

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 570**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2011 PCT/US2011/066470**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12088265**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011 E 11851933 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2654781**

54 Título: **Anticuerpos antiPselectina y métodos de su uso e identificación**

30 Prioridad:

21.12.2010 US 97473910
31.08.2011 US 201161529682 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.07.2018

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (50.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH y
OKLAHOMA MEDICAL RESEARCH FOUNDATION
(50.0%)

72 Inventor/es:

ROLLINS, SCOTT;
ALVAREZ, RICHARD;
ROTHER, RUSSELL;
KAWAR, ZIAD S. y
MCEVER, RODGER P.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 676 570 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-P-selectina y métodos de su uso e identificación

La presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen a epítopos conformacionales específicos de P-selectina, y a sus métodos de uso e identificación.

5 En la hemostasia normal y la vigilancia inmune, los leucocitos circulan libremente en la sangre y responden a la lesión e infección en un proceso secuencial de señalización de adhesión mediado por moléculas de adhesión celular (1-3). En la enfermedad inflamatoria y trombótica, este proceso está desregulado y puede sustentar una patología en la que los leucocitos atacan el propio tejido del cuerpo y pueden causar complicaciones graves y algunas veces mortales. Es bien sabido que la adhesión de leucocitos cumple un papel importante en la patología de muchos trastornos inflamatorios y trombóticos tales como vasooclusión en enfermedad de células falciformes, lesión por 10 reperfusión, trombosis, aterosclerosis, asma, artritis reumatoide, psoriasis y metástasis tumoral (4-15), trombosis venosa profunda (DVT). La P-selectina también está implicada en otros procesos de enfermedad, tales como daño tisular y de órganos asociado con la inflamación, por ejemplo, lesión por isquemia-reperfusión. La P-selectina es, por lo tanto, un objetivo para la intervención en enfermedades inflamatorias y trombóticas humanas.

15 Las selectinas son una familia de proteínas de adhesión que se sabe que cumplen un papel clave en el reclutamiento de leucocitos en el endotelio activado y las plaquetas. La P-selectina es un miembro de la familia de selectina de glicoproteínas de adhesión que también incluye las selectinas L y E (16). Las selectinas median el reclutamiento, la fijación y rodamiento inicial, y la adherencia de los leucocitos a los sitios de inflamación (1). La P-selectina se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y alfa-gránulos de plaquetas y se moviliza rápidamente a la membrana plasmática después de la estimulación por sustancias vasoactivas tales como histamina y trombina (17). 20

Enfermedad de células falciformes

25 La enfermedad de células falciformes (SCD) es un raro trastorno sanguíneo hereditario que causa anemia crónica y vasooclusión, que afecta principalmente a personas de ascendencia afroamericana en los Estados Unidos. La enfermedad de células falciformes es el trastorno de un gen único más común en los afroamericanos, y afecta aproximadamente a 1 de cada 375-600 personas de ascendencia africana (18, 19). Las afecciones de las células falciformes también son comunes entre las personas de los países mediterráneos, África, el Caribe y partes de América del Sur y Central (18, 19).

30 La SCD es una enfermedad autosómica recesiva causada por una mutación sin sentido única (Val6Ala) en el gen de la β -globina que hace que la hemoglobina mutante sea menos soluble y propensa a la polimerización después de la desoxigenación. La polimerización de la hemoglobina provoca la deformación del eritrocito para dar a la célula una forma de hoz (20).

35 La SCD tiene tres variantes comunes: enfermedad de células falciformes homocigota (enfermedad de hemoglobina SS), enfermedad de hemoglobina C falciforme doblemente heterocigota (enfermedad de hemoglobina SC) y las β -talasemias de células falciformes. La forma más común y grave de la enfermedad ocurre en individuos que heredan dos copias de la variante de HbS (HbSS) y la hemoglobina primaria en sus eritrocitos es la hemoglobina falciforme. Otros individuos pueden estar afectados como heterocigotas compuestas con severidad variable de la enfermedad. Tienen una copia de la variante de HbS apareada con una copia de otra variante del gen de la β -globina. HBSC produce una forma leve de la enfermedad. Las variantes de β -talasemia Hb (que producen la incapacidad de producir la cadena de β A globina normal (β^0) o una reducción en su producción (β^+) producen una variedad de 40 gravedades clínicas. HbS β^0 es una forma grave, mientras que HbS β^+ puede ser moderada o leve en función de la contribución de cada variante a la hemoglobina total del paciente. Se pueden producir otras variantes más raras si junto con el gen S se hereda otra hemoglobina anormal del otro progenitor, tal como D, G u O. La forma predominante de las células falciformes está presente en individuos con una copia de HbS y una copia del gen de la β -globina normal (HbA). Estos individuos portan el rasgo de células falciformes (18). 45

50 La SCD afecta a aproximadamente 50.000-100.000 personas en los U. S. (21-24). Todos los individuos que son homocigotas o heterocigotas compuestas para HbS muestran algunas manifestaciones clínicas de SCD. Los síntomas generalmente aparecen dentro de los primeros 6 meses de vida, pero existe una variabilidad considerable en la gravedad de SCD (25). Los individuos con HbSS son los más gravemente afectados, seguidos por individuos con HbS β^0 -talasemia (22, 26). Además del genotipo, los factores adicionales afectan la gravedad de la enfermedad, tal como los niveles de hemoglobina fetal y el haplotipo del clúster de β -globina, una región que contiene 5 genes que codifican la porción β de la hemoglobina. A pesar de la capacidad de determinar los factores de riesgo genéticos, la capacidad para predecir el curso de la enfermedad desde el nacimiento es limitada (27).

En los Estados Unidos, la detección de células falciformes en el momento del nacimiento es obligatoria en los 50 estados y el Distrito de Columbia (28) y ofrece una oportunidad para la intervención temprana. La metodología de prueba diagnóstica generalmente comprende un hemograma completo junto con uno o más electroforesis de hemoglobina, isoelectroenfoque, cromatografía líquida de alto rendimiento y pruebas de ADN (22).

5 Anemia crónica y hemólisis

El eritrocito falciforme tiene una vida media más corta que el eritrocito normal y proviene de la inestabilidad de la HbS y los efectos de episodios repetidos de polimerización/despolimerización de la hemoglobina en la circulación. Esto afecta la permeabilidad iónica de la membrana, la viscosidad celular y la deformabilidad (20) y promueve el daño oxidativo de la membrana (29). Los pacientes con enfermedad de células falciformes son anémicos entre los 2 y 3 meses de edad y desarrollan síntomas y complicaciones asociadas con anemia crónica y hemólisis (22, 30) tal como enfermedad renal, trastornos oftálmicos, úlceras en las piernas, priapismo e hipertensión pulmonar (26, 31–37). Los valores de hemoglobina para pacientes con SCD varían de 6 a 10 g/dl y la molécula de hemoglobina S tiene una baja afinidad por el oxígeno. Los factores desencadenantes de la transfusión en pacientes son un valor de hemoglobina de 5 o menos o una caída precipitada de la hemoglobina de 2 g/dL o más. Generalmente, se administra transfusiones para restablecer los valores de hemoglobina a los niveles basales establecidos para cada paciente, ya que un hematocrito excesivo puede precipitar la drepanocitosis (38). Los pacientes con SCD son más susceptibles a la infección por parvovirus B19 que puede detener la eritropoyesis y llevar a una crisis de anemia aplásica (39).

Crisis de dolor vasooclusivo

20 La oclusión vascular es central para el curso clínico de SCD y probablemente implica tanto la microcirculación como la macrocirculación. La oclusión que ocurre en la microvasculatura puede culminar en episodios dolorosos agudos o crisis de dolor vasooclusivo. La crisis del dolor vasooclusivo es el marcador clínico de las oclusiones microvasculares y representa más del 90% de los ingresos hospitalarios de pacientes adultos con SCD. Es bien sabido que la polimerización de la hemoglobina S durante la desoxigenación y las células falciformes conduce a la obstrucción de la microvasculatura (40). Sin embargo, recientemente ha quedado claro que la polimerización de la hemoglobina S no es la única responsable de la vasooclusión. Ahora se ha demostrado que eventos tales como la lisis de eritrocitos falciformes, daño de la membrana celular y estrés oxidativo, daño isquémico repetido y lesión de microvasculatura debido a las interacciones adhesivas entre los eritrocitos falciformes y el endotelio que culminan en un ambiente proinflamatorio (41–43) En este ambiente de inflamación vascular crónica, se considera que la adherencia de los leucocitos, plaquetas y eritrocitos falciformes al endotelio de los vasos sanguíneos activados y entre sí es la principal causa del bloqueo de la microvasculatura y la crisis del dolor vasooclusivo (43–47). Factores adicionales tales como la rigidez de las células falciformes, aumento de la viscosidad sanguínea y vasoconstricción local también se han identificado como factores potencialmente contribuyentes al proceso de vasooclusión.

35 Los eventos vasooclusivos repetidos a largo plazo y las oclusiones que se producen en la macrovasculatura pueden causar complicaciones potencialmente mortales que llevan a daño y falla de órganos, accidente cerebrovascular y muerte (40). Hay una reducción de aproximadamente 20 a 30 años en la esperanza de vida en pacientes con enfermedad de células falciformes (48). El dolor crónico en la SCD no es solo una continuación del dolor de la vasooclusión: generalmente es secundario a una necrosis avascular del hueso en varias articulaciones (49). Los eritrocitos falciformes pueden quedar atrapados en el bazo lo que hace que se agrande y precipite la crisis de secuestro esplénico que causa anemia súbita y grave. La asplenia funcional deja a los pacientes susceptibles a la infección (18). El retraso del crecimiento óseo, las complicaciones renales (32), oftálmicas (33) y cerebrovasculares (que varían de un accidente cerebrovascular agudo clínicamente evidente hasta un infarto isquémico silente transitorio) (50) se consideran las principales consecuencias clínicas de la SCD y la lesión vasooclusiva (22). El síndrome de tórax agudo es otra complicación importante (51) y es una causa importante de morbilidad y mortalidad

45 Los episodios de dolor parecen desencadenarse por una serie de factores que incluyen frío, estrés y esfuerzo físico (38, 53). La frecuencia, gravedad, ubicación y duración de las crisis de dolor pueden variar considerablemente, incluso dentro de un subtipo de enfermedad específico. Los pacientes con enfermedad de células falciformes homocigótica y β^0 -talasemia de células falciformes tienen una mayor frecuencia de crisis de dolor vasooclusivo que los pacientes con hemoglobina SC y genotipo de β^+ -talasemia de células falciformes (54). Se cree que la gravedad de la enfermedad depende de una interacción compleja de factores genéticos, reológicos y hematológicos, así como de factores microvasculares y endoteliales. Las crisis comúnmente involucran dolor en la espalda, piernas, rodillas, brazos, pecho y abdomen (53). La frecuencia de la crisis y la gravedad del dolor varía considerablemente entre los pacientes y en el mismo paciente a lo largo del tiempo. Un estudio que evaluó las tasas de dolor en pacientes que varían de recién nacidos hasta 50 años indicó que el 5,2 por ciento de los pacientes con enfermedad de células falciformes tienen de tres a 10 episodios de dolor intenso cada año (54). En un estudio independiente, más del 30% de los pacientes con enfermedad de células falciformes en U. S. (aproximadamente 27.000 pacientes) tienen tres o más crisis de dolor por año (55). Además, un estudio reciente (PiSCES) que evaluó los problemas de calidad de vida

relacionados con la salud en pacientes con SCD indicó que la crisis del dolor podría ser significativamente subinformada entre los pacientes con SCD (56).

Terapias actuales para oclusión vascular

5 La oclusión vascular en pacientes con SCD se puede manifestar de múltiples maneras, que incluyen crisis de dolor vasooclusivo, síndrome torácico agudo, eventos cerebrovasculares y múltiples tipos de falla orgánica. Por lo tanto, las modalidades de tratamiento para la oclusión vascular dependen de la evolución clínica y la gravedad de la enfermedad y, en general, son sintomáticas o de naturaleza paliativa. La educación del paciente para evitar los factores iniciadores que precipitan la crisis del dolor vasooclusivo ha demostrado algún beneficio profiláctico. Los dos tratamientos sintomáticos más comunes son las transfusiones de sangre y los analgésicos. La mayoría de los
10 pacientes con SCD comúnmente tienen valores de hemoglobina de entre 6 y 10 g/dl y los valores de hemoglobina normalmente caen a menos 1 g por dL durante una crisis de dolor vasooclusivo. El dolor intenso que resulta de la crisis vasooclusiva se puede tratar con narcóticos, pero su uso es controvertido debido a las preocupaciones por adicción y tolerancia a los narcóticos. Otras complicaciones con el uso de narcóticos son la conducta de búsqueda de fármacos, sedación y depresión respiratoria. La administración de oxígeno se ha utilizado para tratar la crisis de dolor vasooclusivo a pesar de la falta de evidencia sólida que respalde su efectividad. La rehidratación también se
15 usa alguna vez durante las crisis de dolor vasooclusivo con algún beneficio (22, 38).

Se puede considerar el trasplante de médula ósea y puede ser curativo, pero su uso está restringido a un número limitado de pacientes y conlleva un alto riesgo de morbilidad y mortalidad (22).

20 La hidroxiurea (Droxia) es el único fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de crisis de dolor de SCD. Los mecanismos por los que produce sus efectos beneficiosos son inciertos, pero pueden implicar el aumento de los niveles de hemoglobina F en los eritrocitos, de este modo disminuye el nivel de polimerización de la hemoglobina S. La hidroxiurea es citotóxica, mielosupresora y teratogénica (57, 58) lo que implica un riesgo carcinogénico para los pacientes con SCD. Sin embargo, se desconocen los efectos a largo plazo sobre la toxicidad hematológica, el daño orgánico y la carcinogenicidad (59, 60).

25 En resumen, la mayoría de las terapias para crisis de dolor vasooclusivo en pacientes con SCD proporcionan alivio sintomático y no tratan la causa subyacente de esta afección debilitante. Hasta la fecha, solo una terapia ha sido aprobada por la FDA para el tratamiento de la crisis del dolor, por lo tanto, los pacientes con SCD representan una importante necesidad médica insatisfecha en una enfermedad potencialmente mortal con morbilidades graves.

P-selectina como un objetivo terapéutico para SCD

30 En SCD, como se indicó anteriormente, las interacciones entre los eritrocitos falciformes, plaquetas, leucocitos y la microvasculatura son procesos dependientes de P-selectina y producen vasooclusión y crisis dolorosa. Los estudios en ratones transgénicos manipulados genéticamente para expresar β hemoglobina S humana (β^S) han demostrado que la inhibición mediada por anticuerpos de la función de P-selectina puede prevenir y/o reducir la vasooclusión, lo que indica un potencial terapéutico para este objetivo. Además, los ratones que expresan la
35 hemoglobina β^S que carecen de P-selectina (debido a la supresión del gen) no sufren vasooclusión, lo que respalda adicionalmente el papel clave de esta molécula en esta morbilidad.

40 El estado hiperinflamatorio en pacientes con SCD se caracteriza por monocitos y endotelio vascular activados (61–63). Se demostró un fenotipo proinflamatorio similar en los ratones β^S en estado de reposo que exhiben niveles elevados de leucocitos y neutrófilos periféricos, un mayor número de leucocitos que circulan y adhieren, y reducen el volumen del flujo sanguíneo y las velocidades de los eritrocitos (64). Los ratones β^S fueron hipersensibles a la hipoxia/reoxigenación, lo que da como resultado una respuesta inflamatoria representada por un aumento significativo en el número de leucocitos adherentes y emigrados. Esta respuesta inflamatoria fue completamente bloqueada por un anticuerpo anti-P-selectina de ratón funcionalmente bloqueante, pero no por un anticuerpo anti-E-selectina de ratón funcionalmente bloqueante, lo que demuestra un papel crítico para la P-selectina en este
45 proceso.

La P-selectina cumple su papel central en el reclutamiento de leucocitos a sitios inflamatorios y trombóticos mediante la unión a su contrarreceptor, el ligando 1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL-1) (o un receptor tipo PSGL-1 en eritrocitos falciformes), que es una glicoproteína de tipo mucina expresada constitutivamente en leucocitos que incluyen neutrófilos, monocitos, plaquetas y en algunas células endoteliales (68). La última función fisiológica de las selectinas es promover la extravasación de leucocitos en los tejidos inflamados o dañados. La unión inicial de P-selectina en el endotelio a PSGL-1 en los leucocitos es esencial y central para este proceso. El mecanismo predominante para rodar y fijar los leucocitos al endotelio activado y a las plaquetas es la unión del leucocito PSGL-1 a la P-selectina en estas células (68, 69). PSGL-1 se une a P-, L- y E-selectina (70). La P-

selectina y SGP-3, un glicosulfopéptido modelado a partir del extremo N-terminal de PSGL-1, se han cocristalizado y se han identificado los residuos de contacto para la unión de lectina-ligando (71).

5 Las selectinas comparten motivos estructurales comunes que incluyen un dominio de lectina (o dominio de reconocimiento de carbohidrato), un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF), una serie variedad de repeticiones de consenso, un dominio de transmembrana y una cola citoplásmica (70). Como se señaló, la fijación y rodamiento inicial de los leucocitos está mediado por la interacción de P-selectina y PSGL-1. Por lo tanto, el bloqueo de la función de P-selectina mediante el uso de (1) anticuerpos anti-P-selectina, (2) anticuerpos anti-PSGL-1, (3) fragmentos de PSGL-1 o formas recombinantes de PSGL-1, (4) pequeñas moléculas que imitan el dominio de unión de PSGL-1, y (5) otras moléculas que alteran la unión de P-selectina a PSGL-1, pueden bloquear el rodamiento y fijación de los leucocitos y así evitar la adhesión firme a células endoteliales o plaquetas. Los ratones deficientes en P-selectina o PSGL-1 tampoco mantienen la fijación y rodamiento de leucocitos sobre las células endoteliales activadas (72, 74). La L-selectina cumple un papel dual, ya que se expresa constitutivamente en los leucocitos circulantes y puede iniciar una "unión secundaria" mediante la interacción con PSGL-1 en otros leucocitos (75). Este proceso lleva a un mayor reclutamiento de nuevos leucocitos en el área inflamada. La unión de L-selectina a PSGL-1 también cumple un papel en la orientación de los linfocitos a las vénulas de la vasculatura endotelial alta (HEV) en el sistema linfático secundario (76). La E-selectina está regulada en forma transcripcional y se expresa en células endoteliales activadas horas después de los eventos mediados por P-selectina. La E-selectina se puede unir a PSGL-1 con baja afinidad pero también se puede unir a otros ligandos. Los ratones knock-out transgénicos individuales para cada selectina han demostrado que estas moléculas poseen mecanismos de selectina compensatorios para la orientación y rodamiento de los leucocitos (77).

A la vista de lo anterior, existe una necesidad bien establecida de nuevos tratamientos, tales como anticuerpos, que se dirigen a la P-selectina como un medio para tratar enfermedades inflamatorias y trombóticas mediante la alteración de la unión de P-selectina y PSGL-1. Por lo tanto, un objetivo de los conceptos de la invención descritos en la presente es bloquear la unión de la P-selectina a PSGL-1, de este modo se bloquea la adherencia de las células sanguíneas que contribuyen a la vasooclusión en SCD y otros trastornos trombóticos como se discute en otra parte de la presente.

Compendio de la descripción

Los conceptos de la invención descritos en la presente se refieren a anticuerpos de "función dual" que se unen específicamente a P-selectina y que no solo bloquean la unión de PSGL-1 a P-selectina, sino que también disocian complejos de P-selectina/PSGL-1 preformados. La presente descripción describe un dominio de unión de anticuerpo desconocido hasta ahora (un epítipo conformacional) dentro del dominio de lectina (por ejemplo, dominio de reconocimiento de carbohidratos, CRD) de P-selectina al cual se unen anticuerpos de función dual (que pueden ser por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanos o humanizados o fragmentos de estos). Los conceptos de la invención descritos en la presente están por lo tanto dirigidos a anticuerpos anti-P-selectina o fragmentos de estos que se unen al epítipo conformacional descrito en la presente y que tienen una función dual en (1) bloquear la unión de PSGL-1 a P-selectina, y (2) causar la disociación de complejos P-selectina/PSGL-1 preformados. Los conceptos de la invención descritos en particular se dirigen al uso de anticuerpos anti-P-selectina de función dual o fragmentos de anticuerpos descritos en la presente en tratamientos para afecciones inflamatorias, trombóticas u otras afecciones o trastornos en primates (que incluyen seres humanos) que involucran adhesión de plaquetas, eritrocitos falciformes, leucocitos, linfocitos y/o células endoteliales, donde la afección o trastorno comprende o se asocia (pero no se limita a) a al menos uno de la crisis de dolor vasooclusivo de células falciformes, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y enteritis), artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, osteoartritis y artritis psoriásica), rechazo de injertos, enfermedad de injerto contra huésped, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, psoriasis, dermatitis, sepsis, nefritis, lupus eritematoso, esclerodermia, rinitis, anafilaxia, diabetes, esclerosis múltiple, aterosclerosis, trombosis, metástasis tumoral, reacciones alérgicas, tiroiditis, lesión por reperfusión isquémica (por ejemplo, debido a infarto de miocardio, accidente cerebrovascular o trasplante de órgano) y afecciones asociadas con traumatismo extenso o inflamación crónica, tal como, por ejemplo, hipersensibilidad retardada tipo IV, asociada por ejemplo con infección por bacilos tuberculosos, o síndrome de respuesta inflamatoria sistemática o falla multiorgánica. De manera importante, el uso de tales anticuerpos de función dual como se describe en la presente para tratar estas enfermedades inflamatorias permite no solo la prevención de la inflamación, sino que también proporciona un mecanismo para tratar procesos de enfermedad inflamatoria en curso en los que los anticuerpos pueden disociar P-selectina/PSGL-1 preformada. Por ejemplo, en el caso de la crisis de dolor vasooclusivo de células falciformes, los anticuerpos que tienen actividad de función dual no solo inhiben o evitan los eventos vasooclusivos futuros, sino que también permiten el tratamiento de la vasooclusión en curso. Otras formas de realización de los conceptos de la invención descritos en la presente serán evidentes en la descripción detallada a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una comparación de homología a nivel de aminoácidos de P-selectina humana y de ratón que indica la ubicación de los dominios de lectina, EGF, CR1 y CR2 (la transición entre dominios está indicada por las flechas). Los dominios conformacionales no lineales A, B, C1, D, E1, C2, E2, C3 y F se indican con cuadros discontinuos. Las diferencias de aminoácidos están indicadas en negrita.

5 La Figura 2 muestra datos de unión de la quimera P-selectina BIACORE de dos etapas para los anticuerpos anti-P-selectina G1, G3, G4 y G5 que se unen a SEQ ID NO: 1-4, 7-10, 18 y 19. Cabe señalar que la unión del anticuerpo G5 en el ensayo de unión en dos etapas de Biacore solo se realizó para las SEQ ID NOs: 1, 2, 18 y 19. G4 es un nuevo anticuerpo anti-P-selectina monoclonal de ratón que se produce mediante células de hibridoma depositadas como Designación de depósito de patente PTA-12154 en la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA20110-2209, un depósito público reconocido.

10 La Figura 3 muestra los sensogramas de BIACORE que demuestran el bloqueo de la interacción de P-selectina con PSGL-1 usando anticuerpos anti-P-selectina G1, G3, G4 y hSel001 (hSel001, también conocido como SelG1, es una forma humanizada de G1) por los métodos descritos en la presente. Se demostró que G1, G3, G4 y hSel001 bloquean la interacción de P-selectina con el glicosulfopéptido GSP-6, un PSGL-1 mimético. G5 se une a la P-selectina, pero no se bloqueó. El control es la unión en estado estacionario de P-selectina a GSP-6.

15 La Figura 4 muestra los sensogramas BIACORE que demuestran la disociación del complejo P-selectina/PSGL-1 preformado después de la exposición a anticuerpos anti-P-selectina de función dual G1, G4 y Shel001. PSGL-1 está representado por el péptido GSP-6, un mimético de PSGL-1. El aumento inicial de RU muestra la unión de P-selectina a biotina-GSP-6 acoplada a un chip BIACORE recubierto con estreptavidina. Una vez que se alcanzó la unión en estado estacionario del complejo P-selectina/GSP-6 (es decir, después de que la disociación normal del complejo había alcanzado casi el equilibrio), se inyectaron anticuerpos de prueba y se evaluaron las propiedades de disociación. G5 se unió al complejo preformado, pero no causó su disociación. G3 no se unió o disoció el complejo P-selectina/PSGL-1 preformado. G1, G4 y Shel001 se unieron y provocaron la disociación del complejo P-selectina/GSP-6 preformado, lo que indica nuevas capacidades de función dual.

