento de la cadena pesada:

```

mDREG-55      EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSRYAMSWVRQTPKRLWVAASISGSGSTFYVPSVKG
                +V+LVESGGGLV+PGGS KLSCAASGFTFS++ M WVRQ PEK LEWVA I+ G ST +Y ++VKG
m15A7         DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSEGMHWVROAPEKLEWVAAYINGGSSYFYANAVKG
                RFTISRDNARNILYLQMSLRSEDTAMYYCARFDYDCGYFDYWGQGTTLTVSS
mDREG-55      RFTISRDN +N L+LQM+ LRSEDTA+YYC R Y G DYWGQT++TVSS
m15A7         RFTISRDNPKNTLFLQMTILRSEDTAIYYCGRVASYGGGAMDYWGQTSVTVSS
    
```

20 DREG-55 de ratón es un anticuerpo IgG1 monoclonal contra L-selectina. Las secuencias de las regiones V_L y V_H de 15A7 de ratón eran respectivamente un 64,3% (armazón solo: 73,8%) y 70% (armazón solo: 81,6%) homólogas con las de DREG55 de ratón. DREG-55 humanizado (HuDREG-55) había sido construido utilizando secuencias de armazón de regiones V_L y V_H de un Gal de anticuerpo humano. Por lo tanto, para humanizar 15A7 de ratón, las secuencias del armazón de las cadenas ligera y pesada de Gal humano se utilizaron para reemplazar los homólogos de 15A7 de ratón.

25 Las regiones variables ligera y pesada de 15A7 humanizadas fueron cada una de ellas ensambladas mediante 4 pares de oligonucleótidos sintéticos (~ 80 bases de longitud). Los oligonucleótidos de cada uno de los pares fueron solapados alrededor de 20 nucleótidos. Las secuencias de nucleótidos se seleccionaron y sintetizaron para codificar las secuencias de proteínas de las regiones variables humanizadas que incluían péptidos señal. El ensamblaje y la amplificación de los genes se realizaron en cuatro etapas: (1) los cuatro pares de oligonucleótidos complementarios se re-asociaron y se extendieron con fragmento de Klenow en 4 reacciones separadas; (2) los 4 fragmentos de ADNds resultantes se mezclaron por pares, se desnaturalizaron, se re-asociaron y se extendieron en dos reacciones separadas; (3) los dos fragmentos de ADNds resultantes se mezclaron, desnaturalizaron, re-asociaron y se extendieron para crear el ADNds de longitud completa final; y (4) el ADN resultante se amplificó mediante PCR con cebadores para introducir un sitio XbaI en ambos extremos. El fragmento de PCR se cortó luego mediante XbaI y se insertó en los vectores pVK y pVg4 digeridos con XbaI respectivos. Después, en las posiciones en donde se consideraban importantes las interacciones entre CDR y el armazón, los residuos de Gal se cambiaron de nuevo por los de 15A7 de ratón (es decir, I62V y D74H). En lo que sigue se listan alineamientos de 15A7 de ratón y 15A7 humanizado (Hu15A7) frente a mDREG-55, en que V62 y H74 están subrayados.

Alineamiento de la cadena ligera:

```

hDREG-55      DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQSVDY-DGDSYMNWYQKPGKAPKLLIYAASNLES
15A7 de ratón  DIILMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSIVHNDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
Hu15A7        DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSQSIVHNDGNTYFEWYQKPGKAPKLLIYKVSNRFS

hDREG-55      GIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQSNEDPWFPGQGTKVEIK
m15A7         GVPDRFSGSGSGTHFTLNISRVEAEDLGIYYCFQGSYVPLTFGAGTKLELK
Hu15A7        GVPDRFSGSGSGTHFTLNISRVEAEDLGIYYCFQGSYVPLTFGQGTKVEIK
    
```