20 La Figura 5 muestra una representación en 3-D de una molécula de P-selectina humana con GSP-6 que se une a esta. Los dominios de Lectina y EGF están demarcados por una línea discontinua. La región de unión 1 identifica un epítipo conformacional del Clúster A que es distal al dominio de unión a lectina/ligando. El anticuerpo de prueba G1 se unió a la región 1, Clúster A. G4 y hSel001 también se unieron a la región 1, Clúster A.

25 La Figura 6 muestra gráficos de resultados de ensayos de rosamiento in vitro basados en células bajo flujo de neutrófilos humanos en P-selectina de baja y alta densidad. Los resultados demuestran el bloqueo y/o disociación del complejo P-selectina/PSGL-1 preformado y la posterior liberación de neutrófilos después de la exposición a los anticuerpos G1, G3, G4 y hSel001. Los anticuerpos se introdujeron en concentraciones equivalentes de 20 µg/ml durante el estudio. Hay un tiempo de retraso de aproximadamente 1 minuto antes de que el anticuerpo llegue a la cámara debido al volumen muerto del sistema. En intervalos de 1 minuto a partir de este momento, se contaron las células que quedaban unidas y se expresaron como % de células unidas. Los paneles (A) y (C) muestran el rodamiento de neutrófilos a velocidades promedio de 5 µm/s y 6,5 µm/s respectivamente en la P-selectina de membrana de baja densidad (50 sitios/µm²). Los paneles (B) y (D) muestran el rodamiento de neutrófilos a una velocidad promedio de 1 µm/s en la P-selectina de alta densidad (380 sitios/µm²).

30 La Figura 7 es un sensograma que muestra la cinética para la unión de G1 y hSel001 a P-selectina en una única concentración de P-selectina.

Descripción detallada

A menos que se defina lo contrario en la presente, los términos científicos y técnicos utilizados en conexión con los conceptos de la invención descritos en la presente tendrán los significados que comúnmente comprenden los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, y química e hibridación de proteína y oligonucleótidos o polinucleótidos descritas en la presente son las bien conocidas y usadas comúnmente en la técnica. Se usan técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en la presente. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Ver, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) y Coligan et al. Current Protocols in Immunology (Current Protocols, Wiley Interscience (1994)), que se

incorporan en la presente por referencia. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritas en la presente son las bien conocidas y utilizadas comúnmente en la técnica. Las técnicas estándar se usan para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes.

5 Como se utiliza de acuerdo con la presente descripción, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

10 El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con la frase "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es coherente con el significado de "uno" o más, "al menos uno" y "uno o más de uno". El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiera solo a alternativas o las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la descripción respalda una definición que se refiere solo a alternativas e "y/o". A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método que se emplea para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos del estudio. Se entenderá que el uso del término "al menos uno" incluye tanto uno como cualquier cantidad mayor de uno, que incluye, pero sin limitación, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, etc. La frase "al menos uno" se puede extender hasta 100 o 1000 o más, de acuerdo con el término al cual está adjunto; además, las cantidades de 100/1000 no deben considerarse limitantes, ya que los límites más altos también pueden producir resultados satisfactorios.

15 El término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método que se emplea para determinar el valor y/o la variación que existe entre los sujetos del estudio.

20 Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las palabras "que comprende" (y cualquier forma de comprender, tales como "comprender" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de tener, como "tener" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de incluir, como "incluye" e "incluir") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, como "contiene" y "contener") son inclusivos o abiertos y no excluyen elementos o etapas del método no enumerados adicionales.

25 La frase "o combinaciones de estos" tal como se usa en la presente se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los artículos enumerados que preceden al término. Por ejemplo, "A, B, C, o combinaciones de estos" se considera que incluyen al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente las combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, como BB, AAA, MB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, y así sucesivamente. El profesional experto entenderá que, por lo general, no existe un límite en el número de artículos o términos en cualquier combinación, a menos que sea evidente de otro modo por el contexto.

30 Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. El término "polipéptido", como se usa en la presente, es un término genérico para referirse a proteína nativa, fragmentos de proteína o análogos de una secuencia polipeptídica. Por lo tanto, la proteína nativa, fragmentos de proteína y los análogos son especies del género polipeptídico. El término "péptido/polipéptido/proteína aislado" como se usa en la presente se refiere a un péptido/polipéptido/proteína de ADNc, ARN recombinante, u origen sintético o alguna combinación de estos, que en virtud de su origen, o fuente de derivación, el "péptido/polipéptido/proteína aislado": (1) no está asociado con péptidos/polipéptidos/proteínas que se encuentran en la naturaleza, (2) está libre de otros péptidos/polipéptidos/proteínas de la misma fuente, por ejemplo, libres de proteínas murinas, (3) se expresa en una célula de una especie diferente, y/o (4) no se produce en la naturaleza.

35 Como se usa en la presente, el término "aminoácido" abarca todas las moléculas, ya sean naturales o sintéticas, que incluyen tanto una funcionalidad amino como una funcionalidad ácida y que se pueden incluir en un polímero de aminoácidos naturales. Los ejemplos de aminoácidos incluyen aminoácidos naturales; análogos, derivados y congéneres de estos; análogos de aminoácidos que tienen cadenas laterales variantes; y todos los estereoisómeros de cualquiera de los anteriores. Cuando se usa en la presente, el término "aminoácido de ratón" se refiere a un residuo de aminoácido que se encuentra en P-selectina de ratón, pero no se encuentra en la posición correspondiente en P-selectina humana. Cuando se usa en la presente, el término "aminoácido humano" se refiere a un residuo de aminoácido que se encuentra en la P-selectina humana, pero no se encuentra en la posición correspondiente en la P-selectina de ratón.

40 Como se usa en la presente, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Ver Immunology—A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales,

- aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α,α -disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de los conceptos de invención descritos y reivindicados en la presente. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxi-prolina, α -carboxiglutamato, ϵ -N, N, N-trimetilisina, ϵ -N-acetilsina, O-fosfo-serina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxi-prolina). En la notación polipeptídica usada en la presente, la dirección izquierda es la dirección amino terminal y la dirección derecha es la dirección carboxi-terminal, de acuerdo con el uso y la convención estándar.
- Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente. Se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de estos. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: regiones codificadoras o no codificadoras de un gen o fragmento de gen, loci (locus) definidos del análisis de unión, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos y análogos de nucleótidos metilados. Si está presente, se pueden impartir modificaciones a la estructura de nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente, tal como mediante conjugación con un componente de marcación. Los términos "ácido nucleico aislado" y "polinucleótido aislado" se usan de manera indistinta; un ácido nucleico o polinucleótido se considera "aislado" si: (1) no está asociado con la totalidad o una porción de un polinucleótido en el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está unido a un polinucleótido al que pertenece no está unido en la naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande,
- El término "vector", como se usa en la presente, está destinado a referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN circular de cadena dual en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped después de la introducción en la célula huésped, y de ese modo se pueden replicar junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes. Dichos vectores se denominan en la presente "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión").
- El término "natural" tal como se usa en la presente como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polinucleotídica o polipeptídica que está presente en un organismo (que incluyen virus) que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionalmente por el hombre en el laboratorio o de otra manera es natural. El término "natural" se puede usar indistintamente en la presente con el término "nativo",
- El "rodamiento de leucocitos", como se usa en la presente, incluye adhesión débil de leucocitos a células endoteliales de vasos sanguíneos y el rodamiento de leucocitos a lo largo de células endoteliales de vasos sanguíneos antes de la adhesión firme y la trans migración de leucocitos al tejido endotelial. Después del rodamiento de los leucocitos, estos leucocitos adherentes pueden migrar a través del endotelio y destruir el tejido isquémico durante la reperfusión. Por consiguiente, la reducción del rodamiento de leucocitos produce una reducción del daño a los tejidos y órganos provocada por respuestas inflamatorias agudas.
- Como se usa en la presente, un "antagonista de P-selectina" incluye cualquier agente que sea capaz de antagonizar P-selectina, por ejemplo, mediante la inhibición de la interacción entre P-selectina y un ligando-1 de la glicoproteína P-selectina, por ejemplo, mediante la inhibición de las interacciones de P-selectina que expresan células endoteliales y plaquetas activadas con leucocitos que expresan PSGL-1.
- El término "aislado" o "purificado" se refiere a una molécula que está sustancialmente libre de su ambiente natural y es la especie predominante presente (por ejemplo, sobre una base molar) tal como más del 50% de la composición. Por ejemplo, una proteína aislada está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas de la fuente celular o tisular de la que se derivó. El término también se refiere a preparaciones en las que la proteína aislada es al menos 60% (p/p) puro, o al menos 70% (p/p) puro; o al menos 75% (p/p) puro; o al menos 80% (p/p) puro; o al menos 85% (p/p) puro, o al menos 90% (p/p) puro, o al menos 92% (p/p) puro, o al menos 95% (p/p) puro, o al menos 96% (p/p) puro, o al menos 97% (p/p) puro, o al menos 98% (p/p) puro, o al menos 99% (p/p) puro, o 100% (p/p) puro. En algunas formas de realización, la molécula aislada es suficientemente pura para las composiciones farmacéuticas.

5 La actividad "inhibitorias" se refiere a una reducción en una actividad de P-selectina por un inhibidor de P-selectina (tal como un anticuerpo o fragmento de este), con relación a la actividad de P-selectina en ausencia del mismo inhibidor. Un anticuerpo neutralizante puede reducir una o más actividades de P-selectina. Por ejemplo, la reducción de la actividad (por ejemplo, unión de P-selectina a PSGL-1) es con preferencia al menos aproximadamente 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95%, o superior. En otro ejemplo, la actividad disociativa de un anticuerpo o fragmento de función dual (es decir, el porcentaje de complejo de P-selectina/PSGL-1 preformado que puede provocar la disociación) puede ser al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o superior.

10 El término "inhibidor de P-selectina" cuando se usa en la presente incluye cualquier agente, tal como, por ejemplo, un anticuerpo neutralizante, capaz de inhibir la actividad, expresión, procesamiento, unión, o localización de la superficie celular de P-selectina. Se dice que tales inhibidores "inhiben", "neutralizan" o "reducen" la actividad biológica de la P-selectina.

15 El término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de una molécula biológicamente activa o conjugado o derivado de esta suficiente para exhibir un efecto terapéutico detectable con preferencia sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación y respuesta alérgica) acorde con una relación de beneficio/riesgo razonable cuando se usa de la manera de los conceptos de invención descritos en la presente. La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a compuestos y composiciones que son adecuados para la administración a seres humanos y/o animales sin efectos secundarios adversos indebidos tales como toxicidad, irritación y/o una respuesta alérgica acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Los conceptos de invención descritos en la presente se pueden diseñar para proporcionar una liberación retardada, controlada o sostenida usando técnicas de formulación que son bien conocidas en la técnica.

20 El término "epitopo" se refiere a un determinante antigénico en un polipéptido que interactúa con un sitio de unión al antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida tal como paratopo. Los epítopos pueden ser lineales o conformacionales. Un epitopo conformacional es producido por aminoácidos espacialmente yuxtapuestos de diferentes segmentos de una cadena polipeptídica lineal.

25 El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, generalmente dirigidos contra un sitio epitópico único. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales convencionales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque, en una forma de realización, se sintetizan mediante el cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular.

Anticuerpos

40 Las moléculas de anticuerpo pertenecen a una familia de proteínas plasmáticas llamadas inmunoglobulinas, cuyo bloque de construcción básico, el pliegue o dominio de inmunoglobulina, se usa en diversas formas en muchas moléculas del sistema inmune y otros sistemas de reconocimiento biológico. Una inmunoglobulina típica tiene cuatro cadenas polipeptídicas, que contienen una región de unión al antígeno conocida como región variable y una región no variable conocida como la región constante.

45 Los anticuerpos nativos y las inmunoglobulinas son usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150,000 daltons, compuestas de dos cadenas livianas (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena liviana está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y liviana también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena liviana tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena liviana está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena liviana está alineado con el dominio variable de la cadena pesada.

55 De acuerdo con las secuencias de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen al menos cinco clases principales de

5 inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas se pueden dividir en subclases (isotipos), por ejemplo IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ e IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ), respectivamente. Las cadenas livianas de los anticuerpos se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en función de las secuencias amino de su dominio constante. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

10 El término "variable" en el contexto del dominio variable de anticuerpos se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos. Los dominios variables son para la unión y determinan la especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos por cadena llamados regiones determinantes de complementariedad (CDR), también conocidas como regiones hipervariables, tanto en la cadena liviana como en los dominios variables de la cadena pesada. En la mayoría de los casos, tres CDR están presentes en una región variable de cadena liviana (CDRL1, CDRL2 y CDRL3) y tres CDR están presentes en una región variable de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3). Las CDR contribuyen a la actividad funcional de una molécula de anticuerpo y están separadas por secuencias de aminoácidos que comprenden regiones del armazón o estructura. Entre las diversas CDR, las secuencias de CDR3, y particularmente CDRH3, son las más diversas y, por lo tanto, tienen la contribución más fuerte a la especificidad del anticuerpo. Hay al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de la secuencia de especies cruzadas (es decir, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institute of Health, Bethesda, Md. (1987), y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Chothia et al., *Nature*, 342: 877 (1989), incorporado como referencia en su totalidad).

25 Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y livianas nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran parte una configuración de hoja β , conectadas por tres CDR, que forman bucles conectores, y en algunos casos forman parte de, la estructura de hoja β . Las CDR en cada cadena liviana y pesada se mantienen juntas en proximidad cercana por las regiones FR y contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente del anticuerpo.

30 Un anticuerpo de los conceptos de la invención descritos en la presente por lo tanto puede estar en cualquiera de una variedad de formas, que incluyen una inmunoglobulina completa, un fragmento de anticuerpo tal como Fv, Fab y fragmentos similares, un anticuerpo de cadena simple que incluye las regiones determinantes de complementariedad del dominio variable (CDR) y formas similares, todas las cuales caen bajo el término amplio "anticuerpo", como se usa en la presente. En formas de realización preferidas, en el contexto tanto de los métodos terapéuticos como de detección descritos a continuación, se usa un anticuerpo o fragmento de este que es inmunoespecífico para un antígeno o epítipo de los conceptos de la invención descritos en la presente como se describe en este documento.

40 El término "fragmento de anticuerpo" como se usa en la presente se refiere a una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión al antígeno o variable. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, denominados el fragmento Fab, cada uno con un sitio de unión al antígeno único, y un fragmento "Fc" residual, denominado así por su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F (ab')₂ que tiene dos fragmentos de unión al antígeno que son capaces de reticular el antígeno, y otro fragmento residual (que se denomina pFc'). Los fragmentos adicionales pueden incluir diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena simple y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Como se usa en la presente, "fragmento funcional" con respecto a los anticuerpos, se refiere a los fragmentos Fv, F(ab) y F(ab')₂. Los fragmentos de los anticuerpos de los conceptos de la invención descritos en la presente pueden ser tan pequeños como aproximadamente por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 a 35, a 40, a 45, a 50, a 75, a 100, o a 150 a 200 a 250 (inclusive todos) o más aminoácidos.

Algunos tipos de fragmentos de anticuerpos se definen de la siguiente manera:

Fab es el fragmento que contiene un fragmento de unión al antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo. Se puede producir un fragmento Fab por digestión de anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena liviana intacta y una porción de una cadena pesada.

Fab' es el fragmento de una molécula de anticuerpo que se puede obtener mediante el tratamiento del anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, un rendimiento de una cadena liviana intacta y una porción de la cadena pesada. Se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo.

5 Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab mediante la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo.

(Fab')₂ es el fragmento de un anticuerpo que se puede obtener mediante el tratamiento del anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior. F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos por dos enlaces disulfuro.

10 Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión de antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena liviana en una asociación no covalente, estrecha (dímero VH-VL). En esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión al antígeno para el anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

15 Un anticuerpo de cadena simple (SCA) se define en la presente como una molécula manipulada genéticamente que contiene la región variable de la cadena liviana, la región variable de la cadena pesada, unida por un ligador polipeptídico adecuado como una molécula de cadena simple fusionada genéticamente. Tales anticuerpos de cadena simple también se denominan fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena simple" o "sFv" o "scFv".
20 Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno.

25 La solicitud revela anticuerpos que se unen específicamente a la P-selectina humana. Las CDR en tales anticuerpos no están limitadas a las secuencias específicas de VH y VL y pueden incluir variantes de estas secuencias que conservan la capacidad de bloquear y disociar la unión de P-selectina a PSGL-1. Tales variantes pueden ser producidas por un experto usando técnicas bien conocidas en la materia. Por ejemplo, las sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos se pueden realizar en las FR y/o en las CDR como se describe en otra parte de la presente. Si bien los cambios en las FR se diseñan generalmente para mejorar la estabilidad y disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo, los cambios en las CDR se diseñan típicamente para aumentar la afinidad del anticuerpo por su objetivo. Las variantes de FR también incluyen alotipos de inmunoglobulina naturales. Dichos cambios que aumentan la afinidad se pueden determinar empíricamente mediante técnicas de rutina que implican alterar la CDR y probar el anticuerpo de afinidad para su objetivo.

30 Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones conservadoras de aminoácidos dentro de cualquiera de las CDR descritas. Se pueden hacer diversas alteraciones de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (78). Estos incluyen, pero sin limitación, secuencias de nucleótidos que se alteran mediante la sustitución de diferentes codones que codifican un residuo de aminoácido idéntico o funcionalmente equivalente ("sustituciones conservadoras") dentro de la secuencia, de este modo se produce un cambio "silencioso". Por ejemplo, los aminoácidos no polares que se pueden sustituir de forma conservadora entre sí incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares que se pueden sustituir de forma conservadora entre sí incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) que se pueden sustituir de forma conservadora entre sí incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) que se pueden sustituir de forma conservadora entre sí incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Los sustitutos de un aminoácido dentro de la secuencia también se pueden seleccionar de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido.

35 Los derivados y análogos de anticuerpos de los conceptos de la invención descritos en la presente se pueden producir mediante diversas técnicas bien conocidas en la materia, que incluyen métodos recombinantes y sintéticos (79, 80). Los anticuerpos en los que las secuencias de CDR difieren solo de forma insustancial y conservadora de aquellas de las regiones variables de los anticuerpos anti-P-selectina tales como hSel001, que se discuten en más detalle a continuación, también están abarcadas dentro del alcance de esta invención. Como se indicó anteriormente, típicamente, un aminoácido se sustituye con un aminoácido relacionado que tiene características de carga, hidrofobicidad o estereoquímica similares. Tales sustituciones pueden estar dentro de las habilidades ordinarias de un profesional- Además, un experto en la materia puede apreciar que se pueden realizar cambios en las FR sin afectar negativamente a las propiedades de unión de un anticuerpo. Los cambios en la FR incluyen, pero sin limitación, humanizar un derivado no humano o manipular genéticamente ciertos residuos estructurales que son importantes para el contacto con antígenos o para estabilizar el sitio de unión, por ejemplo, cambiar la clase o subclase de la región constante, cambiar residuos de aminoácidos que podrían alterar la función efectora tal como la unión al receptor de Fc.

Los conceptos de la invención descritos en la presente en una forma de realización están dirigidos a anticuerpos que se unen específicamente a P-selectina en donde las CDR de un anticuerpo original no humano se injertan en FR de anticuerpos aceptores humanos, un proceso llamado humanización del anticuerpo. El proceso de humanización está diseñado para reducir la inmunogenicidad de un anticuerpo no humano mientras se mantiene la mayor afinidad original posible. En una forma de realización, las FRceptoras de cadenas pesadas y/o livianas humanas son secuencias de aminoácidos no mutadas de las secuencias de la línea germinal de las que se derivaron. Se puede esperar que tales FR de línea germinal no fueran inmunogénicas, considerando que estas secuencias están presentes en todos los seres humanos antes de la reordenación del anticuerpo y la maduración de afinidad. Además, los residuos de aminoácidos de dichas FR de anticuerpos, particularmente los residuos adyacentes o situados cerca de las CDR, pueden requerir sustituciones de aminoácidos para conservar mejor la afinidad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, cuando los aminoácidos clave difieren entre una FR variables del anticuerpo monoclonal murino original y el aceptor de FR variable humana, los aminoácidos de FR humanos se pueden sustituir con los residuos de aminoácidos de ratón en esas posiciones. No obstante, se prevé que las FR de la cadena pesada y/o liviana pueden no contener sustituciones de aminoácidos y los anticuerpos derivados de dicha humanización pueden poseer todavía gran parte, si no toda, la afinidad de unión del anticuerpo original. Además, los anticuerpos de la invención pueden contener FR de VH y/o VL humanas que tienen una secuencia puramente de línea germinal y también carecen de sustituciones en una o ambas de estas secuencias FR.

Como se usa en la presente, la "afinidad" del anticuerpo por P-selectina o el epítipo conformacional del mismo se caracteriza por su K_d , o constante de disociación. Una afinidad más fuerte está representada por una K_d menor, mientras que una afinidad más débil está representada por una K_d más alta. Como tal, un anticuerpo de la presente invención con preferencia tiene una afinidad por un epítipo conformacional de P-selectina representada por una $K_d \leq 1000$ nM, o ≤ 500 nM, o ≤ 100 nM, o ≤ 50 nM, o con más preferencia por una $K_d \leq 25$ nM, y aún con más preferencia por una $K_d \leq 10$ nM, e incluso con más preferencia por una $K_d \leq 5$ nM, o ≤ 1 nM, o $\leq 0,1$ nM.

Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo "homólogo", como se usa en la presente, significa que una secuencia de aminoácidos relevante (con preferencia, por ejemplo en las CDRs y/o dominios variables VH y/o VL) de una proteína o un péptido es al menos 50% idéntica, al menos 60% idéntica, al menos 70% idéntica, al menos 75% idéntica, al menos 80% idéntica, al menos 85% idéntica, al menos 90% idéntica, al menos 91% idéntica, al menos 92% idéntica, al menos 93% idéntica, al menos 94% idéntica, al menos 95% idéntica, al menos 96% idéntica, al menos 97% idéntica, al menos 98% idéntica, al menos 99% idéntica, al menos 99,5% idéntica, o 100% idéntica a una secuencia dada. A modo de ejemplo, tales secuencias pueden ser variantes derivadas de diversas especies, o la secuencia homóloga puede producirse de forma recombinante. La secuencia se puede derivar de la secuencia dada por truncamiento, supresión, sustitución o adición de aminoácidos. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina mediante algoritmos de alineación estándar, tales como, por ejemplo, la herramienta de alineamiento local básico (BLAST) y otros algoritmos de alineamiento y métodos de la técnica (81-84).

La preparación de anticuerpos monoclonales es convencional y bien conocida por los expertos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar y purificar a partir de cultivos de hibridoma mediante una variedad de técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con Proteína A Sefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico. Como alternativa a la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, se puede identificar y aislar un anticuerpo monoclonal anti-P-selectina mediante el análisis de una biblioteca inmunoglobulina recombinante combinatoria (por ejemplo, una biblioteca de despliegue en fagos de anticuerpos) con los epítopos conformacionales descritos en la presente respectivamente para aislar de ese modo los miembros de la biblioteca de inmunoglobulina que se unen a la P-selectina de acuerdo con la presente invención. Los kits para generar y analizar bibliotecas de despliegue en fagos están disponibles comercialmente (por ejemplo, el Sistema de anticuerpo del fago recombinante de Pharmacia, Catálogo N.º 27-9400-01, y el Kit de despliegue en fagos Stratagene SurJZAPTM, Catálogo N.º 240612).

Los métodos de manipulación in vitro e in vivo de anticuerpos monoclonales son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein (85), o se pueden preparar por métodos recombinantes, por ejemplo, como se describe por ejemplo, en la patente U. S. N.º 4.816.567.

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

Los métodos para preparar anticuerpos de los conceptos de la invención descritos en la presente que se unen con alta afinidad a la P-selectina humana o a sus epítopos conformacionales como se describen en la presente pueden comprender transfectar una célula con un constructo de ADN, el constructo comprende una secuencia de ADN que codifica al menos una porción de los anticuerpos específicos anti-P-selectina neutralizantes de la invención, cultivar

la célula en condiciones tales que la proteína del anticuerpo sea expresada por la célula y aislar la proteína del anticuerpo.