5 Alineamiento de la cadena pesada:

```

hDREG-55      EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVASISTGGST-YYPDSVKG
m15A7         DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSFGMHWRQAPEKGLEWVAYINGGSSTIFYANAVKG
Hu15A7        EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWRQAPGKGLEWVAYINGGSSTIFYANAVKG

hDREG-55      RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR--DY-DGYFDYWGQGLVTVSS
m15A7         RFTISRDNKNTLYLQMTILRSEDATAYYCGRYASYGGGAMDYWGQGSVTVSS
Hu15A7        RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYASYGGGAMDYWGQGLVTVSS
    
```

10 Plásmidos así obtenidos codificaban las cadenas pesada y ligera de 15A7 humanizado. Estos plásmidos se co-transfectaron luego en células COS-7. Los sobrenadantes agotados procedentes de células cultivadas se recogieron después. 15A7 humanizado en los sobrenadantes se sometió a ensayo en cuanto a su capacidad de unirse a transfectantes de CHO de manera estable que expresan hCD162 y para inducir la apoptosis en células T activadas durante 7 días. Los resultados demuestran que conserva estas capacidades.

15 Preparación de anticuerpos quiméricos y humanizados

Se generaron células que producían anticuerpos humanizados y quiméricos. Más específicamente, células Sp2/0 (Sp2/0-Ag14; ATCC CRL 1581) se transfectaron de manera estable con los plásmidos apropiados mediante electroporación utilizando un aparato Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories) a 360 V y una capacitancia de 25 µF de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Antes de la transfección, los plásmidos se linearizaron mediante digestión con la enzima *Bam*HI. Todas las transfecciones se realizaron utilizando 10⁷ células en PBS y 20 µg de cada uno de los ADNs del plásmido. Las células procedentes de cada una de las transfecciones se extendieron en dos placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Al cabo de 48 horas, se aplicó un medio selectivo (suplemento de DMEM medio FBS al 10%/hipoxantina/timidina) y 1 µg/ml de ácido micofenólico. Células productoras de anticuerpos se rastrearon y aislaron examinando la presencia de anticuerpos en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA.

30 Las células aisladas se cultivaron en medio exento de suero, o con bajo contenido en Ig, y el sobrenadante cultivado se recogió. Los anticuerpos se purificaron mediante el paso sobre una columna de proteína estafilocócica A-Sepharose CL-4B. Después de lavar 5 veces cada vez con tampón de lavado I (Triton X-100 al 0,05%, Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, NaCl 400 mM, CaCl₂ 1 mM y 1 mg/ml de OVA) y tampón de lavado II (Triton X-100 al 0,05%, Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 y NaCl 150 mM), los anticuerpos ligados se eluyeron con un tampón de elución que contenía 0,1 M de glicina-HCl, pH 2,7 y se neutralizaron con Tris-HCl 1 M, pH 8,6.

35 Mediciones de afinidad

Las afinidades de unión de los anticuerpos 15A7 de ratón, quiméricos y humanizados arriba descritos se determinaron mediante unión competitiva.

40 15A7 de ratón se biotiniló mediante un sistema Sulfo-NHS-biotina EZ-Link (Pierce Biotechnology, N° de cat. 21217). En síntesis, 0,5 mg (3,3 x 10⁻⁶ nmoles) de 15A7 de ratón se disolvieron en 187 µl de PBS y se mezclaron con 6,8 x 10⁻⁵ nmoles de Sulfo-NHS-biotina. La mezcla se incubó luego en hielo durante 2 horas antes de separar

las biotinas libres dializando a 4°C durante una noche frente a PBS. El 15A7 de ratón marcado con biotina, así obtenido, se almacenó a 4°C hasta su uso.

5 Como fuente de antígeno CD162 humano se utilizaron transfectantes Sp2/0 que expresan establemente CD162 humano. Como trazador se utilizó 15A7 de ratón marcado con biotina. Cantidades crecientes de anticuerpos competidores (15A7 de ratón, quimérico o humanizado) se mezclaron con 35 ng de 15A7 de ratón marcado con biotina y se incubaron con 1×10^5 células Sp2/0 que expresan CD162 durante 1,5 horas a 4°C con agitación constante. Después del lavado, se añadieron a la mezcla anticuerpo secundario, estreptavidina-PE (Becton Dickinson Immunocytometry System Inc. N° de cat. 349023). Después de incubar durante 45 minutos a 4°C, las
10 células se lavaron de nuevo, se resuspendieron en 300 µl de PBS-1% de FBS y se sometieron análisis FACS.

Se encontró que la concentración competitiva semi-máxima de 15A7 de ratón era 3,72 µg/ml, mientras las de 15A7 quimérico y humanizado se encontraban alrededor de 5,71 µg/ml y 4,51 µg/ml, respectivamente. Estos resultados indican que las afinidades de 15A7 de ratón, quimérico y humanizado son equiparables. En otras palabras, la
15 afinidad de unión (K_a) para 15A7 de ratón es $4,03 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, mientras que las de 15A7 quimérico y humanizado son $2,62 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ y $3,33 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, respectivamente.

Análisis de competición

20 Se realizó un análisis de competición para estudiar la interacción entre los tres anticuerpos de ratón arriba descritos, PSGL-1 y P-selectina.

P-selectina es un ligando de alta afinidad principal para PSGL-1 en la mayoría de leucocitos. Con el fin de investigar si los tres anticuerpos previenen la unión de P-selectina a PSGL-1, se midió la unión de P-selectina humana purificada a células T activadas en presencia de los tres anticuerpos. Como un control positivo se utilizó
25 KPL-1, que se sabe que bloquea la interacción de P-selectina y PSGL-1.

PBMC humanas se activaron con PHA al 1% durante 2 días y se mantuvieron en medio con contenido en IL-2 durante 3 días. Las células se incubaron con 9F9 titulada, 15A7, 43B6, KPL-1 (un antagonista de PSGL-1) o un anticuerpo control (9E10) durante 30 minutos, seguido de la adición de P-selectina humana recombinante (1,25
30 µg/ml). La unión de P-selectina a células T activadas se midió mediante FITC anti-P-selectina analizada sobre FACS.

35 Consistente con los informes previos, KPL-1 abolía casi por completo la unión de P-selectina a células T activadas a una baja concentración (0,31 µg/ml). 43B6 bloqueaba la unión de P-selectina a células T activadas con la misma eficacia que lo hacía KPL-1, mientras que se requería una mayor concentración de 9F9 para conseguir este mismo efecto. De hecho, se necesitaban 0,08 µg/ml de KPL o 43B6 para suprimir el 50% de la unión. En contraposición, se requerían 5 µg/ml de 9F9. Además de ello, 15A7 no tiene efecto inhibidor alguno sobre la unión de P-selectina, incluso a 20 µg/ml. Sorprendentemente, potenciaba la unión de P-selectina a PSGL-1. Estos resultados indican
40 que 15A7 y P-selectina se unen a diferentes motivos de PSGL-1 en células T activadas.

El hecho de que 15A7 no compitiera con P-selectina por PSGL-1 indica que la administración in vivo de 15A7 no se supone que afecte a la inmunidad innata, interfiriendo en el reclutamiento de leucocitos dependiente de P-selectina.
45

Se informó que PSGL-1 se expresa a bajos niveles en plaquetas. Se examinaron los efectos de anticuerpos 15A7 en plaquetas. Se encontró que los anticuerpos no potenciaban ni inhibían la agregación de plaquetas humanas.