5 Con preferencia, la región constante se ha modificado para modular (es decir, reducir o aumentar) la función efectora como se observa en otra parte en comparación con la función efectora de una región Fc de la cadena pesada de la inmunoglobulina tipo salvaje. En diversas formas de realización, la región constante de IgG tiene una función efectora reducida, o alternativamente tiene una función efectora aumentada. La función efectora de Fc incluye, por ejemplo, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis, citotoxicidad dependiente de complemento y función de la vida media o tasa de depuración. La secuencia de aminoácidos de IgG del dominio Fc se puede alterar para afectar la unión a los receptores Fc gamma (y, por tanto, las funciones de ADCC o fagocitosis), o para alterar la interacción con el sistema del complemento (función de citotoxicidad dependiente del complemento).

10 En una forma de realización, el anticuerpo comprende una región constante o porción Fc que tiene afinidad baja o nula por al menos un receptor Fc. En una forma de realización alternativa, el segundo polipéptido tiene afinidad baja o nula por la proteína del complemento C1q. En general, una función efectora de un anticuerpo se puede alterar mediante la alteración de la afinidad del anticuerpo por una molécula efectora tal como un receptor de Fc. La afinidad de unión generalmente variará mediante la modificación del sitio de unión de la molécula efectora. La descripción de las modificaciones de IgG que alteran la interacción con moléculas efectoras tales como los receptores de Fc se puede encontrar, por ejemplo, en las patentes U. S. Nros 5.624.821 y 5.648.260.

15 Las proteínas del anticuerpo de los conceptos de la invención descritos en la presente se pueden producir usando técnicas bien conocidas en la materia. Por ejemplo, las proteínas de anticuerpo se pueden producir de forma recombinante en las células (79, 86).

20 Para la producción recombinante, una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de anticuerpo se inserta en un vehículo de expresión apropiado, tal como un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificadora insertada. El vehículo de expresión se transfecta a continuación en una célula objetivo adecuada que expresará el péptido. Las técnicas de transfección conocidas en la materia incluyen, pero sin limitación, precipitación con fosfato de calcio (87) y electroporación (88). Se puede utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión del huésped para expresar las proteínas de anticuerpos descritas en la presente con preferencia, que incluyen las células eucariotas.

25 La solicitud revela ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos descritos o habilitados de otro modo en la presente. Los ácidos nucleicos pueden comprender ADN o ARN y pueden ser total o parcialmente sintéticos o recombinantes. La referencia a una secuencia de nucleótidos tal como se expone en la presente abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada, y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que U es sustituido por T, a menos que el contexto requiera lo contrario.

30 En otra forma de realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos revelados en la presente solicitud también comprenden secuencias de nucleótidos que son, por ejemplo, al menos 50% idénticas a las secuencias descritas en la presente. También se contemplan formas de realización en las que una secuencia es al menos 60% idéntica, al menos 70% idéntica, al menos 75% idéntica, al menos 80% idéntica, al menos 85% idéntica, al menos 90% idéntica, al menos 91% idéntica, al menos 92% idéntica, al menos 93% idéntica, al menos 94% idéntica, al menos 95% idéntica, al menos 96% idéntica, al menos 97% idéntica, al menos 98% idéntica, al menos 99% idéntica, o al menos 99,5% idéntica, a una secuencia descrita en la presente y/o que hibrida con una secuencia descritos en la presente en condiciones de alta o moderada rigurosidad. El porcentaje de identidad se puede determinar por inspección visual y cálculo matemático.

35 La rigurosidad, que incluye "alta rigurosidad", como se usa en la presente, incluye condiciones fácilmente determinadas por el experto en la técnica sobre la base de, por ejemplo, la longitud del ADN. En general, tales condiciones se definen como condiciones de hibridación de formamida 50%, 6xSSC a 42 °C (u otra solución de hibridación similar, como, por ejemplo, solución de Stark, en formamida 50% a 42 °C), y con lavado a aproximadamente 68 °C con 0,2xSSC, SDS 0,1%. El experto en la materia reconocerá que la temperatura y la concentración de sal de la solución de lavado se pueden ajustar según sea necesario de acuerdo con factores tales como la longitud de la sonda.

40 "Rigurosidad moderada", como se usa en la presente, incluye condiciones que pueden ser fácilmente determinadas por los expertos en la técnica sobre la base, por ejemplo, de la longitud del ADN. Las condiciones básicas están expuestas en Sambrook et al. (79) e incluyen el uso de una solución de prelavado para los filtros de nitrocelulosa 5xSSC, SDS 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), condiciones de hibridación de formamida 50%, 6xSSC a 42 °C (u otra solución de hibridación similar, tal como solución de Stark, en formamida 50% a 42 °C), y condiciones de lavado de 60 °C, 0,5xSSC, SDS 0,1%.

Los anticuerpos monoclonales en la presente incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente U. S. N.º 4.816.567).

Los métodos para preparar fragmentos de anticuerpos también son conocidos en la técnica (89). Los fragmentos de anticuerpos de la presente invención se pueden preparar por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en *E. coli* del ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpo, como se indicó anteriormente, se pueden obtener por digestión con pepsina o papaína de métodos convencionales de anticuerpos completos. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden producir por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento también se puede escindir usando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de los enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' de 3,5S. Alternativamente, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en la patente U. S. N.º 4.036.945 y la patente U. S. N.º 4.331.647, y las referencias contenidas en ella.

También se pueden usar otros métodos de escisión de anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena liviana-pesada monovalentes, escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al epítipo conformacional que es reconocido por el anticuerpo intacto. Por ejemplo, los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas VH y VL. Esta asociación puede ser no covalente o las cadenas variables pueden estar unidas por un enlace disulfuro intermolecular o reticular por productos químicos tales como glutaraldehído. Con preferencia, los fragmentos Fv comprenden cadenas VH y VL conectadas por un ligador peptídico. Estas proteínas de unión al antígeno de cadena simple (sFv) se preparan mediante la construcción de un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que se introduce posteriormente en una célula huésped tal como *E. coli*. Las células huésped recombinantes sintetizan una cadena polipeptídica única con un péptido ligador que une con puente los dos dominios V. Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una CDR única. Los péptidos CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") a menudo participan en el reconocimiento y unión del antígeno. Los péptidos de CDR se pueden obtener mediante la clonación o construcción de genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable del ARN de las células productoras de anticuerpos.

Los anticuerpos revelados en la presente comprenden anticuerpos manipulados genéticamente que incluyen formas completamente humanas y humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, primate o murino). Tales anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de estas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión al antígeno de anticuerpos) que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que los residuos de CDR del anticuerpo aceptor humano se reemplazan con residuos de las CDR del anticuerpo donante de una especie no humana tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. Un ejemplo de un anticuerpo humanizado de los conceptos de la invención descritos en la presente es un anticuerpo humanizado que comprende las CDR del anticuerpo G4 y que comprende secuencias estructuras humanas que son homólogas a las secuencias flanqueantes del anticuerpo G4.

En la fabricación de un anticuerpo manipulado genéticamente, una secuencia de ADN que codifica una molécula de anticuerpo de los conceptos de la invención descritos en la presente se prepara sintéticamente mediante métodos estándar establecidos. Por ejemplo, de acuerdo con el método de fosfoamidina, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, se purifican, aparean, ligan y clonan en vectores adecuados.

La secuencia de ADN luego se puede insertar en un vector de expresión recombinante, que puede ser cualquier vector, que se puede someter convenientemente a procedimientos de ADN recombinante. La elección del vector a menudo dependerá de la célula huésped en la que se ha de introducir. Por lo tanto, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el cromosoma en el que se ha integrado.

En el vector, la secuencia de ADN que codifica la proteína debería estar operativamente conectada a una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN, que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección y se puede derivar de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la

- 5 célula huésped. Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN codificadora en células de mamífero incluyen, pero sin limitación, el promotor LTR, promotor SV 40, promotor MT-1 (gen de metalotioneína) o el promotor tardío principal de adenovirus 2. Un promotor adecuado para usar en células de insecto es el promotor de polihedrina. Los promotores adecuados para usar en células huésped de levadura incluyen promotores de genes glicolíticos de levadura o genes de alcohol deshidrogenasa o los promotores TPI1 o ADH2-4c. Los promotores adecuados para usar en células huésped de hongos filamentosos son, por ejemplo, el promotor ADH3 o el promotor *tpiA*.
- 10 La secuencia codificadora de ADN también puede estar operativamente conectada a un terminador adecuado, tal como el terminador de la hormona de crecimiento humana o (para los huéspedes de hongos) los promotores de TPI1 o ADH3. El vector puede comprender además elementos tales como señales de poliadenilación (por ejemplo de SV40 o región Elb de adenovirus 5 del título), secuencias potenciadoras de la transcripción (por ejemplo, el potenciador SV40) y secuencias potenciadoras de la traducción (por ejemplo, las que codifican ARN VA de adenovirus).
- 15 El vector de expresión recombinante puede comprender además una secuencia de ADN que permite que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Un ejemplo de dicha secuencia (cuando la célula huésped es una célula de mamífero) es el origen de replicación de SV40. El vector también puede comprender un marcador seleccionable, por ejemplo un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped, tal como el gen que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) o uno que confiere resistencia a un fármaco, por ejemplo neomicina, hidromicina o metotrexato.
- 20 Los procedimientos usados para ligar las secuencias de ADN que codifican las proteínas, el promotor y el terminador, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son bien conocidos por los expertos en la técnica.
- 25 Para obtener proteínas recombinantes de los conceptos de la invención descritos en la presente, las secuencias de ADN codificador se pueden fusionarse útilmente con una segunda secuencia codificadora del péptido y una secuencia codificadora del sitio de escisión de proteasa, lo que da un constructo de ADN que codifica la proteína de fusión, donde la secuencia codificadora del sitio de escisión de proteasa ubicada entre el fragmento de HBP y el segundo ADN que codifica el péptido, se inserta en un vector de expresión recombinante y se expresa en células huésped recombinantes. En una forma de realización, dicho segundo péptido se selecciona, pero sin limitación del grupo que comprende glutatión-S-reductasa, timosina de ternera, tioredoxina bacteriana o variantes naturales o sintéticas de ubiquitina humana, o péptidos de estos. En otra forma de realización, una secuencia peptídica que comprende un sitio de escisión de proteasa puede ser el Factor Xa, con la secuencia de aminoácidos IEGR, enteroquinasa, con la secuencia de aminoácidos DDDDK, trombina, con la secuencia de aminoácidos LVPR/GS, o *Acharombacter litycus*, con la secuencia de aminoácidos XKX, como sitio de escisión.
- 30 La célula huésped en la que se introduce el vector de expresión puede ser cualquier célula que sea capaz de expresar los péptidos o proteínas de longitud completa, y es con preferencia una célula eucariótica, tal como células de invertebrados (insectos) o células de vertebrados. por ejemplo, oocitos de *Xenopus laevis* o células de mamíferos, en particular células de insectos y mamíferos. Los ejemplos de líneas celulares de mamíferos adecuadas incluyen, pero sin limitación, líneas celulares HEK293 (ATCC CRL-1573), COS (ATCC CRL-1650), BHK (ATCC CRL-1632, ATCC CCL-10) o CHO (ATCC CCL-61). Los métodos para transfectar células de mamífero y expresar secuencias de ADN introducidas en las células son bien conocidos en la técnica.
- 35 Alternativamente, se pueden usar células fúngicas (que incluyen células de levadura) como células huésped. Los ejemplos de células de levadura adecuadas incluyen células de *Saccharomyces spp.* o *Schizosaccharomyces spp.*, en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Los ejemplos de otras células fúngicas son células de hongos filamentosos, por ejemplo *Aspergillus spp.* o *Neurospora spp.*, en particular cepas de *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*. El uso de *Aspergillus spp.* para la expresión de proteínas se describe en, por ejemplo, EP 238 023.
- 40 El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de células de mamífero, tal como un medio que contiene suero o libre de suero que contiene suplementos apropiados, o un medio adecuado para cultivar células de insectos, levaduras u hongos o cualquier célula utilizada para expresar las proteínas. Los medios adecuados están disponibles a través de proveedores comerciales o se pueden preparar de acuerdo con las recetas publicadas.
- 45 Las proteínas producidas de forma recombinante por las células se pueden recuperar del medio de cultivo por procedimientos convencionales que incluyen separar las células huésped del medio por centrifugación o filtración, precipitar los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrar por medio de una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, HPLC, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o similares.
- 55

- Una vez que se han obtenido los anticuerpos, por ejemplo, una vez que se han identificado células B individuales y/o se han producido anticuerpos monoclonales, se pueden obtener las secuencias que codifican las regiones variables de estos anticuerpos. Las secuencias de la región variable se pueden obtener, por ejemplo, mediante la secuenciación en primer lugar de la proteína del anticuerpo producida por el hibridoma, la célula B o el fago y la determinación de la secuencia de ácido nucleico codificadora. En una forma de realización, el ADN o ADNc de la región variable de inmunoglobulina (VH y VL) se puede secuenciar en su lugar. Cuando el anticuerpo se deriva de una línea celular de hibridoma o una célula B aislada, los ADNc que codifican las regiones variables se pueden amplificar usando PCR, por ejemplo, mediante los métodos descritos en Babcook et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 7843–7848 (1996)), y en la Publicación PCT N.º WO 92/02551.
- Un anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo compuesto por componentes de al menos dos fuentes diferentes. En ciertas formas de realización, un anticuerpo quimérico comprende una porción de un anticuerpo derivado de una primera especie fusionada a otra molécula, por ejemplo, una porción de un anticuerpo derivado de una segunda especie. En ciertas de estas formas de realización, un anticuerpo quimérico comprende una porción de un anticuerpo derivado de un animal no humano fusionado a una porción de un anticuerpo derivado de un ser humano. En ciertas de estas formas de realización, un anticuerpo quimérico comprende la totalidad o una porción de una región variable de un anticuerpo derivado de un animal fusionado a una porción de un anticuerpo de un segundo animal. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un anticuerpo quimérico puede comprender la totalidad o una porción de una región variable de un anticuerpo derivado de un animal no humano fusionado a una región constante de un anticuerpo derivado de un ser humano.
- La utilización de los anticuerpos monoclonales de los conceptos de la invención descritos en la presente puede requerir su administración a un sujeto, tal como, pero sin limitación, un ser humano. Sin embargo, cuando los anticuerpos monoclonales se producen en un animal no humano, tal como un roedor, la administración de dichos anticuerpos a un paciente humano provocará normalmente una respuesta inmune, en la que la respuesta inmune se dirige hacia la secuencia de los anticuerpos. Tales reacciones limitan la duración y la efectividad de tal terapia. Para superar este problema, los anticuerpos monoclonales de los conceptos de la invención descritos en la presente están "humanizados", es decir, los anticuerpos se manipulan genéticamente de manera que se eliminan una o más porciones antigénicas de estos y en consecuencia se sustituyen porciones similares de un anticuerpo humano. mientras que se mantiene la afinidad de los anticuerpos por el epítipo deseado. Esta manipulación genética solo puede implicar algunos aminoácidos, o puede incluir regiones estructurales completas del anticuerpo, dejando intactas las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo. Se conocen en la técnica varios métodos para humanizar anticuerpos y se describen en la patente U. S. Nros. 6.180.370, presentada a Queen et al. el 30 de enero de 2001; 6.054.927, presentada a Brickell el 25 de abril de 2000; 5.869.619, presentada a Studnicka el 9 de febrero de 1999; 5.861.155, presentada a Lin el 19 de enero de 1999; 5.712.120, presentada a Rodríguez et al. el 27 de enero de 1998; y 4.816.567, presentada a Cabilly et al. el 28 de marzo de 1989.
- Como se menciona anteriormente, un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo no humano que se ha modificado de manera que coincide más estrechamente (en la secuencia de aminoácidos) con un anticuerpo humano. Como se describió anteriormente, los anticuerpos interactúan con antígenos objetivo predominantemente a través de residuos de aminoácidos que están localizados en las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada y liviana (CDR). Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR pueden ser más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo–antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos naturales específicos mediante la construcción de vectores de expresión en los que las secuencias de CDR del anticuerpo natural se injertan en secuencias estructurales de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades, tales como regiones estructurales del anticuerpo humano. Dichas secuencias estructurales se pueden obtener de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para los genes de la región variable de la cadena pesada y liviana humana se pueden encontrar en la base de datos de secuencias germinales humanas "VBase" (disponible en Internet en mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91–3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776–798; and Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol.24:827–836.
- Las formas humanizadas de anticuerpos son inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de estas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen al antígeno) que se componen principalmente de la secuencia de una inmunoglobulina humana, y contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. La humanización se puede realizar siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., 1986; Riechmann et al., 1988; Verhoeyen et al., 1988), mediante la sustitución de secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. (Ver también la patente U. S. N.º 5.225.539). En algunos casos, los residuos estructurales F_v de la inmunoglobulina humana se reemplazan por

residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o estructurales importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales son las de una secuencia de consenso de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de manera óptima también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. (Jones et al., 1986; Riechmann et al., 1988; and Presta, 1992).

Los conceptos de la invención descritos en la presente además incluyen el uso de anticuerpos monoclonales completamente humanos. Los anticuerpos completamente humanos se relacionan esencialmente con moléculas de anticuerpo en las que la secuencia entera tanto de la cadena liviana como de la cadena pesada, que incluye las CDR, surgen de genes humanos. Dichos anticuerpos se denominan "anticuerpos humanos" o "anticuerpos completamente humanos" en la presente. Los "anticuerpos humanos" contienen secuencias de anticuerpos humanos y no contienen secuencias de anticuerpos de un animal no humano. En ciertas formas de realización, un anticuerpo humano puede contener además secuencias sintéticas que no se encuentran en anticuerpos nativos. El término no está limitado por la forma en que se obtienen los anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden preparar mediante la técnica de trioma; la técnica de hibridoma de células B humanas (ver Kozbor et al., *Hybridoma*, 2: 7 (1983)) y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (ver Cole et al., *PNAS*, 82: 859 (1985)). Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden utilizar en la práctica de los conceptos de la invención descritos y reivindicados en la presente y se pueden producir usando hibridomas humanos (ver Cote et al. *PNAS*, 80:2026 (1983)) o mediante la transformación de células B humanas con virus de Epstein Barr in vitro (ver Cole et al., 1985).

Además, los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante la introducción de locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Después de la provocación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la que se observa en humanos en todos los aspectos, incluida la reorganización genética, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, pero no a modo de limitación, en las patentes U. S. Nros. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en Marks et al., *J Biol. Chem.*, 267:16007 (1992); Lonberg et al., *Nature*, 368:856 (1994); Morrison, 1994; Fishwild et al., *Nature Biotechnol.*, 14:845 (1996); Neuberger, *Nat. Biotechnol.*, 14:826 (1996); y Lonberg and Huszar, *Int Rev Immunol.*, 13:65 (1995).

Los anticuerpos humanos se pueden producir adicionalmente usando animales transgénicos no humanos que se modifican para producir anticuerpos completamente humanos en lugar de los anticuerpos endógenos del animal en respuesta a la provocación por un antígeno. (Ver la Publicación PCT N. WO 94/02602). Los genes endógenos que codifican las cadenas de inmunoglobulina pesada y liviana en el huésped no humano se han incapacitado, y los locus activos que codifican las inmunoglobulinas de cadena pesada y liviana humanas se insertan en el genoma del huésped. Los genes humanos se incorporan, por ejemplo, usando cromosomas artificiales de levadura que contienen los segmentos de ADN humano requeridos. Entonces se obtiene un animal que proporciona todas las modificaciones deseadas como progenie mediante cruzamiento de animales transgénicos intermedios que contienen menos que el complemento completo de las modificaciones. Una forma de realización de dicho animal no humano es un ratón, y se denomina XENOMOUSE™ como se describe en las Publicaciones PCT Nros. WO 96/33735 y WO 96/34096. Este animal produce células B que secretan inmunoglobulinas completamente humanas. Los anticuerpos se pueden obtener directamente del animal después de la inmunización con un inmunógeno de interés, como, por ejemplo, una preparación de un anticuerpo policlonal, o alternativamente de células B inmortalizadas derivadas del animal, tales como hibridomas que producen anticuerpos monoclonales. Además, los genes que codifican las inmunoglobulinas con regiones variables humanas se pueden recuperar y expresarse para obtener los anticuerpos directamente, o se pueden modificar adicionalmente para obtener análogos de anticuerpos tales como, por ejemplo, moléculas de Fv de cadena simple.

Un ejemplo de un método para producir un huésped no humano, ejemplificado como un ratón, que carece de expresión de una cadena pesada de inmunoglobulina endógena se describe en la patente U. S. N.º 5.939.598, presentada a Kuchelapati et al. el 17 de agosto de 1999. Se puede obtener mediante un método que incluye suprimir los genes del segmento J de al menos un locus de cadena pesada endógena en una célula madre embrionaria para evitar la reorganización del locus y evitar la formación de una transcripción de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina reorganizada, la supresión se efectúa mediante un vector de direccionamiento que contiene un gen que codifica un marcador seleccionable; y produce a partir de la célula madre embrionaria un ratón transgénico cuyas células somáticas y germinales contienen el gen que codifica el marcador seleccionable.

Un método para producir un anticuerpo de interés, tal como un anticuerpo humano, se describe en la patente U. S. N.º 5.916.771, presentada a Hori et al. el 29 de junio de 1999. Incluye introducir un vector de expresión que contiene

una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada en una célula huésped de mamífero en cultivo, introducir un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena liviana en otra célula huésped de mamífero y fusionar las dos células para formar una célula híbrida. La célula híbrida expresa un anticuerpo que contiene la cadena pesada y la cadena liviana.

5 El término "anticuerpo neutralizante" o "anticuerpo que neutraliza" se refiere a un anticuerpo que reduce al menos una actividad de un polipéptido que comprende el epítipo al que se une específicamente el anticuerpo. En ciertas formas de realización, un anticuerpo neutralizante reduce una actividad in vitro y/o in vivo. El término "sitio de unión al antígeno" se refiere a una porción de un anticuerpo capaz de unirse específicamente a un antígeno. En ciertas formas de realización, un sitio de unión al antígeno es proporcionado por una o más regiones variables de anticuerpo.

10 Los anticuerpos de la presente invención con preferencia incluyen una o más modificaciones que inactivan el complemento. La frase "actividad del complemento" abarca ampliamente las actividades bioquímicas y fisiológicas asociadas con la activación del sistema del complemento, las moléculas asociadas con la vía del complemento individual, así como los genes que codifican estas moléculas. Por lo tanto, las actividades del complemento incluyen, 15 por ejemplo, estructura y expresión de un gen que codifica una molécula de vía del complemento, actividad bioquímica (por ejemplo, enzimática o reguladora) de una molécula de vía del complemento, actividades celulares que se inician o resultan de la activación del sistema del complemento, y presencia de autoanticuerpos séricos contra las moléculas de la vía del complemento. En el anticuerpo hSeI001, la modificación preferida para inactivar el complemento es un reemplazo de un residuo de lisina con alanina en la posición 342 en la región constante de la 20 cadena pesada CH2. Otras sustituciones en la misma posición pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de los siguientes: gly, leu, trp, tyr, pro, thr, ser, met, asp, asn, glu, gln, phe, ile, val, thr y cys con la condición de que la sustitución también es efectiva para eliminar la capacidad de la región constante para activar el complemento.

25 Los términos "moléculas asociadas a la vía del complemento", "moléculas de la vía del complemento" y "proteínas asociadas a la vía del complemento" se usan de manera intercambiable y se refieren a las diversas moléculas que desempeñan un papel en la activación del complemento y las actividades celulares corriente abajo mediadas por, sensibles o desencadenadas por el sistema de complemento activado. Incluyen iniciadores de vías del complemento (es decir, moléculas que desencadena directa o indirectamente la activación del sistema del complemento), 30 moléculas que se producen o desempeñan un papel durante la activación del complemento (por ejemplo, proteínas/enzimas del complemento tales como C3, C5, C5b-9, Factor B, MASP-1 y MASP-2), receptores o inhibidores del complemento (por ejemplo, clusterina, vitronectina, CR1 o CD59) y moléculas reguladas o activadas por el sistema de complemento activado (por ejemplo, factor inhibitorio del complejo de ataque de membrana, MACIF). Por lo tanto, además de las proteínas del complemento mencionadas anteriormente, las moléculas asociadas a la vía del complemento también incluyen, por ejemplo, reguladores de convertasa C3/C5 (RCA) como el receptor del complemento tipo 1 (también denominado CR1 o CD35), receptor del complemento tipo 2 (también 35 denominado CR2 o CD21), proteína del cofactor de membrana (MCP o CD46) y C4bBP; reguladores MAC tales como vitronectina, clusterina (también denominada "SP40,40"), CRP, CD59 y factor de restricción homólogo (HRF); cadenas de inmunoglobulina tales como Ig kappa, Ig lambda o Ig gamma; inhibidor de C1; y otras proteínas tales como CR3, CR4 (CD11b/18) y DAF (CD55).

Anticuerpos anti-P-selectina de función dual

40 Los conceptos de la invención descritos en la presente se dirigen a anticuerpos de "función dual" y fragmentos de estos que se unen específicamente a P-selectina y no solo bloquean la unión de PSGL-1 a P-selectina, sino que también disocian complejos de P-selectina/PSGL-1 preformados. La presente descripción describe un dominio de unión al anticuerpo no reconocido hasta ahora (un epítipo conformacional) dentro del dominio de lectina (por ejemplo, dominio de reconocimiento de carbohidratos, CRD) de P-selectina al cual se unen los anticuerpos de 45 función dual (que pueden ser por ejemplo anticuerpos quiméricos, humanos o humanizados, o fragmentos de estos). Los conceptos de la invención descritos en la presente también se refieren a anticuerpos anti-P-selectina que se unen al epítipo conformacional descrito en la presente y que tienen una función dual en (1) bloquear la unión de PSGL-1 a P-selectina y (2) causar la disociación de complejos P-selectina/PSGL-1 preformados. Los conceptos de la invención descritos en la presente en particular están dirigidos al uso de tales anticuerpos de función dual anti-P-selectina o fragmentos de anticuerpos de estos en tratamientos de afecciones inflamatorias, trombóticas u otras afecciones o trastornos en primates (incluidos los seres humanos) que involucran plaquetas, eritrocitos falciformes, leucocitos, linfocitos y/o células endoteliales, en la que la afección o trastorno comprende se asocia con (pero no se limita a) al menos uno de la crisis de dolor vasooclusivo de células falciformes, enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y enteritis), y enteritis), artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, 55 osteoartritis y artritis psoriásica), rechazo de injertos, enfermedad de injerto contra huésped, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, psoriasis, dermatitis, sepsis, nefritis, lupus eritematoso, esclerodermia, rinitis, anafilaxia, diabetes, esclerosis múltiple, aterosclerosis, trombosis, metástasis tumoral, reacciones alérgicas, tiroiditis, lesión por reperfusión isquémica (por ejemplo, debido a infarto de miocardio, accidente cerebrovascular o trasplante de órgano) y afecciones asociadas con traumatismo extenso o inflamación crónica, tal como, por ejemplo,

hipersensibilidad retardada tipo IV, asociada por ejemplo con infección por bacilos tuberculosos, o síndrome de respuesta inflamatoria sistemática o falla multiorgánica.

De manera importante, el uso de tales anticuerpos de función dual en el tratamiento de estas enfermedades inflamatorias permitirá no solo la prevención, reducción, o inhibición de la inflamación, sino que también proporcionará un mecanismo para tratar procesos de enfermedad inflamatoria en curso en los que los anticuerpos pueden disociar P-selectina/PSGL-1 preformada. Por ejemplo, en el caso de la crisis de dolor vasooclusivo de células falciformes, los anticuerpos que tienen actividad de función dual no solo evitan los eventos vasooclusivos futuros, sino que también permiten el tratamiento de la vasooclusión en curso. La solicitud también revela ensayos de prueba para la detección de anticuerpos anti-P-selectina que se unen al epítipo conformacional de P-selectina recientemente descrito aquí, y que no solo bloquean la unión de PSGL-1 a P-selectina sino que también causan la reversión de la unión de PSGL-1 a P-selectina (es decir, disociación del complejo preformado).

Como se indica en la presente, los conceptos de la invención descritos en la presente se dirigen a anticuerpos purificados (que incluyen pero sin limitación anticuerpos quiméricos, humanos o humanizados y fragmentos de estos) que reconocen (es decir, se unen) a la P-selectina (SEQ ID NO: 1) y que bloquean la unión de P-selectina a PSGL-1 (o receptores tipo PSGL-1) y causan disociación adicional de adhesiones o complejos celulares preformados que fueron mediados a través de interacciones PSGL-1/P-selectina, y métodos terapéuticos para usar tales anticuerpos (o fragmentos de unión de estos).

Más particularmente, los conceptos de la invención descritos en la presente se dirigen a anticuerpos purificados (o fragmentos de estos), contra P-selectina, células huésped que producen tales anticuerpos anti-selectina-P (o fragmentos de estos), ensayos de detección para identificar anticuerpos anti-P-selectina (o fragmentos de estos) que bloquean leucocitos, eritrocitos falciformes, linfocitos, plaquetas y adhesión mediada por P-selectina a células endoteliales y adicionalmente causan la disociación de adhesiones o complejos celulares preformados que fueron mediados a través de las interacciones de PSGL-1/P-selectina, y métodos terapéuticos que usan tales anticuerpos (o fragmentos de unión de estos). Los conceptos de la invención descritos en la presente incluyen nuevos anticuerpos contra P-selectina de primates (incluida la humana) y fragmentos de unión de estos, que incluyen particularmente, pero sin limitación, G4, formas humanizadas de anticuerpos G4 y hSel001. Los anticuerpos preferidos de la descripción son capaces de unirse específicamente a P-selectina de primate (particularmente humano) e inhibir una o más actividades de P-selectina in vitro y/o in vivo. Cuando se usa en la presente, el término "PSGL-1" también pretende incluir el "receptor tipo PSGL-1" en glóbulos rojos falciformes (eritrocitos).

En general, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de los conceptos de la invención descritos en la presente puede tener cualquier límite de tamaño superior siempre que tenga propiedades similares o inmunológicas en relación con el anticuerpo que se une con especificidad para el sitio de unión a P-selectina descrito en la presente y que bloquea la unión de PSGL-1 a P-selectina y disocia complejos de P-selectina/PSGL-1 preformados. Cuando se usa en la presente, el término "inclusivo" se refiere a todos los números enteros entre dos números enumerados en la presente.

Como se señala en otra parte de la presente, los fragmentos de anticuerpos de los conceptos de la invención descritos en la presente conservan la capacidad de unirse selectivamente a la totalidad o a una porción del epítipo de unión a P-selectina descrito en la presente. Con preferencia, un anticuerpo o fragmento de unión de un anticuerpo de la presente invención es capaz de unirse a un epítipo que comprende uno o más de los residuos de aminoácidos 1-35, o, más particularmente, 4-23, de la secuencia expuesta en la SEQ. ID NO: 1.

Como se señaló anteriormente, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de los conceptos de la invención descritos en la presente en formas de realización preferidas comprenden inmunoglobulinas de los isotipos IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ o quimeras IgG₂/G₄, con preferencia se une a P-selectina con una alta afinidad (por ejemplo, donde la K_d es ≤ 1000 nM) y con preferencia comprende una región constante humana, y con preferencia inhibe la unión de P-selectina a PSGL-1 y con más preferencia también causó la reversión de la unión de P-selectina a PSGL-1 en un complejo preformado. Además, el anticuerpo anti-P-selectina o fragmento de unión de este con preferencia no activa el complemento a través de la vía clásica mediante la interacción con C1q y con preferencia no se une a receptores de Fc, denominados colectivamente función efectora de anticuerpo. Los conceptos de la invención descritos en la presente en particular están dirigidos al uso de tales anticuerpos de función dual anti-P-selectina o fragmentos de anticuerpos de estos descritos e identificados en la presente en tratamientos de afecciones inflamatorias, trombóticas u otras afecciones o trastornos en primates (incluidos los seres humanos) que involucran adhesión de plaquetas, eritrocitos falciformes, leucocitos, linfocitos y/o células endoteliales, en la que la afección o trastorno comprende se asocia con (pero no se limita a) al menos uno de la crisis de dolor vasooclusivo de células falciformes, enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y enteritis), y enteritis), artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, osteoartritis y artritis psoriásica), rechazo de injertos, enfermedad de injerto contra huésped, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, psoriasis, dermatitis, sepsis, nefritis, lupus eritematoso, esclerodermia, rinitis, anafilaxia, diabetes, esclerosis múltiple, aterosclerosis, trombosis,

metástasis tumoral, reacciones alérgicas, tiroiditis, lesión por reperfusión isquémica (por ejemplo, debido a infarto de miocardio, accidente cerebrovascular o trasplante de órgano) y afecciones asociadas con traumatismo extenso o inflamación crónica, tal como, por ejemplo, hipersensibilidad retardada tipo IV, asociada por ejemplo con infección por bacilos tuberculosos, o síndrome de respuesta inflamatoria sistemática o falla multiorgánica.

5 Como se señala en otra parte de la presente, la P-selectina desempeña un papel central en el reclutamiento de leucocitos y linfocitos a sitios inflamatorios y trombóticos mediante la unión a un ligando de superficie (PSGL-1) en estas células y en la unión de los eritrocitos falciformes al endotelio que tiene células endoteliales activadas. PSGL-1 se expresa constitutivamente en leucocitos, incluidos neutrófilos y monocitos, y en algunas células endoteliales. Un receptor tipo PSGL-1 se expresa en los eritrocitos falciformes y permite a estas células unirse a P-selectina en
10 células endoteliales activadas.

Sin querer estar limitado por la teoría, se cree que el tratamiento de la crisis de dolor vasooclusivo de células falciformes, por ejemplo por el anticuerpo anti-selectina-P de la presente invención, es efectivo mediante la inhibición de una o más de los siguientes interacciones: (1) PSGL-1 en leucocitos que se unen a P-selectina en endotelio activado; (2) un ligando tipo PSGL-1 en eritrocitos falciformes que se unen a P-selectina en endotelio
15 activado; (3) P-selectina en la superficie de plaquetas activadas que se unen a PSGL-1 en células endoteliales; (4) eritrocitos falciformes que se unen a leucocitos a través de una interacción ligando-receptor no caracterizada; (5) P-selectina sobre plaquetas activadas que se unen al receptor de tipo PSGL-1 en eritrocitos falciformes, y/o; (6) P-selectina en la superficie de plaquetas activadas que se unen a PSGL-1 en leucocitos. Se cree que el anticuerpo anti-P-selectina de función dual bloquea la iniciación y propagación de la vasooclusión en múltiples niveles de
20 interacciones célula-célula en la microvasculatura. Además, como se observa en otra parte de la presente, el anticuerpo anti-P-selectina de función dual disocia los complejos de P-selectina/PSGL-1 y por lo tanto se puede usar terapéuticamente para intervenir en la vasooclusión en curso.

La P-selectina media las interacciones de plaquetas o células endoteliales activadas con células sanguíneas que incluyen ciertos eritrocitos (es decir, eritrocitos falciformes) y leucocitos que incluyen monocitos, neutrófilos, eosinófilos, células T CD4⁺, células T CD8⁺, células B y células citolíticas naturales (NK). Como se indica en la
25 presente, se sabe que la P-selectina está implicada en una serie de respuestas celulares a la inflamación que resulta de una lesión, infección o agresiones fisicoquímicas. La aterosclerosis, caracterizada por lesiones ateroscleróticas en las superficies internas de los vasos sanguíneos, es un ejemplo de una afección que implica la unión de ciertos leucocitos a células endoteliales portadoras de P-selectina en el revestimiento interno de las
30 paredes de los vasos sanguíneos.

Como se indicó anteriormente, las terapias dirigidas a bloquear la P-selectina funcionan, por ejemplo, usando anticuerpos contra P-selectina para evitar la fijación y el rodamiento de los leucocitos y la adherencia de los eritrocitos (es decir, los eritrocitos falciformes), podrían tener un profundo efecto sobre numerosos tipos de
35 enfermedades inflamatorias y trombóticas. Dado su rol fundamental en la iniciación del rodamiento y fijación de los leucocitos al endotelio y las plaquetas, la P-selectina es un objetivo principal para el desarrollo terapéutico para tratar trastornos inflamatorios y trombóticos. Por ejemplo, la naturaleza transitoria de la fase aguda de anemia de células falciformes junto con los efectos crónicos recurrentes de daño orgánico y complicaciones asociadas y la morbilidad sugiere que una intervención terapéutica que exhibe tanto bloqueo de la adhesión inicial debido a la unión de P-selectina y PSGL-1 e inducir la disociación de la adhesión previa, en curso o preestablecida, puede tener una
40 aplicación novedosa a esta y otras enfermedades inflamatorias y trombóticas. La solicitud revela un método para usar un epítipo de unión al anticuerpo conformacional de P-selectina para detectar e identificar anticuerpos de "función dual" a P-selectina que no solo bloquean la unión de P-selectina-PSGL-1, sino que también provocan la disociación del complejo P-selectina/PSGL-1 preformado (y por tanto complejo célula-célula), y el uso de tales anticuerpos para el tratamiento terapéutico de enfermedades, tales como, pero sin limitación, enfermedades
45 inflamatorias y trombóticas.

Como se indicó anteriormente, se han descubierto nuevos epítipos de unión conformacional de P-selectina como se describe en la presente. El descubrimiento de estos epítipos de unión conformacional se ha llevado adicionalmente al descubrimiento de anticuerpos anti-P-selectina de función dual (por lo tanto, los anticuerpos se pueden referir en la presente como anticuerpos de "función dual") que se unen con alta especificidad al epítipo
50 conformacional y que no solo bloquean la unión de P-selectina y PSGL-1, pero que también inducen la disociación de complejos de P-selectina/PSGL-1 preformados (es decir, inducen la reversión de la unión de P-selectina-PSGL-1), de este modo causa la disociación de complejos celulares tales como leucocitos/células endoteliales, leucocitos/plaquetas, linfocitos/células endoteliales, linfocitos/plaquetas, eritrocitos falciformes/células endoteliales o complejos de eritrocitos falciformes/plaquetas.

55 Las regiones de unión para algunos anticuerpos contra P-selectina se han mapeado previamente usando constructos de dominios funcionales grandes que abarcan las regiones de lectina, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y consenso repetido (CR) de la proteína nativa P-selectina en ratón y ser humano (90, 70, 91-95). Estos

resultados indicaron que las áreas de unión primaria para algunos anticuerpos bloqueantes de función para P-selectina estaban en el dominio de unión a lectina, una región que abarca los residuos de aminoácidos 1–120 de la proteína P-selectina nativa, o en el dominio EGF que abarca los aminoácidos 121–154.

Se proporcionan ejemplos a continuación.

5 La presente descripción describe el descubrimiento de nuevos epítopos no lineales (por ejemplo, conformacionales) mediante el uso de quimeras de ratón/humano que contienen los dominios de lectina, EGF, CR1 y CR2 de P-selectina que se probaron con anticuerpos de prueba de bloqueo de función para P-selectina. El trabajo previo ha demostrado que, como mínimo, se requiere la expresión de los dominios de lectina y EGF para el plegamiento y la conformación adecuados de los contratos de P-selectina (91). Una comparación de las secuencias de aminoácidos de P-selectina humana y de ratón indicó que hay homología en el dominio de lectina con un número específico de diferencias de residuos de aminoácidos entre el ser humano y el ratón. En la presente, se utilizó homología tridimensional (3-D) para comparar los dominios de lectina, EGF, CR1 y CR2 humanos y de ratón de P-selectina (Fig. 1) para identificar las diferencias de aminoácidos entre las P-selectinas humanas y de ratón (secuencias y numeración según las proteínas maduras).

15 El método usó modelado 3-D de P-selectina para comparar las posiciones de las diferencias de aminoácidos entre P-selectina humana y de ratón en la superficie expuesta de la proteína y para identificar clústeres de diferencias de aminoácidos entre el ser humano y el ratón en el dominio de lectina y EGF que se localizan en la superficie de la proteína plegada. Este método 3-D representa clústeres de diferencias de aminoácidos que resultan de la yuxtaposición de aminoácidos discontinuos colocados en proximidad entre sí mediante el plegamiento de la proteína. Por ejemplo, algunos aminoácidos formarán epítopos conformacionales en virtud de estar en la misma superficie, por ejemplo, de estructuras helicoidales. La comparación de homología de tales clústeres permitió la selección de sustituciones de aminoácidos para analizar el efecto de tales cambios sobre la unión de anticuerpos bloqueantes de función (bloqueo de PSGL-1) a la selectina-P humana.

25 El método además incluyó el mapeo de sitios de restricción conservados en los marcos de lectura abierta del ADNc para identificar una estrategia para la construcción de proteínas quiméricas que abarcan los dominios de la lectina, EGF, CR1 y CR2 y puede permitir la sustitución de aminoácidos individuales o múltiples en sitios específicos en la P-selectina humana o de ratón para identificar aquellos aminoácidos que optimizan la unión del anticuerpo a la P-selectina humana. Las quimeras se construyeron con técnicas de clonación molecular conocidos, usando regiones N-terminal de P-selectina humana y de ratón que abarcan el dominio ATG a CR2 con un vector adecuado, tal como pBluescript (pBS-hPsel y pBS-mPsel). Las quimeras se insertaron en otro vector adecuado, tal como pIG1 (PIG-hPsel y PIG-mPsel) donde los constructos se fusionaron a la región Fc de la IgG1 humana que contiene la bisagra, región CH2 y CH3. Estos constructos conservaron las estructuras que son consistentes con la conformación nativa de P-selectina. Por lo tanto, los dominios que se expusieron en la superficie de la proteína nativa también estaban presentes en los constructos quiméricos y, por lo tanto, servían como epítopos putativos para la unión de anticuerpos de prueba. Tales constructos se pueden transfectar y expresar transitoriamente usando técnicas de expresión molecular y celular conocidas por las personas con experiencia ordinaria en la técnica.

40 Usando este método, los anticuerpos de prueba se pueden evaluar para determinar su unión a las quimeras humanas/de ratón usando un método tal como, pero sin limitación, métodos de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y resonancia de plasmón superficiales (BIAcore) conocidos por los expertos en la técnica. Se evaluaron los efectos de los cambios en los aminoácidos en diversas posiciones en los constructos quiméricos por sustitución de aminoácidos de ratón, por ejemplo, en la secuencia humana, por el contrario, o aminoácidos humanos en la secuencia de ratón, por ejemplo, que anularon o permitieron la unión de anticuerpos dirigidos a P-selectina humana y, por lo tanto, permitieron la identificación de aminoácidos particulares para una unión óptima.

Caracterización de constructos quiméricos

45 Los aminoácidos de P-selectina de ratón que se han sustituido en la secuencia de P-selectina humana se indican en **negrita** en las quimeras que se describen a continuación. Los aminoácidos de P-selectina humana que se han sustituido en la secuencia de ratón se indican en **negrita en cursiva**. La sustitución de glutamina por histidina se indica con **negrita subrayada**.

Constructos de la proteína nativa

50 SEQ ID NO:1

Dominios de lectina, EGF, CR1, CR2 de P-selectina humana

ES 2 676 570 T3

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPHYSSYYWIGIRKNNKTW
 61 TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDEHCLKKKHALCYTA
 121 SCQDMSCSKQGECELETIGNYTCSYPGFYGPECEYVRECGELELPQHVLNCSHPLGNFS
 181 FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKI PERGNMTCLHSAKA
 241 FQHQSSCSFSCEEFGFALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

SEQ ID NO:2

Dominios de lectina, EGF, CR1, CR2 de P-selectina de ratón—diferencias de aminoácidos de ser humano en negrita.

42 WTY**NY**STKAYS**WNNSRVFCRRHFT**DLVAIQNKNE**IAHLNDVI**PF**FNS**YYWIGIRK**INN**KW
 102 TWVGT**NKTLTE**EAENWADNEPNN**KKNQ**DCVEIYIK**SNS**APGKWNDE**PCFKR**KRALCYTA
 162 SCQDMSCSN**Q**GECEIETIG**SYT**CSYPGFYGPECEYV**KE**CG**KVNI**PQHVLNCSHPL**GE**FS
 222 FNSQ**CTFSCA**EGY**ELDGP**GEL**Q**CLASGIWTN**NP**PK**CD**AV**QC**Q**SLE**AP**PH**GT**MAC**M**HPI**AA
 282 **FAYDSSCKFECQ**PGYRARG**SNTLHCTG**SG**QWSE**PL**PTCE**AI**A**

5 Constructos quiméricos humano/ratón

SEQ ID NO:3

Quimera-1

(sustituciones de ratón en clúster A humano – N₄N₁₄V₁₇F₁₈R₂₀R₂₁H₂₂F₂₃)

1 WTYNYSTKAYS**WNNSRVFCRRHFT**DLVAIQNKNEIDYLNKVLPHYSSYYWIGIRKNNKTW
 61 TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDEHCLKKKHALCYTA
 121 SCQDMSCSKQGECELETIGNYTCSYPGFYGPECEYVRECGELELPQHVLNCSHPLGNFS
 181 FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKI PERGNMTCLHSAKA
 241 FQHQSSCSFSCEEFGFALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

10 SEQ ID NO:4

Quimera-2

(Clúster humano A a I₃₅ – ratón a partir de este)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNE**IAHLNDVI**PF**FNS**YYWIGIRK**INN**KW
 61 TWVGT**NKTLTE**EAENWADNEPNN**KKNQ**DCVEIYIK**SNS**APGKWNDE**PCFKR**KRALCYTA
 121 SCQDMSCSN**Q**GECEIETIG**SYT**CSYPGFYGPECEYV**KE**CG**KVNI**PQHVLNCSHPL**GE**FS
 181 FNSQ**CTFSCA**EGY**ELDGP**GEL**Q**CLASGIWTN**NP**PK**CD**AV**QC**Q**SLE**AP**PH**GT**MAC**M**HPI**AA
 241 **FAYDSSCKFECQ**PGYRARG**SNTLHCTG**SG**QWSE**PL**PTCE**AI**A**

SEQ ID NO:5

15 Quimera-3

ES 2 676 570 T3

(sustituciones en Clúster humano A – a **N₄N₁₄V₁₇F₁₈** de ratón)

1 WTYNYSTKAYSWNNSRVFCQNRVYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPHYSSYYWIGIRKNNKTW
61 TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121 SCQDMSCSKQGELETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNCSHPLGNFS
181 FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKI PERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEEFGFALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

SEQ ID NO:6

Quimera-4

5 (sustituciones en Clúster humano A – a **R₂₀R₂₁H₂₂F₂₃** de ratón))

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCRRHFTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPHYSSYYWIGIRKNNKTW
61 TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121 SCQDMSCSKQGELETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNCSHPLGNFS
181 FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKI PERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEEFGFALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

SEQ ID NO:7

Quimera-5

10 (cambio de aminoácido único – H₄ humano a **N₄** de ratón)

1 WTYNYSTKAYSWNISRKYCQNRVYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPHYSSYYWIGIRKNNKTW
61 TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121 SCQDMSCSKQGELETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNCSHPLGNFS
181 FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKI PERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEEFGFALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

SEQ ID NO:8

Quimera-5Q

(sustitución de **Q**for H₄ en clúster A – elimina el sitio de glicosilación putativo)

1 WTYQYSTKAYSWNISRKYCQNRVYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPHYSSYYWIGIRKNNKTW
61 TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121 SCQDMSCSKQGELETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNCSHPLGNFS
181 FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKI PERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEEFGFALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

15

SEQ ID NO:9

ES 2 676 570 T3

Quimera-6

(secuencia humana a EGF – S₁₂₁ – EGF, CR1 y CR2 de ratón)

```
1      WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPHYSSYYWIGIRKNNKTW
61     TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121    SCQDMSCSNQGECEIETIGSYTCSYPGFYGPECEYVKECGKVNIPOHVLNMC SHPLGEFS
181    FNSQCTFSCAEGYELDGPGELQCLASGIWTNNPPKCDAVQCQSLEAPPHGTMACMHPIAA
241    FAYDSSCKFECQPGYRARGSNTLHCTGSGQWSEPLPTCEAIA
```

SEQ ID NO:10

5 Quimera-7

(secuencia humana a G₁₇₇ – ratón a partir de este)

```
1      WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPHYSSYYWIGIRKNNKTW
61     TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121    SCQDMSCSKQGECELETIGNYTCSCYPGFYGPECEYVRECGELELPQHVLNMC SHPLGEFS
181    FNSQCTFSCAEGYELDGPGELQCLASGIWTNNPPKCDAVQCQSLEAPPHGTMACMHPIAA
241    FAYDSSCKFECQPGYRARGSNTLHCTGSGQWSEPLPTCEAIA
```