EJEMPLO 3: Anticuerpo monoclonal de hámster TAB4 contra PSGL-1 de ratón

50 Un anticuerpo monoclonal contra PSGL-1 de ratón, TAB4, se preparó de manera similar al método descrito en el Ejemplo 1. Inducía la apoptosis de células T in vitro y agotaba células T in vivo. Para determinar si interfería en la unión entre PSGL-1 de ratón y P-selectina de ratón, se realizó un análisis de competición de una manera similar al método descrito en el Ejemplo 2. Se encontró que TAB4 no inhibía la unión de P-selectina de ratón a PSGL-1 de
55 ratón, incluso a una concentración tan elevada como de 20 µg/ml.

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

60 Se caracterizaron anticuerpos monoclonales adicionales contra PSGL-1 humano, 4B7, 5C4, 12E7, 14B3, 17E5 y 18D12. Tras la unión a una célula T activada, todos ellos inducían la muerte de las células T activadas. El análisis

de competición se realizó de la manera descrita en el Ejemplo 2 para determinar si bloqueaban la interacción entre PSGL-1 y P-selectina. Se encontró que estos anticuerpos tienen, en todo caso, un pequeño efecto inhibitor sobre la unión de P-selectina humana a PSGL-1 humano, incluso a la concentración más elevada sometida a ensayo (5 µg/ml).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que se une específicamente a P-selectina glicoproteína ligando-1 humano sin interferir en la unión entre P-selectina glicoproteína ligando-1 y P-selectina, en donde el anticuerpo, tras la unión a P-selectina glicoproteína ligando-1 sobre una célula T activada induce la muerte de la célula T activada, y en donde el anticuerpo comprende una primera cadena de inmunoglobulina, que es una cadena ligera, que contiene SEQ ID NOs: 1-3, y una segunda cadena, que es una cadena pesada, que contiene SEQ ID NOs: 4-6.
- 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde la cadena ligera y la cadena pesada contienen, respectivamente, SEQ ID NOs: 19 y 20, o 25 y 26.
- 15 3. El anticuerpo de la reivindicación 2, en donde la cadena ligera y la cadena pesada contienen, respectivamente, SEQ ID NOs: 25 y 26.
- 20 4. Un anticuerpo que se une específicamente a P-selectina glicoproteína ligando-1 humano sin interferir en la unión entre P-selectina glicoproteína ligando-1 y P-selectina, en donde el anticuerpo, tras la unión a P-selectina glicoproteína ligando-1 sobre una célula T activada induce la muerte de la célula T activada, y en donde el anticuerpo se une específicamente a los residuos aminoácidos 115-126 de P-selectina glicoproteína ligando-1 humano.
- 25 5. El anticuerpo de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo se une específicamente a residuos aminoácidos 117-123.
- 30 6. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde el anticuerpo se une específicamente a residuos aminoácidos 119-121.
- 35 7. El anticuerpo de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo incluye una cadena ligera y una cadena pesada que contienen, respectivamente, SEQ ID NOs: 1-3 y SEQ ID NOs: 4-6.
- 40 8. Uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la fabricación de un medicamento para modular una respuesta inmune mediada por células T en un sujeto que tiene o que está en riesgo de tener una afección relacionada con una respuesta inmune excesiva mediada por células, en donde la afección es una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, una enfermedad alérgica o un cáncer de células T.
- 45 9. Uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir un rechazo de trasplante alogeneico o xenogeneico.
- 50 10. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
- 55 11. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- 60 12. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de IgG1 humana.
13. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de IgG2 humana.
14. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana.
15. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende (i) una cadena ligera que comprende una región variable que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 enlazada a una región constante de la cadena ligera kappa humana, y (ii) una cadena pesada que comprende una región variable que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 enlazada a una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana.
- 60 16. Una composición que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 ó

10 a 15.

5 17. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 ó 10 a 15, para uso en modular una respuesta inmune mediada por células T en un sujeto que tiene o que está en riesgo de tener una afección relacionada con una respuesta inmune excesiva mediada por células, en donde la afección es una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, una enfermedad alérgica o un cáncer de células T.

10 18. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 ó 10 a 15, para uso en tratar o prevenir un rechazo de trasplante alogeneico o xenogeneico.