SEQ ID NO:11

10 Quimera-7B

(secuencia humana al fin de EGF – V₁₅₆ – ratón a partir de este)

```
1
1      WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPHYSSYYWIGIRKNNKTW
61     TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDHCLKKKHALCYTA
121    SCQDMSCSKQGECELETIGNYTCSCYPGFYGPECEYVKECGKVNIPOHVLNMC SHPLGEFS
181    FNSQCTFSCAEGYELDGPGELQCLASGIWTNNPPKCDAVQCQSLEAPPHGTMACMHPIAA
241    FAYDSSCKFECQPGYRARGSNTLHCTGSGQWSEPLPTCEAIA
```

SEQ ID NO:12

15 Quimera-8

(cambio de aminoácido único – I₁₄ humano a N₁₄ de ratón)

ES 2 676 570 T3

1 WTYNYSTKAYSWNNSRKYCQNR~~Y~~TDLVAIQNKNEIDYLNKVL~~P~~YYSSYYWIGIRKNNKTW
61 TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDEHCLKKKHALCYTA
121 SCQDMSCSKQGELETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVL~~M~~NCSHPLGNFS
181 FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTKPPQCLAAQCPPLKI PERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEE~~G~~FALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

SEQ ID NO:13

Quimera-9

(cambio de aminoácido único – K₁₇ humano a V₁₇ de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRVYCQNR~~Y~~TDLVAIQNKNEIDYLNKVL~~P~~YYSSYYWIGIRKNNKTW
61 TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDEHCLKKKHALCYTA
121 SCQDMSCSKQGELETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVL~~M~~NCSHPLGNFS
181 FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTKPPQCLAAQCPPLKI PERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEE~~G~~FALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

5

SEQ ID NO:14

Quimera-10

(cambio de aminoácido único – Y₁₈ humano a F₁₈ de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKF~~C~~QNR~~Y~~TDLVAIQNKNEIDYLNKVL~~P~~YYSSYYWIGIRKNNKTW
61 TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDEHCLKKKHALCYTA
121 SCQDMSCSKQGELETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVL~~M~~NCSHPLGNFS
181 FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTKPPQCLAAQCPPLKI PERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEE~~G~~FALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

10 SEQ ID NO:15

Quimera-11

(cambio de aminoácido único – Q₂₀ humano a R₂₀ de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYC~~R~~NRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVL~~P~~YYSSYYWIGIRKNNKTW
61 TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDEHCLKKKHALCYTA
121 SCQDMSCSKQGELETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVL~~M~~NCSHPLGNFS
181 FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTKPPQCLAAQCPPLKI PERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEE~~G~~FALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

SEQ ID NO:16

15 *Quimera-12*

ES 2 676 570 T3

(cambio de aminoácido único – N₂₁ humano a R₂₁ de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQ**R**RYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPHYSSYYWIGIRKNNKTW
61 TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWND~~EH~~CLKKKHALCYTA
121 SCQDMSCSKQGE**C**LETIGNYTCSCYPGFYGP**E**CEYVREC**G**ELELPQHVL**M**NCSHPLGNFS
181 FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKI PERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEEGFALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

SEQ ID NO:17

Quimera-13

5 (cambio de aminoácido único – R₂₂ humano a H₂₂ de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQ**N**H**Y**TDLVAIQNKNEIDYLNKVLPHYSSYYWIGIRKNNKTW
61 TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWND~~EH~~CLKKKHALCYTA
121 SCQDMSCSKQGE**C**LETIGNYTCSCYPGFYGP**E**CEYVREC**G**ELELPQHVL**M**NCSHPLGNFS
181 FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKI PERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEEGFALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

SEQ ID NO:18

Quimera-14

(cambio de aminoácido único – Y₂₃ humano a F₂₃ de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQ**N**R**F**TDLVAIQNKNEIDYLNKVLPHYSSYYWIGIRKNNKTW
61 TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWND~~EH~~CLKKKHALCYTA
121 SCQDMSCSKQGE**C**LETIGNYTCSCYPGFYGP**E**CEYVREC**G**ELELPQHVL**M**NCSHPLGNFS
181 FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKI PERGNMTCLHSAKA
241 FQHQSSCSFSCEEGFALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

10

SEQ ID NO:19

Quimera-15

(secuencia humana a cluster C2 – S₉₇ – ratón a partir de este)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQ**N**RYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPHYSSYYWIGIRKNNKTW
61 TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIK**S**NSAPGKWND**E**PC**F**K**R**KRALCYTA
121 SCQDMSCSNQGE**C**IE**T**IG**S**YTCSCYPGFYGP**E**CEYV**K**EC**G**K**V**NI**P**QHVL**M**NCSHPL**G**E**F**S
181 FNSQ**C**T**F**S**C**A**E**G**Y**E**L**D**G**P**G**E**L**QCLASGIWTNNPPK**C**DAVQ**C**S**L**E**A**P**H**G**T**MAC**M**H**P**I**A**A
241 **F**AYDSSCK**F**EC**Q**PGYRARG**S**NT**L**HCTG**S**G**Q**W**S**E**P**L**T**C**E**A**I**A

15

SEQ ID NO:20

Quimera-16

(sustitución de **H4H4K17N21R22** humano en Clúster A de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISR**K**FCR**NR**FTDLVAIQNKNEIAHLNDVIPP**F**NSYYWIGIRKINN**KW**
 61 TWVGTNKTLLTEEAENWADNEPNNKKN**Q**DCVEIYIKSNSAPGKW**N**DEPCFKRKRALCYTA
 121 SCQDMSCSNQ**G**ECIETIGSYTCSCYPGFY**G**PECEYV**K**ECGKVNIPOHVLMNC**S**HPL**G**E**F**S
 181 F**N**SQ**C**T**F**S**C**A**E**G**Y**E**L**D**G**P**G**E**L**Q**C**L**A**S**G**I**W**T**N**N**P**P**K**C**D**A**V**Q**C**S**L**E**A**P**P**H**G**T**M**A**C**M**H**P**I**A**A**
 242 F**A**Y**D**S**S**C**K**F**E**C**Q**P**G**Y**R**A**R**G**S**N**T**L**H**C**T**G**S**G**Q**W**S**E**P**L**P**T**C**E**A**I**A**

SEQ ID NO:21

5 Quimera-17

(secuencia humana a Cluster B a I35 – Cluster B de ratón a I42 – humano a CR1 a E154 – CR1, CR2 de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQ**N**RYTDLVAIQNKNEIA**HL**NDVIPPYYSSYYWIGIRKNN**KTW**
 61 TWVGT**K**KAL**T**NEAENWADNEPNNKR**N**NE**D**CV**E**IYIKSP**S**APGKW**N**DEHCL**K**KK**H**ALCYTA
 121 SCQDMSCSKQ**G**E**C**L**E**TIGNYTCSCYPGFY**G**PECEYV**K**ECGKVNIPOHVLMNC**S**HPL**G**E**F**S
 181 F**N**SQ**C**T**F**S**C**A**E**G**Y**E**L**D**G**P**G**E**L**Q**C**L**A**S**G**I**W**T**N**N**P**P**K**C**D**A**V**Q**C**S**L**E**A**P**P**H**G**T**M**A**C**M**H**P**I**A**A**
 242 F**A**Y**D**S**S**C**K**F**E**C**Q**P**G**Y**R**A**R**G**S**N**T**L**H**C**T**G**S**G**Q**W**S**E**P**L**P**T**C**E**A**I**A**

SEQ ID NO:22

Quimera-17B

10 (secuencia humana a Cluster B a I35 – Clúster B de ratón a I42 – humano a partir de este)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQ**N**RYTDLVAIQNKNEIA**HL**NDVIPPYYSSYYWIGIRKNN**KTW**
 61 TWVGT**K**KAL**T**NEAENWADNEPNNKR**N**NE**D**CV**E**IYIKSP**S**APGKW**N**DEHCL**K**KK**H**ALCYTA
 121 SCQDMSCSKQ**G**E**C**L**E**TIGNYTCSCYPGFY**G**PECEYV**R**EC**G**E**L**EL**P**QHVLMNC**S**HPL**G**N**F**S
 181 F**N**SQ**C**S**F**H**C**T**D**G**Y**Q**V**N**G**P**S**K**L**E**C**L**A**S**G**I**W**T**N**K**P**P**Q**C**L**A**A**Q**C**P**P**L**K**I**P**E**R**G**N**M**T**C**L**H**S**A**K**A
 242 F**Q**H**Q**S**S**C**S**F**S**C**E**E**G**F**A**L**V**G**P**E**V**V**Q**C**T**A**S**G**V**W**T**A**P**A**P**V**C**K**---**

SEQ ID NO:23

Quimera-18

(secuencia humana con clúster C de ratón (C1, C2, C3) y CR1, CR2 de ratón)

15

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQ**N**RYTDLVAIQNKNEIDYLNK**V**L**P****F**NSYYWIGIRKNN**KTW**
 61 TWVGT**K**KAL**T**NEAENWADNEPNNKR**N**NE**D**CV**E**IYIKSNSAPGKW**N**DEHCL**K**KK**R**ALCYTA
 121 SCQDMSCSKQ**G**E**C**L**E**TIGNYTCSCYPGFY**G**PECEYV**K**ECGKVNIPOHVLMNC**S**HPL**G**E**F**S
 181 F**N**SQ**C**T**F**S**C**A**E**G**Y**E**L**D**G**P**G**E**L**Q**C**L**A**S**G**I**W**T**N**N**P**P**K**C**D**A**V**Q**C**S**L**E**A**P**P**H**G**T**M**A**C**M**H**P**I**A**A**
 242 F**A**Y**D**S**S**C**K**F**E**C**Q**P**G**Y**R**A**R**G**S**N**T**L**H**C**T**G**S**G**Q**W**S**E**P**L**P**T**C**E**A**I**A**

SEQ ID NO:24

Quimera-18B

(secuencia humana con clúster C de ratón (C1, C2, C3))

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNR~~Y~~TDLVAIQNKNEIDYLNKVL~~P~~**F**FNSYYWIGIRKNNKTW
61 TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKS**N**SAPGKW~~N~~DEHCLKK**K**RALCYTA
121 SCQDMSCSKQGELETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVL~~M~~NCSHPLGNFS
181 FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKP**P**QCLAAQCPPLKI PERGNMTCLHSAKA
242 FQHQSSCSFSCEEGFALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

5 SEQ ID NO:25

Quimera-19

(secuencia humana con clúster D de ratón y CR1, CR2 de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNR~~Y~~TDLVAIQNKNEIDYLNKVL~~P~~YSSYYWIGIRKIN**N**KW
61 TWVGT**N**KTL**T**EEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKS**P**SAPGKW~~N~~DEHCLKK**K**HALCYTA
121 SCQDMSCSKQGELETIGNYTCSCYPGFYGPCEYV**K**ECG**K**VNI**P**QHVL~~M~~NCSHPL**G**EFS
181 FNSQ**C**T**F**S**C**AEGYELDGP**G**ELQCLASGIWTN**N**PK**C**DAV**Q**C**S**LEAP**P**HGT**M**AC**M**HP**I**AA
242 **F**AYDSSCK**F**EC**Q**PGY**R**ARG**S**NT**L**HCT**G**SG**Q**W**S**E**P**L**P**T**C**E**A**I**A**

SEQ ID NO:26

10 *Quimera-19B*

(secuencia humana con clúster D de ratón D)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNR~~Y~~TDLVAIQNKNEIDYLNKVL~~P~~YSSYYWIGIRKIN**N**KW
61 TWVGT**N**KTL**T**EEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKS**P**SAPGKW~~N~~DEHCLKK**K**HALCYTA
121 SCQDMSCSKQGELETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVL~~M~~NCSHPLGNFS
181 FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKP**P**QCLAAQCPPLKI PERGNMTCLHSAKA
242 FQHQSSCSFSCEEGFALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

SEQ ID NO:27

Quimera-20

15 (secuencia humana con clúster E de ratón y CR1, CR2 de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPHYSSYYWIGIRKNNKTW
 61 TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDEPCFKRKHALCYTA
 121 SCQDMSCSKQGECLLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVKECGKVNIPQHVLNCSHPLGEFS
 181 FNSQCTFSCAEGYELDGPGELOCLASGIWTNNPPKCDAVQCOSLEAPPHGTMACMHPIAA
 242 FAYDSSCKFECQPGYRARGSNLHCTGSGQWSEPLPTCEAIA

SEQ ID NO:28

Quimera-20B

(secuencia humana con clúster E de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPHYSSYYWIGIRKNNKTW
 61 TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDEPCFKRKHALCYTA
 121 SCQDMSCSKQGECLLETIGNYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNCSHPLGNFS
 181 FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKI PERGNMTCLHSAKA
 5 242 FQHQSSCSFSCEEFGALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

SEQ ID NO:29

Quimera-21

(secuencia humana con clúster F de ratón)

1 WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNRYTDLVAIQNKNEIDYLNKVLPHYSSYYWIGIRKNNKTW
 61 TWVGTKKALTNEAENWADNEPNNKRNNEDCVEIYIKSPSAPGKWNDEHCLKKKHALCYTA
 121 SCQDMSCSNQGECIETIGSYTCSCYPGFYGPCEYVRECGELELPQHVLNCSHPLGNFS
 181 FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLECLASGIWTNKPPQCLAAQCPPLKI PERGNMTCLHSAKA
 242 FQHQSSCSFSCEEFGALVGPEVVQCTASGVWTAPAPVCK---

10 **Análisis FACTS de anticuerpos anti-P-selectina a quimeras de humano/ratón**

15 Se analizó la unión de anticuerpos a quimeras de humano/ratón de P-selectina usando análisis FACS en un sistema tal como BD BIOSCIENCES FACS ARIA CELL SORTER para medir la unión de anticuerpos anti-P-selectina a quimeras humanas/de ratón que fueron acopladas a perlas recubiertas con un anticuerpo Fc antihumano de cabra. Tales perlas recubiertas con quimeras se incubaron con anticuerpos de prueba anti-P-selectina que luego se detectaron con anticuerpos Fc anti-ratón o específicos de isotipo etiquetados con informadores, tales como FITC, adecuados para la detección mediante el sistema FACS.

Resonancia de plasmón de superficie de una etapa (BIACORE)

20 En un aspecto de los conceptos de la invención descritos en la presente, se usaron chips BIACORE para capturar un anticuerpo de prueba anti-P-selectina. Las quimeras de P-selectina de humano-ratón descritas en la presente se dispusieron sobre el chip y los anticuerpos de prueba se añadieron al chip de preenlace. La unión de las quimeras a los anticuerpos de ensayo se midió mediante unidades de respuesta de resonancia.

Resonancia de plasmón de superficie de dos etapas (BIACORE)

En otro aspecto de los conceptos inventivos divulgados en la presente, se proporcionó un chip de captura, tal como un chip BIACORE, con un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana, unido covalentemente a su superficie. Se

inyectaron en el chip constructos quiméricos de humano/ratón P-selectina del dominio lectina, EGF, CR1 y CR2 en un IgG Fc humano y se capturaron en concentraciones que lograron un nivel estandarizado de recubrimiento superficial medido por la respuesta de resonancia. El nivel de respuesta de resonancia logrado después de cargar cada constructo de quimera de P-selectina se designó como un nuevo nivel de "línea de base secundaria". Los anticuerpos anti-P-selectina (por ejemplo, anticuerpos anti-P-selectina, de ratón o humanizados, monoclonales, que incluyen G1, G3, G4, G5 y hSel001) se inyectaron luego en el chip BIACORE y se incubaron para unirse al constructo de quimera P-selectina ya capturado en la superficie. El método podría modificarse para ensayar anticuerpos humanizados creando constructos de P-selectina en Fc de IgG de ratón y capturando con un anticuerpo policlonal Fc de IgG anti-ratón de cabra y luego sondeando con anticuerpos anti-P-selectina humanizados de prueba. Los anticuerpos que se unen a los constructos de P-selectina ocasionan un aumento del nivel de respuesta de resonancia desde la línea de base secundaria. El aumento resultante en la respuesta de resonancia puede medirse como "unidades de resonancia añadidas (RUs, Resonance units)" y, por lo tanto, indican el nivel de unión al constructo de P-selectina recubierta previamente sobre el chip de captura del anticuerpo de prueba. Usando estos métodos, los requisitos óptimos para la unión de anticuerpos anti-P-selectina a las quimeras de P-selectina se mapearon con precisión en epítopos conformacionales particulares.

Identificación de anticuerpos anti-P-selectina de función dual (anticuerpos que tanto bloquean como disocian la unión de P-selectina a PSGL-1)

El análisis BIACORE también se usó para descubrir la funcionalidad dual de anticuerpos anti-selectina-P específicos, es decir, como se discutió anteriormente, ambos pueden bloquear y disociar (invertir) interacciones de unión entre P-selectina y PSGL-1. En este método, PSGL-1, o miméticos de molécula pequeña del epítipo de unión de PSGL-1 tales como un mimético de glicosulfopéptido biotinilado (por ejemplo, GSP-6), o proteínas quiméricas que contienen el extremo N-terminal de PSGL-1, se capturan en un chip BIACORE, tal como un chip de estreptavidina, usando métodos conocidos por las personas con experiencia ordinaria en la técnica (GSP-6 es un mimético peptídico de 18 aminoácidos sulfatado, glicosilado de los aminoácidos 42-60 del extremo N-terminal expuesto de PSGL-1 descrito en detalle en la Patente de Estados Unidos N° 6.593.459, por ejemplo). Primero, para demostrar la capacidad de "bloquear la función", en una realización, se premezcla un anticuerpo anti-P-selectina con P-selectina soluble y se incuba durante un período para permitir la formación del complejo P-selectina/anticuerpo. El complejo de anticuerpo anti-P-selectina resultante/P-selectina se introduce en el chip u otro sustrato que lleva el PSGL-1 (o el mimético de PSGL-1) y se une al PSGL-1 o se mide su mimético. En la presente, los anticuerpos anti-P-selectina, que evitan la unión de P-selectina al PSGL-1 o PSGL-1 mimético en el chip, se designan como anticuerpos bloqueadores de función.

En segundo lugar, se pueden probar los anticuerpos anti-P-selectina que se han demostrado (mediante el método anterior u otro método similar) que son anticuerpos bloqueadores de función (es decir, que bloquean la unión de PSGL-1 a P-selectina). para una función adicional, es decir, que tiene la capacidad de disociarse (invertir) la unión entre el complejo P-selectina PSGL-1 preformado. Dichos anticuerpos pueden analizarse para determinar las propiedades de "doble función" usando el método de análisis BIACORE analizado en este documento. En una realización, para demostrar la propiedad de doble función, PSGL-1, o un mimético de la misma tal como GSP-6, se acopla a un chip BIACORE. La P-selectina se dispone en el chip y se permite que se una al PSGL-1 o al mimético. Después de equilibrar la unión de P-selectina a PSGL-1, o el mimético, se indica mediante el sensograma, se introducen los anticuerpos anti-P-selectina que bloquean la función y la disociación de la unión de P-selectina a PSGL-1, o el mimético es medido por cualquier método apropiado. Tales anticuerpos que se muestran para disociarse (es decir, invertir), la unión a P-selectina/PSGL-1 se designan como "anticuerpos disociadores" y se caracterizan como anticuerpos de función dual, es decir, poseen propiedades de bloqueo de función y de disociación en la interrupción de la unión de P-selectina a PSGL-1. Dichos anticuerpos de función doble son una realización particularmente preferida de la invención, ya que son especialmente adecuados para la aplicación terapéutica como tratamientos de enfermedades inflamatorias y trombóticas agudas y crónicas, tal como se describen en otra parte en la presente.

Descubrimiento de epítopos conformacionales

La estructura tridimensional (3-D) de las proteínas maduras de P-selectina humana y de ratón se analizaron y compararon en cuanto a las diferencias de aminoácidos en los dominios de lectina y EGF. Se identificaron seis grupos de diferencias de aminoácidos conformacionales en las superficies expuestas de las proteínas. Estos fueron designados como clústeres A, B, C, D, E y F (Fig. 1). Los extremos N de P-selectinas humanas y de ratón que abarcan los residuos 1-35 contienen 8 diferencias de aminoácidos. El clúster A se definió arbitrariamente por el límite de la primera diferencia de aminoácidos (H4) y la última diferencia de aminoácidos (Y23). El clúster A contiene 20 aminoácidos y forma una hélice alfa rígida con un enlace de cisteína cerca del extremo N de la proteína (véase la región "1" en la figura 5). El clúster B (figura 1) es un epítipo conformacional que abarca los restos de aminoácidos 36-42 y contiene 4 diferencias de aminoácidos entre la selectina P humana y la de ratón. Cuando se usa aquí, el término "epítipo conformacional" pretende referirse a un epítipo que no se reconoce en condiciones reductoras. Los conglomerados C y E (figura 1) son conformacionales y discontinuos y se aproximan mediante el plegamiento de la

proteína P-selectina nativa. El clúster C tiene tres regiones conformacionales (C1, C2, C3) que contienen 5 diferencias de aminoácidos entre P-selectina humana y de ratón. El clúster C1 se separa de C2 por 51 aminoácidos y el clúster C2 se separa de C3 por 15 aminoácidos. Del mismo modo, el clúster E tiene dos epítomos conformacionales (E1, E2) que contienen cinco diferencias de aminoácidos entre la P-selectina humana y la del ratón, estando el clúster E1 separado de E2 por 19 aminoácidos. Los clústeres A, B, C, D y E se encuentran dentro del dominio de lectina consenso de P-selectina (Fig. 1). El clúster F reside en el dominio EGF y tiene 3 diferencias de aminoácidos de 11 aminoácidos. Los clústeres C1, E1, C2, E2 y C3 abarcan residuos de contacto clave que se han identificado previamente para la interacción de P-selectina con su ligando fisiológico PSGL-1 (Somers et al.). Los clústeres A y B son distales (en sentido ascendente) con respecto a estos residuos de contacto.

Se analizaron los marcos de lectura abiertos de los ADNc para P-selectina humana y de ratón para identificar sitios de restricción comunes que podrían usarse para ensamblar quimeras que abarquen los conglomerados. La PCR y la síntesis química de ADN se usaron para generar ADNc que codifican constructos de proteínas o quimeras específicas tales como la SEQ ID NO: 1-29 (descrita anteriormente, y en el Listado de secuencias). La clonación por restricción se usó para construir plásmidos que codifican las quimeras humano/de ratón. Las quimeras se expresaron transitoriamente en células COS-7 y se utilizaron para análisis FACS y BIACORE. Las quimeras P-selectina se probaron para la función de unión usando BIACORE analizando su unión a GSP-6 unida a un chip BIACORE. Como se señaló anteriormente, GSP-6 es una molécula pequeña que imita el extremo N-terminal de PSGL-1 humano. Todas las quimeras analizadas se unieron al GSP-6 en el chip, aunque en diversos grados, ya que la P-selectina de ratón tiene una afinidad de unión más baja al PSGL-1 humano que la P-selectina humana. Esto indicó que las quimeras habían mantenido la función después de la expresión y la purificación.

Análisis FACS

Los resultados del análisis FACS de anticuerpos anti-selectina-P, usando los constructos o quimeras correspondientes a SEQ ID NOs: 1-29 se resumen en la Tabla 1. Cuatro anticuerpos de prueba anti-P-selectina (G1, G3, G4 y G5) se aislaron a partir de hibridomas generados por inmunización de ratones con una selectina P recombinante humana que contiene los dominios de lectina y EGF (90, y datos no publicados). Estos estudios habían demostrado que estos anticuerpos eran específicos para P-selectina humana y que G1, G3 y G4 son anticuerpos bloqueadores de función mientras que G5 no bloquea (90, y datos no publicados). G1, G3 y G5 se analizaron mediante análisis FACS. Usando este método, G1, G3 y G5 se unen todos a P-selectina humana (SEQ ID NO: 1) pero no a P-selectina de ratón (SEQ ID NO: 2). Cuando los ocho aminoácidos de ratón correspondientes se sustituyeron en el clúster A de la secuencia humana (Quimera 1, SEQ ID NO: 3), se anuló la unión por G1 pero no G3 o G5, lo que indica que al menos uno o más de los correspondientes ocho posiciones de aminoácidos en el clúster A fueron esenciales para la unión de G1 a P-selectina y que la sustitución con los aminoácidos de "ratón" en aquellas una o más posiciones anuló la unión. Para confirmar la importancia de estos residuos, los ocho aminoácidos humanos diferentes en las posiciones 1-23 se sustituyeron en el clúster A de la secuencia de ratón (SEQ ID NO: 4, quimera-2). Estas sustituciones confirmaron que G1 se unía a la proteína de ratón. Unas quimeras que contienen el dominio de lectina P-selectina humana con sustituciones de aminoácidos de ratón en los dominios EGF, CR1 y CR2 (SEQ ID NO: 9, quimera-6), y secuencia humana a través del dominio EGF y en el dominio CR1 con la secuencia de ratón en el resto del dominio CR1 y el dominio CR2 completo (SEQ ID NO: 10, quimera-7), se unieron por G1 y G3 indicando que los epítomos de unión primaria permanecieron intactos después de la sustitución de estos aminoácidos de ratón y que la conformación de los epítomos de unión al anticuerpo no se vieron afectados adversamente. Estos datos confirmaron que los epítomos de unión para G1 y G3 residían en el dominio de lectina.

Usando el método FACS, se demostró que el anticuerpo de prueba G3 se une a P-selectina humana pero no a P-selectina de ratón y a diferencia de G1, unido a SEQ ID NO: 3 (quimera-1), lo que indica que G3 se une a un epítopo distinto del epítopo unido por G1. Los detalles del mapeo de epítomos G3 se resumen en la siguiente Tabla 1.

El anticuerpo de prueba G5, que previamente se mostró que no bloqueaba, también se analizó usando este método. También se demostró que G5 se une a P-selectina humana pero no a P-selectina de ratón. G5 unido a SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 10 que abarca el dominio EGF e incluye la primera parte de CR1 a N₁₇₈, pero G5 no se unió a SEQ ID NO: 9 que se extiende a S₁₂₈. Estos resultados indican que el anticuerpo G5 se une a la primera parte de CR1 y requiere al menos los aminoácidos R₁₂₈ a N₁₇₈.

Tabla 1. Resultados de la unión de diversos anticuerpos (G1, G3, G4, G5, hSel001) a P-selectina humana y de ratón y a sus constructos quiméricos. ¹Por FACS, ²By BIACORE 1-etapa, ³Por BIACORE 2-etapas, unión débil

ES 2 676 570 T3

Quimeras de humano/Ratón								
SeqI D	Dominios de ratón insertados en P- selectina humana	Humano	Ratón	G1	G3	G5	G4	hSel001
1	Ninguna	1-279	0	+1,2,3	+1,2,3	+1,3	+3	+2
2	Todos	0	1-282	-1,2,3	-1,2,3	-1,3	-3	-2
3	A _{4,14,17,18,20,21,22,23}	1-3, 24-279	4-23	-1,2,3	+1,3	+1	-3	
4	B,C,D,E,F	1-35	36-282	+1,2,3	-3		+3	
5	A _{4,14,17,18}	19-279	1-18	-2				
6	A _{20,23}	1-19, 24-279	20-23	-2				
7	A ₄	1-3, 5-279	4	+2w,3w	+3		+3w	
8	Ninguno	1-3, 5-279	0	+2,3	+3		+3	
9	F, CR1, CR2	1-128	129-282	+1,2,3	+1,3	-1,3	+3	
10	CR1, CR2	1-177	178-282	+1,2,3	+1,3	+1,3	+3	
11	CR1, CR2	1-156	157-282	+2	+2	-2		
12	Alquilo-C1-C4	1-13, 15-279	14	-2				
13	A ₁₇	1-16, 18-279	17	-2				
14	Alquilo-C1-C8	1-17, 19-279	18	+2				
15	A ₂₀	1-19, 21-279	20	+2				
16	A ₂₁	1-20, 22-279	21	+2w				
17	A ₂₂	1-21, 23-279	22	-2				
18	A ₂₃	1-22, 24-270	23	+2				
19	C2,E2,C3, F,CR1,CR2	1-97	98-282	+2,3	-3		+3	
20	B,C,D,E,F	1-35 H/M hibrido	36-282	+2,3	-2,3		+3	+2
21	B,CR1,CR2	1-35, 43-156	36-42, 157- 282	+3	+3	-3		
22	B	1-35, 43-279	36-42		+3	+3		
23	C1,C2,C3,CR1,C R2	1-43, 47-97, 99-113, 115- 156	44-46, 98, 114, 157- 282	+3	-3	-3		

24	C1,C2,C3	1-43, 47-97, 99-113, 115- 279	44-46, 98, 114		- ³	+ ³		
25	D,CR1,CR2	1-55, 72-156	56-71, 157- 282	+ ³	+ ³			
26	D	1-55, 72-279	56-71		+ ³	+ ³		
27	E1,E2,CR1,CR2	1-84, 89-107, 113-156	85-88, 108- 112, 157- 282	+ ³	+ ³			
28	E1,E2	1-84, 89-107, 113-279	85-88, 108- 112		+ ³	+ ³		
29	F	1-128, 140- 279	129-139		+ ³	+ ³		
			Posiciones de aminoácidos críticas:	A (4,14,1 7,21,22)	C	Prime ra parte de CR1 (157- 164)	A (4,14, 17,21 ,22)	A (4,14,17, 21,22)

Resonancia de plasmón de superficie de una etapa (BIACORE)

5 Para investigar más la importancia del dominio del clúster A (aminoácidos 4-23) para la unión del anticuerpo G1 a la selectina P, se realizaron varios constructos quiméricos en los que se insertaron aminoácidos de ratón simples o múltiples en la secuencia de P-selectina humana y la unión se analizaron usando los métodos de resonancia de plasmón superficial ("BIACORE de una etapa") descritos en este documento. Los resultados de unión de BIACORE de un paso se presentan en la Tabla 1. Se capturó el anticuerpo de prueba G1 en un chip BIACORE y se midió la unión de diversas quimeras como unidades de respuesta. Un sensograma representativo que muestra la unión de G1 a constructos fe P-selectina humana (SEQ ID NO: 1), selectina P de ratón con clúster humano A (SEQ ID NO: 4) y selectina P de ratón (SEQ ID NO: 2) es se muestra en la Figura 2. Usando este método, se demostró que G1 se unía a P-selectina humana y a SEQ ID NO: 4 (donde los aminoácidos humanos se sustituían en el clúster A de P-selectina de ratón), pero no se unía a P-selectina de ratón. (SEQ ID NO: 2). Estos resultados demostraron que este método es consistente con los resultados de FACS.

15 La P-selectina de ratón (SEQ ID NO: 2) tiene un sitio putativo de glicosilación (N) en la posición 4, mientras que la P-selectina humana (SEQ ID NO: 1) no lo tiene. Para probar la importancia de esta diferencia, la posición 4 de P-selectina humana SEQ ID NO: 1 se sustituyó con un N (formando SEQ ID NO: 7) o una Q (formando SEQ ID NO: 8) y el efecto de estos se midieron las sustituciones en la unión del anticuerpo G1. La inserción de asparagina (N) en P-selectina humana en la posición 4 disminuyó la unión a G1, lo que sugiere que la glicosilación en este sitio en P-selectina humana interferiría con la unión del anticuerpo. La sustitución de glutamina (Q) en esta posición no evitó la unión de G1.

25 Para identificar adicionalmente las posiciones amino en el clúster A que son óptimas o esenciales para la unión del anticuerpo G1, se realizaron sustituciones de un solo aminoácido de aminoácidos de secuencia de ratón en la P-selectina humana (SEQ ID NO: 1) y unión de las quimeras resultantes para G1 se midieron usando el método BIACORE de una etapa descrito en la presente memoria (Tabla 1). Las quimeras ensayadas (con sustituciones específicas indicadas entre paréntesis) fueron: SEQ ID NO: 7 (H4N); SEQ ID NO: 12 (I14N); SEQ ID NO: 13 (K17V); SEQ ID NO: 14 (Y18F); SEQ ID NO: 15 (Q20R); SEQ ID NO: 16 (N21R); SEQ ID NO: 17 (R22H); y SEQ ID NO: 18 (Y23F). El anticuerpo G1 se unió a SEQ ID NO: 14, 15 y 18, pero no se unió a SEQ ID NO: 12, 13 y 17 y solo débilmente a SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 16. Este resultado indicó que las posiciones de aminoácido 4, 14, 17, 21 y 22 son cada una de las posiciones requeridas individualmente para la unión de G1. En una realización preferida, estos aminoácidos son H₄, I₁₄, K₁₇, N₂₁ y R₂₂, respectivamente.

30

Para confirmar que la forma humanizada de G1 (hSel001) mantenía la especificidad de epítipo idéntica del anticuerpo parental, la unión de hSel001 a SEQ ID NO: 1, 2 y 20 se probó usando este método. El patrón de unión de hSel001 fue idéntico al de G1 confirmando que la especificidad del epítipo se mantuvo durante el proceso de humanización.

5 Resonancia de plasmón de superficie de dos etapas (BIACORE)

Para evaluar la unión de G1, G3, G4 y G5 (G5 no bloquea) a quimeras adicionales, se usó el ensayo de resonancia de plasmón superficial en dos etapas ("BIACORE de dos etapas") descrito en la presente memoria. Los resultados de los ensayos de "dos pasos" para los anticuerpos de prueba se presentan en la Tabla 1 y en la Figura 2. Usando este método, ninguno de los anticuerpos de prueba investigados se unieron a la selectina P de ratón y todos se unieron a la selectina P humana demostrando su especificidad para P-selectina humana. Los anticuerpos de prueba G1, G3, G4 y G5 se unen todos a SEQ ID NO: 10 indicando que todos se unen a una región que abarca el extremo N a través de los dominios de lectina y EGF de P-selectina humana. El anticuerpo no bloqueante G5 no se unió a la SEQ ID NO: 9, pero se unió a la SEQ ID NO: 10 confirmando que G5 se une al dominio CR1.

15 Un análisis adicional utilizando este método mostró que G3 no se unía a SEQ ID NO: 23, que tiene aminoácidos de ratón insertados en el clúster C1, C2, C3, CR1 y CR2, ni se unía a SEQ ID NO: 24 que aminoácidos de ratón en C1, C2 y C3. G3 tampoco se unió a otras quimeras que tenían una secuencia de ratón en el clúster C, que es la SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 20. Estos resultados indican que el anticuerpo bloqueante G3 requiere el agrupamiento C para unirse y demuestra el nuevo hallazgo de que los clústeres conformacionales de aminoácidos puestos en proximidad por plegamiento de proteínas pueden servir como dominios de unión (epítopos conformacionales) para anticuerpos anti-selectina P. El método también confirmó que G3 puede bloquear la unión de PSGL-1 y P-selectina y, por lo tanto, tiene propiedades de bloqueo de la función (Fig. 3). Sin embargo, el método también mostró que G3 no se unía o disociaba (revertía) la unión del complejo P-selectina/PSGL-1 (Fig. 4) y, por lo tanto, no tenía las propiedades de función doble de los anticuerpos preferidos del presente descritos conceptos inventivos.

25 Las posiciones de aminoácidos que contribuyen a la unión de G1 y G4 a P-selectina se identificaron generando un híbrido humano/de ratón en el clúster A. La quimera de clúster híbrido A (SEQ ID NO: 20) contiene P-selectina aminoácidos humanos en las posiciones 4, 14, 17, 21 y 22 (H, I, K, N y R, respectivamente) y aminoácidos P-selectina de ratón en las posiciones 18, 20 y 23 (Y, Q e Y, respectivamente) Como se indica en la Tabla 1, tanto G1 como G4 se unieron a SEQ ID NO: 20. Este resultado cuando se toma con los datos previos indica que las posiciones de aminoácidos 4, 14, 17, 21 y 22 comprenden posiciones que son necesarias para la unión óptima de G1, G4 y la forma humanizada de G1 (hSel001) a P-selectina. Estos resultados comprenden un nuevo hallazgo de que un clúster de anticuerpos que incluyen G1, G4 y hSel001 se unen al mismo epítipo o similar y que este epítipo se encuentra en la estructura helicoidal del clúster A que es distal al contacto del dominio de unión lectina-ligando residuos previamente identificados para P-selectina (71). En una realización preferida, los aminoácidos en las posiciones 4, 14, 17, 21 y 22 son H, I, K, N y R, respectivamente. El análisis 3-D de este epítipo reveló una estructura helicoidal rígida con los aminoácidos requeridos que ocupan sitios en la misma cara de la hélice; por lo tanto, el clúster A se designa como que comprende un epítipo conformacional (Fig. 5). El análisis BIACORE se muestra en las Figuras 3 y 4 confirmaron que G1, G4 y hSel001 pueden bloquear y también disociar la unión de P-selectina y PSGL-1 y así la unión del epítipo descrito aquí dentro por este clúster de anticuerpos tiene las propiedades de función doble de las realizaciones preferidas del presente descritos conceptos inventivos divulgados.

40 Estos resultados indican que los anticuerpos que se unen a un epítipo conformacional localizado dentro de los aminoácidos 1-35, y más particularmente dentro de los aminoácidos 4-23, de SEQ ID NO: 1 que es distal al dominio de unión lectina-ligando en humanos P-selectina, tendrá propiedades únicas de doble función. Sin estar limitados por la teoría, se contempla que los anticuerpos que se unen a este epítipo actúan contribuyendo fuerzas alostéricas que ejercen sobre la interfaz de unión lectina-ligando para inducir un cambio conformacional que disocia la unión de P-selectina a PSGL-1. De este modo, G1 es capaz de unir el epítipo distal en el clúster A y bloquear y disociar el complejo uniéndose e interrumpiendo las interacciones moleculares en el sitio de unión lectina-ligando en P-selectina. En contraste, anticuerpos tales como G3, que se unen a un epítipo en el dominio de unión lectina-ligando de P-selectina pueden bloquear la unión de P-selectina a PSGL-1 por impedimento alostérico, pero no pueden causar la disociación de la P-selectina/PSGL-1 complejo ya que el anticuerpo no se puede unir al epítipo conformacional del clúster C cuando está ocupado por el ligando. El anticuerpo de prueba G5 se unió al clúster de P-selectina CR1 y se demostró que no era bloqueante (figura 3).

En resumen, los anticuerpos que se unen a P-selectina se han caracterizado por tener tres actividades posibles con respecto a la interacción de P-selectina y su ligando, PSGL-1.

55 En primer lugar, los anticuerpos P-selectina pueden unirse a P-selectina pero no interferir con la unión de PSGL-1 a P-selectina ("no bloqueante"). Por ejemplo, como se muestra aquí, el anticuerpo G5 se une a los aminoácidos

157–164 y requiere R₁₅₇, E₁₆₁, L₁₆₂, E₁₆₃ y L₁₆₄ de CR1 para la unión, pero esta unión no bloquea la unión de la selectina P a PSGL–1.

5 En segundo lugar, los anticuerpos P–selectina pueden unirse a P–selectina e interferir con la unión de PSGL–1 a P–selectina ("bloqueo de función"), pero no se unen o disocian una P–selectina preformada/PSGL–1 complejo. Por ejemplo, los resultados descritos en este documento muestran que el anticuerpo G3 se une a clústeres conformacionales en una parte diferente de P–selectina que abarca el dominio de unión lectina–ligando. G3 se une al clúster C y requiere los aminoácidos C1 Y44, Y45, S46 y el aminoácido C2 P98 y el aminoácido C11 H114 y, por lo tanto, requiere un epítipo conformacional. Este anticuerpo bloquea la interacción entre P–selectina y PSGL–1, pero no puede unirse o disociarse de complejos preformados de P–selectina/PSGL–1.

10 En tercer lugar, hemos descubierto anticuerpos P–selectina con especificidad específica que se pueden unir a P–selectina y no solo bloquean la unión de PSGL–1 a P–selectina (anticuerpo bloqueador de función) sino que también pueden causar la reversión de P preformada –selectina/PSGL–1 vinculante (unión disociativa). Dichos anticuerpos se denominan en la presente memoria anticuerpos de "función doble". Los resultados descritos en la presente demuestran, por ejemplo, que G1 se une a un epítipo conformacional en el clúster A, y que esta unión tenía un requisito absoluto para un epítipo conformacional que comprende las posiciones de aminoácidos 4, 14, 17, 21 y 22, preferiblemente los ácidos son H, I, K, N y R, respectivamente. Como se discute en otra parte en el presente documento, la sustitución del aminoácido "humano" (H, I, K, N y R) en cualquiera de estas posiciones, respectivamente, con el correspondiente aminoácido "de ratón" (N, N, V, R, y H) dará como resultado la abrogación de la unión por los anticuerpos de función dual descritos en este documento.

20 En otra realización de los conceptos inventivos descritos en la presente, un clon de anticuerpo monoclonal anti–P–selectina de ratón previamente no designado G4, generado usando métodos de hibridoma estándar, se ensayó para la unión al epítipo conformacional del clúster A, y se probó para capacidades de doble función usando los métodos descritos en este documento. G4 se ensayó para unirse a quimeras humanas/de ratón SEQ ID NOs.: 1 – 4, 7 – 10, 19 y 20. Se mostró que G4 se unía a SEQ ID NO: 20 y tenía especificidad de unión similar a la descrita para G1 (véase la Tabla 1). Se mostró entonces que G4 bloqueaba la unión de P–selectina a PSGL–1 (Figura 3) y también para provocar la disociación de los complejos P–selectina/PSGL–1 preformados (Figura 4), caracterizando así a G4 como una doble función P–selectina anticuerpo que se une a un epítipo (en el clúster A) que es distal al dominio de unión lectina–ligando de P–selectina y bloquea y disocia la unión de P–selectina a PSGL–1. Los anticuerpos G1 y G4 se unieron ambos a un epítipo en el clúster A y ambos demostraron propiedades de función dual. Este resultado también demuestra el uso del clúster A o de posiciones de unión específicas o aminoácidos del mismo como un epítipo que se puede usar para seleccionar anticuerpos anti–P–selectina para capacidades de doble función. Tales anticuerpos de función dual poseen propiedades únicas para aplicaciones terapéuticas en las que se puede tratar la iniciación de la adhesión mediada por P–selectina y/o la adhesión mediada por P–selectina en curso en entornos agudos o crónicos. Usando los métodos descritos en este documento, otros anticuerpos que tienen propiedades de función dual pueden identificarse usando el método de cribado usando el epítipo del clúster A o posiciones específicas o aminoácidos del mismo.

40 El anticuerpo anti–P–selectina IgG2 humanizado que carece de la función efectora llamada hSel001 (un anticuerpo de unión a P–selectina humanizado que comprende CDR del anticuerpo de ratón G1 injertado en regiones flanqueantes humanas como se caracterizó previamente en la Publicación No. WO 2008/069999) también fue cribado usando el método de cribado descrito en este documento. Un resumen de los datos (Tabla 1) muestra que el anticuerpo hSel001 se unió a las mismas quimeras (SEQ ID NO: 1 y 20) como anticuerpo G1. La unión de hSel001 fue específica del epítipo conformacional descrito en el presente documento localizado dentro del clúster A. Los resultados mostraron que el anticuerpo hSel001 posee propiedades de función dual que le permiten bloquear la unión de P–selectina a PSGL–1 (figura 3) y disociar selectina P preformada/Complejos PSGL–1 (Fig. 4). Por lo tanto, hSel001 es otro anticuerpo opcionalmente abarcado por los conceptos inventivos descritos actualmente y puede usarse como un tratamiento terapéutico para enfermedades inflamatorias y trombóticas como se describe en la presente, y en el que la unión de P–selectina a PSGL–1 está bloqueada, y se promueve la disociación del complejo P–selectina/PSGL–1 preformado.

Ensayos de rodado in vitro basadas en células bajo flujo con neutrófilos humanos

50 Para evaluar más aun las propiedades de bloqueo y de disociación de los anticuerpos G1, G4 y hSel001, se realizaron ensayos de laminación in vitro basados en células con neutrófilos humanos recién aislados que se introdujeron bajo un flujo de 1,0 dyn/cm² en una cámara de flujo recubierta con niveles bajos y altos de P–selectina de membrana. La P–selectina de baja densidad se revistió a 0,25 µg/ml y la P–selectina de alta densidad se recubrió a 2 µg/ml. Las densidades del sitio se determinaron utilizando mAb G1 marcado con I125 para que fueran 50 sitios/mm² (bajo) y 380 sitios/mm² (alto). En la selectina P de baja densidad, los neutrófilos rodaron a una velocidad promedio de 5 µm/s o 6,5 µm/s. En la selectina P de alta densidad, los neutrófilos rodaron a una velocidad promedio de 1 µm/s. Los neutrófilos se introducen en el tampón o buffer bajo flujo y se les permite comenzar a rodar y

anclarse. Una vez equilibrados, los anticuerpos de prueba (G1, G3, G4 y hSel001) se introdujeron en un tampón o buffer sin células bajo flujo. Hay un volumen muerto de aproximadamente 1 minuto de intervalo antes de que el anticuerpo llegue a la cámara. A intervalos de 1 minuto a partir de entonces, las células que permanecen unidas se cuentan y expresan como % de células unidas. Los resultados se registraron en microscopía de video durante aproximadamente 0–20 minutos y los datos se analizaron después de la ejecución.

Los resultados en los paneles de la Figura 6 (A) y (C) mostraron que los neutrófilos se enrollaron a una velocidad más alta en P-selectina de baja densidad. Por lo tanto, a medida que el complejo P-selectina/PSGL-1 se liberaba debido a la cinética normal de activación/desactivación de la unión lectina/ligando, los neutrófilos recorrían mayores distancias a mayor velocidad hasta el siguiente sitio de unión a P-selectina. A medida que el complejo se libera, la P-selectina ocupada previamente queda disponible para la unión por anticuerpos anti-P-selectina. Por lo tanto, los cuatro anticuerpos, G1, G3, G4 y hSel001, mostraron una funcionalidad de bloqueo equivalente en el transcurso de 1–4 minutos.

Los resultados en los paneles (B) y (D) de la Figura 6 en selectina-P de alta densidad mostraron que los neutrófilos se desplazan mucho más lentamente (1 $\mu\text{m/s}$) ya que están disponibles un mayor número de sitios de unión de P-selectina. Muchos neutrófilos llegan a detenerse en la selectina P a esta densidad. En estas condiciones, los anticuerpos murinos G1 y G4 y el anticuerpo humanizado hSel001 fueron capaces de liberar neutrófilos que se enrollan y anclan al disociar el complejo P-selectina/PSGL-1 inmediatamente y en el transcurso de 1–8 minutos. Por el contrario, el anticuerpo G3 anti-P-selectina requirió hasta 16–20 minutos para bloquear los neutrófilos rodantes. Esto indicó que el anticuerpo G3 solo era capaz de unir sitios de selectina P desocupados y bloquear así los complejos P-selectina/PSGL-1, pero no era capaz de unirse y disociarse del complejo preformado. Estos ensayos de unión celular bajo flujo confirman los resultados BIACORE informados previamente en este documento que demuestran que los anticuerpos murinos G1 y G4 y el anticuerpo humanizado hSel001 tienen todas propiedades de función dual que causan bloqueo y disociación de complejos preformados de P-selectina/PSGL-1.

El hSel001 tiene una unión reforzada versus G1 de anticuerpo de ratón

Las afinidades de unión a P-selectina de G1 y hSel001 se analizaron in vitro y se compararon usando resonancia de plasmón superficial (Biacore). La P-selectina humana soluble se unió covalentemente a un chip Biacore CM5 y el anticuerpo G1 de ratón y el anticuerpo humanizado hSel001 se probaron independientemente por introducción al chip.

Con el fin de evaluar adicionalmente la interacción de los anticuerpos anti-P-selectina con P-selectina (antígeno), se realizó un análisis cinético usando resonancia de plasmón superficial (SensiQ). El anticuerpo anti-P-selectina monoclonal de ratón G1 y el anticuerpo hSel001 humanizado se analizaron por resonancia de plasmón superficial en SensiQ. Para analizar la cinética de unión de estos dos anticuerpos, el chip sensor se funcionalizó uniendo covalentemente la proteína recombinante G. El anticuerpo G1 de ratón se introdujo y capturó en el chip inyectando una solución 20 nM durante 1 minuto. El anticuerpo humanizado hSel001 se introdujo y se capturó en un canal separado similarmente funcionalizado mediante la inyección de una solución 10 nM durante 1 minuto. Se introdujeron concentraciones de P-selectina humana soluble (100 nM–1.56 nM) y la unión se midió con unidades de respuesta (RU). Los datos para la unión de cada uno se analizaron usando el software de análisis Qdat.

La Figura 7 muestra los resultados de unión para ambos anticuerpos en una sola concentración de P-selectina.

En base a estos resultados, se midió que la K_d (constante de disociación) para hSel001 era 5,89 nM en comparación con una K_d de 8,94 nM para el anticuerpo de ratón G1 (Tabla 2). Esto representa una mejora del 34% en la afinidad de unión del anticuerpo humanizado anti-P-selectina hSel001 cuando se compara con el anticuerpo anti-P-selectina monoclonal de ratón G1. Además, la K_a (constante de asociación) para hSel001 fue mayor en un 64.7% que en G1, lo que significa que hSel001 se une más rápidamente a la P-selectina. Ambos resultados indican que el anticuerpo hSel001 humanizado tiene K_d (afinidad) mejorada y k_a (velocidad de unión inicial) frente a G1.

Tabla 2– Constantes cinéticas para la P-selectina

Anticuerpo	k_a ($\times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_d ($\times 10^{-2}\text{s}^{-1}$)	KD (nM)	Res. SD (RU)
G1	6,32 +/- 2	5,6 +/- 2	8,94 +/- 3	3,39
SelG1	2,22 +/- 1	1,306 +/- 6	5,89 +/- 2	4,48

Los anticuerpos de los conceptos inventivos descritos en la presente proporcionados mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente se usan preferiblemente en la fabricación de una composición farmacéutica para uso en el tratamiento terapéutico de una afección patológica, en donde dicho tratamiento comprende administrar la composición farmacéutica para mitigar, revertir o inhibir una respuesta inflamatoria o trombosis u otra condición.

5 Es un objetivo importante de los conceptos inventivos descritos en la presente utilizar los anticuerpos, o fragmentos funcionalmente activos o variantes de dichos anticuerpos para la fabricación de una composición farmacéutica y su uso en la prevención y/o tratamiento de respuestas o enfermedades inflamatorias. o trombosis tales como sin limitación, las descritas en la presente.

10 Por ejemplo, los conceptos de la invención descritos en particular se dirigen, pero no se limitan a, usando anticuerpos anti-P-selectina de función dual o fragmentos de anticuerpos como se describen e identifican aquí en tratamientos para condiciones inflamatorias, trombóticas o de otro tipo o trastornos en primates (incluidos humanos) que implican plaquetas, glóbulos rojos falciformes, leucocitos, linfocitos y/o adhesión de células endoteliales, donde la afección o trastorno comprende o está asociado con (pero no se limita a) al menos uno de los dolores vasooclusivos de células falciformes crisis, enfermedad inflamatoria del intestino (p. ej., enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enteritis), artritis (p. ej., artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica), rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, psoriasis, dermatitis, sepsis, nefritis, lupus eritematoso, esclerodermia, rinitis, anafilaxis, diabetes, esclerosis múltiple, aterosclerosis, trombosis, metástasis tumoral, reacciones alérgicas, tiroiditis, lesión por reperfusión isquémica (p. ej., por infarto de miocardio, ictus o trasplante de órgano) y afecciones asociadas con traumatismo extenso o inflamación crónica, como por ejemplo, hipersensibilidad retardada tipo IV, asociada por ejemplo con infección por bacilos tuberculosos, o síndrome de respuesta inflamatoria sistemática o falla orgánica múltiple. El término "primate" tal como se usa en la presente se refiere a humanos, monos, incluyendo mandriles y monos cynomolgus, y simios, incluyendo los últimos chimpancés, gorilas, gibones y orangutanes, por ejemplo. Otras afecciones patológicas no enumeradas en la presente memoria, pero que se refieren a afecciones o descripciones inflamatorias o trombóticas también se pueden tratar usando los anticuerpos y las composiciones descritas en este documento.

25 En la composición farmacéutica de un medicamento de acuerdo con los conceptos inventivos descritos en la presente, los anticuerpos se pueden formular mediante cualquiera de los métodos establecidos para formular composiciones farmacéuticas, por ejemplo, como se describe en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences o se describe en otra parte de la presente. La composición puede estar típicamente en una forma adecuada para inyección o infusión local o sistémica y, como tal, puede formularse con agua estéril o una solución salina o glucosa isotónica. Las composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, que son bien conocidas en la técnica. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso o filtrarse en condiciones asépticas y liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con la solución acuosa estéril antes de la administración. La composición puede contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximar condiciones fisiológicas, tales como agentes tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad y similares, por ejemplo acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc. La concentración de proteínas puede variar ampliamente, por ejemplo, desde menos de aproximadamente 0,01% hasta tanto como 15–20% o más en peso. Una dosificación unitaria de la composición puede contener, por ejemplo, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1000 mg de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

40 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de los conceptos inventivos divulgados en el presente pueden administrarse por vía tópica o mediante inyección. Las dosis serán prescritas por el médico de acuerdo con la condición particular y la persona en particular a ser tratada. Las dosis y la frecuencia se adaptan y ajustan cuidadosamente de acuerdo con los parámetros determinados por el médico a cargo. Las vías de administración preferidas pueden ser orales, por inhalación, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratraqueal, intravesical o intraperitoneal, y pueden administrarse por 24 a 48 horas, o por semana, cada 14 días, cada 4 semanas, por ejemplo, en el rango de 0,01 a 1000 mg, especialmente de 0,1 mg a 100 mg, en particular de 1 a 10 mg por kg de peso corporal. La dosis puede administrarse continuamente a través de un catéter o en bolos individuales. El anticuerpo de la invención se puede administrar en una cantidad eficaz tal como, pero sin limitación, los intervalos entre 1 ng/kg y 1 µg/kg, de 0,01 µg/kg a 50 µg/kg, de 0,1 µg/kg a 1 µg/kg, 1 µg/kg a 5 µg/kg, 5 µg/kg a 10 µg/kg, 10 µg/kg a 50 µg/kg, 50 µg/kg a 100 µg/kg, 100 mg/kg a 1 mg/kg, 1 mg/kg a 10 mg/kg o 10 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal.

55 Las composiciones farmacéuticas usadas en los conceptos inventivos descritos en la presente que comprenden anticuerpos descritos en la presente pueden complementarse adicionalmente con otros compuestos terapéuticos que son prescritos rutinariamente por el médico de acuerdo con la afección particular y de acuerdo con el individuo particular a tratar tal como un fármaco antiinflamatorio, en donde dichos medicamentos son prescritos por el médico de acuerdo con la afección particular y en función del individuo particular a tratar.

- Como se observa en otra parte de la presente memoria, el fenómeno de la unión de P-selectina/PSGL-1 tiene importancia funcional en las interacciones de células rojas, leucocitos de células endoteliales y plaquetas falciformes, y/o adhesión de microvesículas, laminación de leucocitos, reclutamiento, agregación; secreción de leucocitos de citoquinas; promoción de la coagulación; y otros aspectos de la inflamación, trombosis, coagulación, respuesta inmune y transducción de señales que incluyen, pero no se limitan a, la crisis de dolor vasooclusivo drepanocítico, enfermedad inflamatoria intestinal, (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enteritis), artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica), rechazo de injertos, enfermedad de injerto contra huésped, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, psoriasis, dermatitis, sepsis, nefritis, lupus eritematoso, esclerodermia, rinitis, anafilaxia, diabetes, esclerosis múltiple, aterosclerosis, trombosis, metástasis tumoral, reacciones alérgicas, tiroiditis, lesión por reperfusión isquémica (p. ej., debido a infarto de miocardio, accidente cerebrovascular o trasplante de órgano y afecciones asociadas con traumatismo extenso, o inflamación crónica, tales como, por ejemplo, hipersensibilidad retardada de tipo IV, asociada por ejemplo con infección por bacilos tuberculosos, o síndrome de respuesta inflamatoria sistemática, o falla orgánica múltiple. Un anticuerpo neutralizante (o fragmento del mismo) a P-selectina como se describe en el presente documento inhibirá una o más de estas actividades en un paciente como mediado a través de la unión al receptor de P-selectina/PSGL-1. [0159] (o en el caso de glóbulos rojos falciformes, la unión al receptor de tipo P-selectina/PSGL-1), in vivo o in vitro, por ejemplo. Por lo tanto, la inhibición de la unión de P-selectina/PSGL-1 con un anticuerpo neutralizante (o fragmento del mismo) descrito en este documento es útil en el tratamiento en un paciente de diversas afecciones y trastornos que incluyen, pero sin limitación, los descritos aquí.
- Los anticuerpos específicos de P-selectina o los fragmentos de unión descritos en la presente pueden unirse a otra molécula. Por ejemplo, los anticuerpos pueden estar unidos a otro péptido o proteína, toxina, radioisótopo, agentes citotóxicos o citostáticos. Los anticuerpos se pueden unir covalentemente mediante reticulación química o mediante métodos recombinantes. Los anticuerpos también se pueden unir a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera que se establece en las patentes de Estados Unidos números 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192; o 4.179.337. Los anticuerpos se pueden modificar químicamente mediante conjugación covalente a un polímero, por ejemplo, para aumentar su estabilidad o semivida. Los ejemplos de polímeros y métodos para unirlos también se muestran en la patente de los EE. UU. Ntos. 4.766.106; 4.179.337; 4.495.285; y 4.609.546.
- Los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) también pueden marcarse con una etiqueta detectable. Una etiqueta detectable es una molécula que, por su naturaleza química, proporciona una señal analíticamente identificable que permite la detección de una interacción molecular. Una proteína, incluyendo un anticuerpo, tiene una etiqueta detectable si está unida covalentemente o no covalentemente a una molécula que puede detectarse directamente (por ejemplo, por medio de un cromóforo, fluoróforo o radioisótopo) o indirectamente (por ejemplo, mediante catalizar una reacción que produce un producto coloreado, luminiscente o fluorescente). Las etiquetas detectables incluyen un radiomarcador tal como ¹³¹I o ⁹⁹Tc, un metal pesado, o un sustrato fluorescente, tal como Europium, por ejemplo, que también puede unirse a anticuerpos usando química convencional. Las etiquetas detectables también incluyen etiquetas enzimáticas tales como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Los marcadores detectables incluyen además restos químicos tales como biotina, que pueden detectarse mediante unión a un resto detectable afín específico, por ejemplo, avidina marcada.
- Los conceptos inventivos descritos actualmente también se dirigen a métodos de selección para anticuerpos anti-P-selectina y fragmentos de unión de los mismos que bloquean tanto la unión a P-selectina/PSGL-1 y/o que causan disociación de P-selectina preformada/Complejos PSGL-1.
- Como se indicó anteriormente, los conceptos de la invención descritos actualmente se dirigen a anticuerpos contra P-selectina, células huésped que producen tales anticuerpos anti-selectina P, vectores que contienen ADN que codifican dicha expresión de anticuerpos anti-P-selectina y métodos de cribado para identificar anticuerpos anti-P-selectina que bloquean la unión de P-selectina/PSGL-1 y en una realización adicional tiene una "función dual" que también provoca la disociación del complejo P-selectina/PSGL-1 preformado. Por lo tanto, en una realización, los conceptos inventivos descritos actualmente se dirigen a métodos para identificar anticuerpos anti-P-selectina que se unen específicamente a un epítipo conformacional en los aminoácidos 1-35, y más preferiblemente en los aminoácidos 4-23, de P-selectina humana (SEQ ID NO: 1) (tal como el epítipo conformacional descrito en la presente) y que bloquea PSGL-1, o miméticos de la misma, de unión a P-selectina, y que puede invertir dicha unión a la misma, exhibiendo así un doble funcionamiento en el bloqueo de la adhesión mediada por selectina debido a la unión de P-selectina/PSGL-1 y en la causa de la disociación de complejos de P-selectina/PSGL-1 preformados
- El método de cribado en realizaciones preferidas comprende ensayos in vitro basados en fluido y/o basados en sustrato que pueden usarse para identificar anticuerpos anti-selectina P o fragmentos de los mismos que inhiben o anulan la unión a P-selectina/PSGL-1 y preferiblemente también causa disociación de complejos preformados de P-selectina/PSGL-1. Los anticuerpos de prueba se pueden rastrear para la capacidad de doble función con una serie de ensayos tales como, entre otros, los descritos en la presente que identificarán aquellos anticuerpos que se unen a un epítipo conformacional dentro de los aminoácidos 1-35, y más particularmente dentro de los aminoácidos

4 -23, de P-selectina, y que bloquean la unión del ligando de PSGL-1 a la P-selectina, y que preferiblemente causa la disociación de los complejos de P-selectina/PSGL-1 preformados. No se ha demostrado hasta ahora que los anticuerpos anti-P-selectina tengan la capacidad tanto de bloquear la unión de PSGL-1 a selectina-P como de provocar la disociación de los complejos de P-selectina/PSGL-1 preformados. Cuando se usa aquí, el término "anticuerpo de prueba" se refiere a anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpos. El anticuerpo de prueba puede ser un miembro de una biblioteca (por ejemplo, fago, levadura o bacteria) o un fragmento de anticuerpo en una biblioteca. La biblioteca podría restarse eliminando todos los miembros que unen epítopos no deseados.

En una primera etapa del método de selección, por ejemplo, los anticuerpos de prueba generados contra P-selectina se analizan en cuanto a la capacidad de bloquear la unión de PSGL-1 a P-selectina. Los anticuerpos de prueba que bloquean la unión de PSGL-1 a P-selectina se criban para determinar su capacidad para provocar la disociación de complejos de P-selectina/PSGL-1 preformados. Los anticuerpos de prueba identificados que tienen una doble función de bloqueo tanto de la unión de PSGL-1 a P-selectina, como de la disociación del complejo P-selectina/PSGL-1 comprenden realizaciones particularmente preferidas de los conceptos inventivos descritos actualmente y pueden usarse en los métodos de la actualmente se divulgan conceptos inventivos. Los ejemplos de realizaciones basadas en fluidos de los ensayos incluyen sin limitación, (1) ensayos FACS basados en células con leucocitos o plaquetas HL60/activadas que miden agregados celulares que han sido o no han estado expuestos a un anticuerpo capaz de unirse a P-selectina (por ejemplo, hSel001) o a un anticuerpo de prueba para demostrar la disociación del complejo PSGL-1/P-selectina, (2) un ensayo de base líquida basado en una P-selectina/GSP-6-estreptavidina-complejo de biotina que tiene o no ha estado expuesto a un anticuerpo capaz de unirse a P-selectina (p. ej., hSel001) o a un anticuerpo de prueba, y medido con SEC (cromatografía de exclusión de tamaño) y (3) uso de un cordón de AlphaLisa como un sustrato pero se usa en un ensayo basado en líquido.

En una realización del método, los anticuerpos de prueba que bloquean la unión de PSGL-1 a P-selectina se identifican primero usando un ensayo de selección. Por ejemplo, en una realización preferida del ensayo de selección, se proporciona PSGL-1 o un mimético de PSGL-1 sintético tal como GSP-6, o una porción de epítipo terminal de PSGL-1 capaz de unirse a P-selectina (y opcionalmente es unido a un sustrato de soporte tal como un chip BIACORE), en un método conocido por las personas con experiencia normal en la técnica. El PSGL-1 (o el mimético de PSGL-1) (que puede estar unido al sustrato) se expone entonces a un complejo de anticuerpo de prueba anti-P-selectina/P-selectina. El grado de unión del complejo al PSGL-1-sustrato se evalúa a continuación. Si el complejo de anticuerpo de prueba/P-selectina no se une al PSGL-1, el anticuerpo de prueba se identifica como un anticuerpo "bloqueador de función". El mimético de GSP-6 o PSGL-1, en una realización, está unido a biotina. El complejo GSP-6/mimético-biotina en sí mismo puede estar unido a un revestimiento de estreptavidina en el sustrato, por ejemplo.

En otra realización del ensayo de selección, se proporciona P-selectina, o una porción de la misma que mantiene la integridad del epítipo conformacional, y como anteriormente, está opcionalmente unida al sustrato de soporte. Por ejemplo, una porción de P-selectina que mantiene el epítipo conformacional incluye, pero no se limita a, la secuencia que comprende los dominios de unión a lectina y EGF de P-selectina (por ejemplo, aminoácidos 1-153 de SEQ ID NO: 1). En esta realización, la P-selectina o parte de la misma con el epítipo conformacional se expone al anticuerpo de prueba, que se une para formar el complejo P-selectina-anticuerpo. A continuación, PSGL-1, o un mimético de alto peso molecular del mismo, tal como un complejo GSP-6/biotina/avidina, se expone al complejo P-selectina/anticuerpo de prueba y al grado de unión de PSGL-1 (o el mimético) al mismo es evaluado. Un anticuerpo que previene o inhibe la unión de PSGL-1 al complejo P-selectina/anticuerpo se identifica como un anticuerpo "bloqueador de función".

En otra realización del ensayo de selección, PSGL-1 o un mimético del mismo se une, como se describió en lo que precede, a un sustrato de soporte (tal como un cordón o chip BIACORE). La selectina P se aplica después al PSGL-1/sustrato para formar el complejo P-selectina/PSGL-1 (o mimético). El anticuerpo de prueba se aplica luego y la disociación del complejo se mide como una disminución en la masa o como unidades de respuesta (RU) ya que la selectina P se está disociando. Un anticuerpo anti-P-selectina que bloquea la función, que induce la disociación del complejo P-selectina/PSGL-1, se designa como un anticuerpo de doble función anti-P-selectina.

En una realización alternativa de este ensayo de selección, la P-selectina o una porción de P-selectina que comprende un epítipo conformacional pueden unirse a un sustrato de soporte en lugar de a PSGL-1. El PSGL-1 o un mimético de alto peso molecular del mismo, tal como un complejo GSP-6/biotina/avidina, se expone después a la P-selectina sobre el sustrato de soporte y se deja formar un complejo de PSGL-1/P-selectina. El complejo de PSGL-1/P-selectina se expone a continuación a un anticuerpo anti-P-selectina que bloquea la función y se evalúa la disociación del complejo, por ejemplo, usando un método BIACORE como se describe en otra parte de este documento.

En otra realización más del ensayo, el propio anticuerpo anti-P-selectina se une al sustrato de soporte, y se expone a él un complejo P-selectina/PSGL-1, y la disociación del mismo se mide como anteriormente

5 Aunque los conceptos inventivos descritos actualmente y las ventajas de los mismos se han descrito en detalle, debe entenderse que pueden realizarse diversos cambios, sustituciones y alteraciones en la presente memoria sin apartarse del espíritu y alcance de los conceptos inventivos descritos en la presente memoria como se definen en la presente memoria. Además, no se pretende que el alcance de la presente solicitud se limite a las realizaciones
 10 particulares del proceso, artículos de fabricación, composiciones de materia, medios, métodos y etapas descritos en la presente. Como un experto en la técnica apreciará fácilmente a partir de la presente descripción, procesos, artículos de fabricación, composiciones de materia, medios, métodos o pasos, actualmente existentes o posteriores a desarrollar que realizan sustancialmente la misma función o lograr sustancialmente el mismo resultado que las realizaciones correspondientes descritas en la presente memoria se pueden utilizar de acuerdo con los conceptos inventivos descritos actualmente. Por consiguiente, la invención descrita en este documento pretende incluir dentro de su alcance tales procesos, artículos de fabricación, composiciones de material, medios, métodos o etapas.

Cada una de las referencias, patentes o publicaciones mencionadas en la presente, inclusive sin limitación los documentos de los EE. UU. con números de serie 12/974.539; 12/974.739; 12/516.987; y WO 2008/069999, se incorpora expresamente en la presente como referencia en su totalidad.

15 Referencias citadas

1. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 1994. 76:301–314. PubMed: 7507411.
2. McEver RP, Moore KL, Cummings RD. Leukocyte trafficking mediated by selectin–carbohydrate interactions. *J Biol Chem.*, 1995. 12:270(19):11025–8. Review. PMID: 7538108.
- 20 3. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Adhesion and signaling in vascular cell–cell interactions. *J Clin Invest.*, 1996. 15:98(8):1699–702. No abstract available. PMID: 8878418.
4. Frenette PS. Sick cell vasoocclusion: heterotypic, multicellular aggregations driven by leukocyte adhesion. *Microcirculation*, 2004. 11(2):167–77. Review. PMID: 15280090.
- 25 5. Weyrich AS, Ma XY, Lefer DJ, Albertine KH, Lefer AM. In vivo neutralization of P–selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest.*, 1993. 91(6):2620–9. PMID: 7685773.
6. Lefer DJ. Pharmacology of selectin inhibitors in ischemia/reperfusion states. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 2000. 40:283–94. Review. PMID: 10836137.
- 30 7. Singbartl K, Green SA, Ley K. Blocking P–selectin protects from ischemia/reperfusion–induced acute renal failure. *FASEB J.*, 2000. 14(1):48–54. PMID: 10627279.
8. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P–selectin on adherent platelets. *Nature*, 1992. 29:359(6398):848–51. PMID: 1279433.
- 35 9. Burger PC, Wagner DD. Platelet P–selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood*, 2003. 1;101(7):2661–6. Epub 2002 Dec 12. PMID: 12480714.
10. Théorêt JF, Bienvenu JG, Kumar A, Merhi Y. P–selectin antagonism with recombinant p–selectin glycoprotein ligand–1 (rPSGL–Ig) inhibits circulating activated platelet binding to neutrophils induced by damaged arterial surfaces. *J Pharmacol Exp Ther.*, 2001. 298(2):658–64. PMID: 11454928.
- 40 11. Kumar A, Villani MP, Patel UK, Keith JC Jr, Schaub RG. Recombinant soluble form of PSGL–1 accelerates thrombolysis and prevents reocclusion in a porcine model. *Circulation*, 1999. 16;99(10):1363–9. PMID: 10077522.
12. Romano SJ. Selectin antagonists: therapeutic potential in asthma and COPD. *Treat Respir Med.*, 2005. 4(2):85–94. Review. PMID: 15813660.
- 45 13. Grober JS, Bowen BL, Ebling H, Athey B, Thompson CB, Fox DA, Stoolman LM. Monocyte–endothelial adhesion in chronic rheumatoid arthritis. In situ detection of selectin and integrin–dependent interactions. *J Clin Invest.*, 1993. 91(6):2609–19. PMID: 7685772.

14. Friedrich M, Bock D, Philipp S, Ludwig N, Sabat R, Wolk K, Schroeter–Maas S, Aydt E, Kang S, Dam TN, Zahlten R, Sterry W, Wolff G. Pan–selectin antagonism improves psoriasis manifestation in mice and man. *Arch Dermatol Res.*, 2006. 297(8):345–51. Epub 2005 Dec 16. PMID: 16362415.
- 5 15. Johnson BA, Haines GK, Harlow LA, Koch AE. Adhesion molecule expression in human synovial tissue. *Arthritis Rheum*, 1993. 36(2):137–46. PMID: 7679271.
16. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest.*, 1993. 91(2):379–87. Review. PMID: 7679406.
17. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall–Carlson L, Bainton DF. GMP–140, a platelet alpha–granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel–Palade bodies. *J Clin Invest.*, 1989. 84(1):92–9. PMID: 2472431.
- 10 18. Sickle cell disease: screening, diagnosis, management, and counseling in newborns and infants. Clinical Practice Guideline No. 6. AHCPR Pub. No. 93–0562. Rockville, MD: Agency for Health Care Policy and Research, Public Health Service, U. S. Department of Health and Human Services. April 1993 [cited; Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=hstat6.chapter.16946].
- 15 19. Nietert, PJ, Silverstein MD, Abboud MR. Sickle cell anaemia: epidemiology and cost of illness. *Pharmacoeconomics*, 2002. 20(6): p. 357–66. PMID: 12052095.
20. Bookchin, RM and Lew VL. Pathophysiology of sickle cell anemia. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1996. 10(6): p. 1241–53. PMID: 8956013.
21. NHLBI. [cited; Available from: www.nhlbi.nih.gov/health/dci/Diseases/Sca/SCA_WhatIs.html].
22. NHLBI, The Management of Sickle Cell Disease. NIH Publication No.022117.
- 20 23. FDA Approves Droxia for Sickle Cell Anemia, in FDA Talk Paper. 1998. p. T98–11.
24. NIH, Hydroxurea Treatment for Sickle Cell Disease February 25–27 2008. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement, February 27 2008.
- 25 25. Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Grover R, Pegelow CH, Vichinsky E. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*, 1995. 86(2): p. 776–83. PMID: 7921116.
26. Ashley–Koch A, Yang Q, and Olney RS. Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, 2000. 151(9): p. 839–45. PMID: 10797557.
27. Thomas PW, Higgs DR, and Serjeant GR. Benign clinical course in homozygous sickle cell disease: a search for predictors. *J Clin Epidemiol*, 1997. Feb;50(2): p. 121–6. PMID: 9120504.
- 30 28. National Newborn Screening Status Report Updated 03/04/08.
29. Rice–Evans C, Omorphos SC, and Baysal E. Sickle cell membranes and oxidative damage. *Biochem J*, 1986. 237(1): p. 265–9. PMID: 3800879.
- 30 30. Wethers, D.L., Sickle cell disease in childhood: Part II. Diagnosis and treatment of major complications and recent advances in treatment. *Am Fam Physician*. 2000 Sep 15;62(6):1309–14. PMID: 11011859.
- 35 31. Gladwin MT, Sachev V, Jison ML, Shizukuda Y, Plehn JF, Minter K, Brown B, Coles WA, Nichols JS, Ernst I, Hunter LA, Blackwelder WC, Schechter AN, Rodgers GP, Castro O, Ognibene FP, Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med*, 2004. 350(9): p. 886–95. PMID: 14985486.
- 40 32. Saborio P and Scheinman JI, Sickle cell nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 1999. 10(1): p. 187–92. PMID: 9890326.
33. Charache S, Eye disease in sickling disorders. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1996. 10(6): p. 1357–62. PMID: 8956022.

34. Kaul, DK, Liu XD, Fabry ME, Nagel RL. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in transgenic sickle mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. 278(6): p. H1799–806. PMID: 10843875.
35. Nolan, VG, Adewoye A, Baldwin C, Wang L, Ma Q, Wyszynski DF, Farrell JJ, Sebastiani P, Parrer LA, Steinberg MH. Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF-beta/BMP pathway. *Br J Haematol*, 2006. 133(5): p. 570–8. PMID: 1661647.
36. Nolan, VG, Wyszynski DF, Farrer LA, Steinberg MH. Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. *Blood*, 2005. 106(9): p. 3264–7. PMID: 15985542.
37. Gladwin MT and Kato GJ. Cardiopulmonary complications of sickle cell disease: role of nitric oxide and hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2005: p. 51–7. PMID: 16304359.
38. Yale, SH, Nagib N, and Guthrie T. Approach to the vaso-occlusive crisis in adults with sickle cell disease. *Am Fam Physician*, 2000. 61(5): p. 1349–56, 1363–4. PMID: 10735342.
39. Heegaard, ED and Brown KE. Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev*, 2002. 15(3): p. 485–505. PMID: 12097253.
40. Ballas, SK and Mohandas N. Pathophysiology of vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1996. 10(6): p. 1221–39. PMID: 8956012.
41. Embury, SH. The not-so-simple process of sickle cell vasoocclusion. *Microcirculation*, 2004. 11(2): p. 101–13. PMID: 15280086.
42. Conran N and Costa FF. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clin Biochem*, 2009. 42(18): p. 1824–38. PMID: 19580799.
43. Chiang EY and Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2005. 19(5): p. 771–84, Review. PMID: 16214643.
44. Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Freette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(5): p. 3047–51. PMID: 1180644.
45. Hebbel RP, Osarogiagbon R, and Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation*, 2004. 11(2): p. 129–51. Review. PMID: 15280088.
46. Okpala I, Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. *Curr Opin Hematol*, 2006. 13(1): p. 40–4. Review. PMID: 16319686.
47. Matsui NM, Borsig L, Rosen SD, Yaghmai M, Varki A, Embury SH P-selectin mediates the adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. *Blood*, 2001. 98(6): p. 1955–62. PMID: 11535535.
48. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, Klug PP. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*, 1994. 330(23): p. 1639–44. PMID: 7993409.
49. Smith JA. Bone disorders in sickle cell disease. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1996. 10(6): p. 1345–56. Review. PMID: 8956021.
50. Platt OS. Prevention and management of stroke in sickle cell anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2006: p. 54–7. Review. PMID: 17124040.
51. Maitre B, Habibi A, Roudot-Thoraval F, Bachir D, Belghiti DD, Galacteros F, Godeau B. Acute chest syndrome in adults with sickle cell disease. *Chest*, 2000. 117(5): p. 1386–92. PMID: 1087826.
52. Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, Nickerson B, Orringer E, McKie V, Bellevue R, Daeschner C, Mancini EA. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. *N Engl J Med*, 2000. 342(25): p. 1855–65. PMID: 10861320.
53. Serjeant GR, Ceulaer CD, Lethbridge R, Morris J, Singhal A, Thomas PW. The painful crisis of homozygous sickle cell disease: clinical features. *Br J Haematol*, 1994. 87(3): p. 586–91. PMID: 7993801.

54. Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, Kinney TR. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med*, 1991. 325(1): p. 11–6. PMID: 1710777.
55. Health Advances, LLC. Application of Selexys Technologies to Inflammatory and Thrombotic Diseases. In Private Study. 2004.
- 5 56. McClish DK, Health related quality of life in sickle cell patients: the PiSCES project. *Health Qual Life Outcomes*, 2005. 3: p. 50. PMID: 16129027.
57. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, McMahon RP, Bonds DR. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med*, 1995. 332(20): p. 1317–22. PMID: 7715639.
- 10 58. Patient Information Leaflet: Droxia. Bristol–Myers Squibb Company, 2006.
59. NIH. NIH State–of–the–Science Conference Statement on Hydroxyurea Treatment for Sickle Cell Disease. NIH Consensus and State–of –the Science Statements; February 27–29, 2008. 25(1):1–30. PMID: 18309362.
60. Hydroxyurea for the Treatment of Sickle Cell Disease, Agency for Healthcare Research and Quality; AHRQ Publication No. 08–E007. Feb. 2008.
- 15 61. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, Koopmeiners L, Key NS, Hebbel RP. Sickle blood contains tissue factor–positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*, 2003. 102(7): p. 2678–83. PMID: 12805058.
62. Solovey A, Gui L, Key NS, Hebbel RP. Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. *J Clin Invest*, 1998. 101(9): p. 1899–904. PMID: 9576754.
- 20 63. Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med*, 1997. 337(22): p. 1584–90. PMID: 9371854.
64. Kaul DK and Hebbel RP. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest*, 2000. 106(3): p. 411–20. PMID: 10930444.
- 25 65. Matsumoto S, Okabe Y, Setoyama H, Takayama K, Ohtsuka J, Funahashi H, Imaoka A, Okada Y, and Umesaki Y. Inflammatory bowel disease–like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. *Gut*, 1998. 43:71–78. PMID: 9771408.
66. Kosiewicz MM, Nast CC, Krishnan A, Rivera–Nieves J, Moskaluk CA, Matsumoto S, Kozaiwa K, and Cominelli F. Th1–type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn’s disease. *J. Clin. Invest.*, 2001 107:695–702. PMID: 11254669.
- 30 67. Rivera–Nieves J, Burcin TL, Olson TS, Morris MA, McDuffie M, Cominelli R and Ley K. Critical role of endothelial P–selectin glycoprotein ligand 1 in chronic murine ileitis. *JEM*, 2006. 203 (4): 907–917. PMID: 16567389.
68. Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DF, Cummings RD, Varki A, McEver RP. Identification of a specific glycoprotein ligand for P– selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol*, 1992;118:445–456. PMID: 1378449.
- 35 69. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL–1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest*, 1997;100:S97–103. PMID: 9413410.
70. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*, 1996;88:3259–3287. PMID: 8896391.
- 40 71. Somers WS, Tang J, Shaw GD, Camphausen RT. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P– and E–selectin bound to SLe(X) and PSGL–1. *Cell*, 2000. Oct 27;103(3):467–79. Erratum in: *Cell*, 2001. Jun 29;105(7):971. PMID: 11081633.
72. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin–deficient mice. *Cell*, 1993. Aug 13;74(3):541–54. PMID: 7688665.

73. Xia L, Sperandio M, Yago T, McDaniel JM, Cummings RD, Pearson-White S, Ley K, McEver RP. P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow. *J Clin Invest*, 2002. 109:939-950. PMID: 11927621.
- 5 74. Yang J, Hirata T, Croce K, Merrill-Skoloff G, Tchernychev B, Williams E, Flaumenhaft R, Furie BC, Furie B. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J Exp Med*, 1999. Dec 20;190 (12):1769-82. PMID: 10601352
- 10 75. Walcheck B, Moore KL, McEver RP, and Kishimoto TK. Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation on P-selectin in vitro. *J. Clin. Invest.*, 1996. 98:1081-1087. PMID: 8787668.
76. Bargatze RF, Kurk S, Butcher EC, Jutila MA. Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J Exp Med.*, 1994. Nov 1;180(5):1785-92. PMID: 7525838.
- 15 77. Jung U and Ley K. Mice Lacking Two or All Three Selectins Demonstrate Overlapping and Distinct Functions for Each Selectin. *J. Immunol.*, 1999. 162: 6755-6762. PMID: 10352295.
78. Antibody Engineering, 2nd edition., Borrebaeck CA, Ed., Oxford University Press (1995).
79. Sambrook J and Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
- 20 80. Bodansky M and Bodansky A. *The Practice of Peptide Synthesis*, 2nd edition., Springer-Verlag, Berlin. 1995.
81. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 1990. 215:403-410 PMID: 2231712.
82. Needleman SB, Wunsch CD. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.*, 1970. 48(3):444-453 PMID: 5420325.
- 25 83. Meyers EW and Miller W. Optimal alignments in linear space. *Comput. Appl. Biosci.*, 1988. 4(1):11-17. PMID: 3382986.
84. Tatusova TA and Madden TL. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999. 174(2):247-250. PMID: 10339815.
- 30 85. Kohler G and Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975. 256(5517): 495-7. PMID: 1172191.
86. Ausubel FM. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989).
87. Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R. Biochemical transfer of single-copy eukaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell*, 1978. 14(3):725-31. PMID: 210957.
- 35 88. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. *EMBO*, 1982. J. 1(7):841-5. PMID: 6329708.
89. Harlow E and Lane D. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1988.
- 40 90. Geng JG, Moore KL, Johnson AE, McEver RP. Neutrophil recognition requires a Ca²⁺-induced conformational change in the lectin domain of GMP-140. *J. Biol. Chem.*, 1991. 266(33): 22313-22318. PMID: 1718992.
91. Mehta P, Patel KD, Laue TM, Erickson HP, McEver RP. Soluble monomeric P-selectin containing only the lectin and epidermal growth factor domains binds to P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocytes. *Blood*, 1997. Sep. 15; 90(6): 2381-9. PMID: 9310489.

92. Hirose M, Kawashima H, Miyasaka M. A functional epitope on P-selectin that supports binding of P-selectin to P-selectin glycoprotein ligand-1 but not to sialyl Lewis X oligosaccharides. *Int. Immunol.*, 1998. May; 10(5): 639-49. PMID: 9645612.
- 5 93. Ruchaud-Sparangano MH, Malaud E, Gayet O, Chignier E, Buckland R, McGregor JL. Mapping the epitope of a functional P-selectin monoclonal antibody (LYP20) to a short complement-like repeat (SCR 4) domain: use of human-mouse chimera and homologue-replacement mutagenesis. *Biochem. J.*, 1998. 1;332(Pt2):309-14. PMID: 9601057.
94. Chestnut, RW, Polley, MJ, Paulson, JC, Hones, T, Saldanha, JW, Bendig, MM, Kriegler, M. Perez, C, Bayer, R Nunn, M. Antibodies to P-selectin and Their Uses. U. S. Patent No. 5,800,815. Sep. 1, 1998.
- 10 95. Berg EL, Fromm C, Melrose J, Tsurushita N. Antibodies cross-reactive with E- and P-selectin block both E- and P-selectin functions. *Blood*, 1995. Jan 1;85(1):31-7. PMID: 7528571.
96. Leppanen A, Mehta P, Ouyang YB, Ju T, Helin J, Moore KL, van Die I, Canfield WM, McEver RP, Cummings RD. 1999. A novel glycosulfopeptide binds to P-selectin and inhibits leukocyte adhesion to P-selectin. *J Biol Chem* Aug 27;274(35):24838-48. PMID: 10455156.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Selexys Pharmaceuticals Corporation Oklahoma Medical Research Foundation Rollins, Scott Alvarez, Richard Rother, Russell Kawar, Ziad S. McEver, Rodger P.

<120> ANTICUERPOS ANTI-P-SELECTINA Y MÉTODOS DE SU USO E IDENTIFICACIÓN

5 <130> 7149.015wo

<150> 61/529.682

<151> 2011-08-31

10 <150> 12/974.739

<151> 2010-12-21

<160> 10

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 279

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 676 570 T3

Trp Thr Tyr His Tyr Ser Thr Lys Ala Tyr Ser Trp Asn Ile Ser Arg
 1 5 10 15

Lys Tyr Cys Gln Asn Arg Tyr Thr Asp Leu Val Ala Ile Gln Asn Lys
 20 25 30

Asn Glu Ile Asp Tyr Leu Asn Lys Val Leu Pro Tyr Tyr Ser Ser Tyr
 35 40 45

Tyr Trp Ile Gly Ile Arg Lys Asn Asn Lys Thr Trp Thr Trp Val Gly
 50 55 60

Thr Lys Lys Ala Leu Thr Asn Glu Ala Glu Asn Trp Ala Asp Asn Glu
 65 70 75 80

Pro Asn Asn Lys Arg Asn Asn Glu Asp Cys Val Glu Ile Tyr Ile Lys
 85 90 95

Ser Pro Ser Ala Pro Gly Lys Trp Asn Asp Glu His Cys Leu Lys Lys
 100 105 110

Lys His Ala Leu Cys Tyr Thr Ala Ser Cys Gln Asp Met Ser Cys Ser
 115 120 125

ES 2 676 570 T3

Lys Gln Gly Glu Cys Leu Glu Thr Ile Gly Asn Tyr Thr Cys Ser Cys
 130 135 140
 Tyr Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Glu Cys Glu Tyr Val Arg Glu Cys Gly
 145 150 155 160
 Glu Leu Glu Leu Pro Gln His Val Leu Met Asn Cys Ser His Pro Leu
 165 170 175
 Gly Asn Phe Ser Phe Asn Ser Gln Cys Ser Phe His Cys Thr Asp Gly
 180 185 190
 Tyr Gln Val Asn Gly Pro Ser Lys Leu Glu Cys Leu Ala Ser Gly Ile
 195 200 205
 Trp Thr Asn Lys Pro Pro Gln Cys Leu Ala Ala Gln Cys Pro Pro Leu
 210 215 220
 Lys Ile Pro Glu Arg Gly Asn Met Thr Cys Leu His Ser Ala Lys Ala
 225 230 235 240
 Phe Gln His Gln Ser Ser Cys Ser Phe Ser Cys Glu Glu Gly Phe Ala
 245 250 255
 Leu Val Gly Pro Glu Val Val Gln Cys Thr Ala Ser Gly Val Trp Thr
 260 265 270
 Ala Pro Ala Pro Val Cys Lys
 275

<210> 2

<211> 282

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

ES 2 676 570 T3

Trp Thr Tyr Asn Tyr Ser Thr Lys Ala Tyr Ser Trp Asn Asn Ser Arg
1 5 10 15

Val Phe Cys Arg Arg His Phe Thr Asp Leu Val Ala Ile Gln Asn Lys
20 25 30

Asn Glu Ile Ala His Leu Asn Asp Val Ile Pro Phe Phe Asn Ser Tyr
35 40 45

Tyr Trp Ile Gly Ile Arg Lys Ile Asn Asn Lys Trp Thr Trp Val Gly
50 55 60

ES 2 676 570 T3

Thr Asn Lys Thr Leu Thr Glu Glu Ala Glu Asn Trp Ala Asp Asn Glu
 65 70 75 80
 Pro Asn Asn Lys Lys Asn Asn Gln Asp Cys Val Glu Ile Tyr Ile Lys
 85 90 95
 Ser Asn Ser Ala Pro Gly Lys Trp Asn Asp Glu Pro Cys Phe Lys Arg
 100 105 110
 Lys Arg Ala Leu Cys Tyr Thr Ala Ser Cys Gln Asp Met Ser Cys Ser
 115 120 125
 Asn Gln Gly Glu Cys Ile Glu Thr Ile Gly Ser Tyr Thr Cys Ser Cys
 130 135 140
 Tyr Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Glu Cys Glu Tyr Val Lys Glu Cys Gly
 145 150 155 160
 Lys Val Asn Ile Pro Gln His Val Leu Met Asn Cys Ser His Pro Leu
 165 170 175
 Gly Glu Phe Ser Phe Asn Ser Gln Cys Thr Phe Ser Cys Ala Glu Gly
 180 185 190
 Tyr Glu Leu Asp Gly Pro Gly Glu Leu Gln Cys Leu Ala Ser Gly Ile
 195 200 205
 Trp Thr Asn Asn Pro Pro Lys Cys Asp Ala Val Gln Cys Gln Ser Leu
 210 215 220
 Glu Ala Pro Pro His Gly Thr Met Ala Cys Met His Pro Ile Ala Ala
 225 230 235 240
 Phe Ala Tyr Asp Ser Ser Cys Lys Phe Glu Cys Gln Pro Gly Tyr Arg
 245 250 255
 Ala Arg Gly Ser Asn Thr Leu His Cys Thr Gly Ser Gly Gln Trp Ser
 260 265 270
 Glu Pro Leu Pro Thr Cys Glu Ala Ile Ala
 275 280

<210> 3

<211> 279

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> Quimera-1 (aminoácidos de P-selecina de ratón sustituidos en P-selectina humana en las posiciones 4, 14, 17, 18, 20, 21, 22, 23)

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> H a N

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> I a N

20

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> K a V

25

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Y a F

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Q a R

<220>

5 <221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> N a R

<220>

10 <221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> R a H

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Y a F

<400> 3

Trp Thr Tyr Asn Tyr Ser Thr Lys Ala Tyr Ser Trp Asn Asn Ser Arg
1 5 10 15

Val Phe Cys Arg Arg His Phe Thr Asp Leu Val Ala Ile Gln Asn Lys
20 25 30

Asn Glu Ile Asp Tyr Leu Asn Lys Val Leu Pro Tyr Tyr Ser Ser Tyr
35 40 45

Tyr Trp Ile Gly Ile Arg Lys Asn Asn Lys Thr Trp Thr Trp Val Gly
50 55 60

20 Thr Lys Lys Ala Leu Thr Asn Glu Ala Glu Asn Trp Ala Asp Asn Glu

ES 2 676 570 T3

65					70					75					80
Pro	Asn	Asn	Lys	Arg	Asn	Asn	Glu	Asp	Cys	Val	Glu	Ile	Tyr	Ile	Lys
				85					90					95	
Ser	Pro	Ser	Ala	Pro	Gly	Lys	Trp	Asn	Asp	Glu	His	Cys	Leu	Lys	Lys
			100					105					110		
Lys	His	Ala	Leu	Cys	Tyr	Thr	Ala	Ser	Cys	Gln	Asp	Met	Ser	Cys	Ser
		115					120					125			
Lys	Gln	Gly	Glu	Cys	Leu	Glu	Thr	Ile	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Ser	Cys
	130						135				140				
Tyr	Pro	Gly	Phe	Tyr	Gly	Pro	Glu	Cys	Glu	Tyr	Val	Arg	Glu	Cys	Gly
145					150					155					160
Glu	Leu	Glu	Leu	Pro	Gln	His	Val	Leu	Met	Asn	Cys	Ser	His	Pro	Leu
				165					170					175	
Gly	Asn	Phe	Ser	Phe	Asn	Ser	Gln	Cys	Ser	Phe	His	Cys	Thr	Asp	Gly
			180					185					190		
Tyr	Gln	Val	Asn	Gly	Pro	Ser	Lys	Leu	Glu	Cys	Leu	Ala	Ser	Gly	Ile
		195					200					205			
Trp	Thr	Asn	Lys	Pro	Pro	Gln	Cys	Leu	Ala	Ala	Gln	Cys	Pro	Pro	Leu
	210					215					220				
Lys	Ile	Pro	Glu	Arg	Gly	Asn	Met	Thr	Cys	Leu	His	Ser	Ala	Lys	Ala
225					230					235					240
Phe	Gln	His	Gln	Ser	Ser	Cys	Ser	Phe	Ser	Cys	Glu	Glu	Gly	Phe	Ala
				245					250					255	
Leu	Val	Gly	Pro	Glu	Val	Val	Gln	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Val	Trp	Thr
			260					265					270		
Ala	Pro	Ala	Pro	Val	Cys	Lys									
		275													

<210> 4

<211> 282

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> Quimera-2 (posiciones de la P-selectina humana 1-35; P-selectina de ratón en adelante)

<400> 4

ES 2 676 570 T3

Trp Thr Tyr His Tyr Ser Thr Lys Ala Tyr Ser Trp Asn Ile Ser Arg
 1 5 10 15

Lys Tyr Cys Gln Asn Arg Tyr Thr Asp Leu Val Ala Ile Gln Asn Lys
 20 25 30

Asn Glu Ile Ala His Leu Asn Asp Val Ile Pro Phe Phe Asn Ser Tyr
 35 40 45

Tyr Trp Ile Gly Ile Arg Lys Ile Asn Asn Lys Trp Thr Trp Val Gly
 50 55 60

Thr Asn Lys Thr Leu Thr Glu Glu Ala Glu Asn Trp Ala Asp Asn Glu
 65 70 75 80

Pro Asn Asn Lys Lys Asn Asn Gln Asp Cys Val Glu Ile Tyr Ile Lys
 85 90 95

Ser Asn Ser Ala Pro Gly Lys Trp Asn Asp Glu Pro Cys Phe Lys Arg
 100 105 110

Lys Arg Ala Leu Cys Tyr Thr Ala Ser Cys Gln Asp Met Ser Cys Ser
 115 120 125

Asn Gln Gly Glu Cys Ile Glu Thr Ile Gly Ser Tyr Thr Cys Ser Cys
 130 135 140

Tyr Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Glu Cys Glu Tyr Val Lys Glu Cys Gly
 145 150 155 160

Lys Val Asn Ile Pro Gln His Val Leu Met Asn Cys Ser His Pro Leu
 165 170 175

Gly Glu Phe Ser Phe Asn Ser Gln Cys Thr Phe Ser Cys Ala Glu Gly
 180 185 190

Tyr Glu Leu Asp Gly Pro Gly Glu Leu Gln Cys Leu Ala Ser Gly Ile
 195 200 205

Trp Thr Asn Asn Pro Pro Lys Cys Asp Ala Val Gln Cys Gln Ser Leu
 210 215 220

Glu Ala Pro Pro His Gly Thr Met Ala Cys Met His Pro Ile Ala Ala
 225 230 235 240

ES 2 676 570 T3

Phe Ala Tyr Asp Ser Ser Cys Lys Phe Glu Cys Gln Pro Gly Tyr Arg
245 250 255

Ala Arg Gly Ser Asn Thr Leu His Cys Thr Gly Ser Gly Gln Trp Ser
260 265 270

Glu Pro Leu Pro Thr Cys Glu Ala Ile Ala
275 280

<210> 5

<211> 279

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Quimera-3 (cambio de un solo aminoácido en P-selectina humana - H4 humano a N4 de ratón)

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> H a N

15

<400> 5

ES 2 676 570 T3

Trp Thr Tyr Asn Tyr Ser Thr Lys Ala Tyr Ser Trp Asn Ile Ser Arg
 1 5 10 15

Lys Tyr Cys Gln Asn Arg Tyr Thr Asp Leu Val Ala Ile Gln Asn Lys
 20 25 30

Asn Glu Ile Asp Tyr Leu Asn Lys Val Leu Pro Tyr Tyr Ser Ser Tyr
 35 40 45

Tyr Trp Ile Gly Ile Arg Lys Asn Asn Lys Thr Trp Thr Trp Val Gly
 50 55 60

Thr Lys Lys Ala Leu Thr Asn Glu Ala Glu Asn Trp Ala Asp Asn Glu
 65 70 75 80

Pro Asn Asn Lys Arg Asn Asn Glu Asp Cys Val Glu Ile Tyr Ile Lys
 85 90 95

Ser Pro Ser Ala Pro Gly Lys Trp Asn Asp Glu His Cys Leu Lys Lys
 100 105 110

Lys His Ala Leu Cys Tyr Thr Ala Ser Cys Gln Asp Met Ser Cys Ser
 115 120 125

Lys Gln Gly Glu Cys Leu Glu Thr Ile Gly Asn Tyr Thr Cys Ser Cys
 130 135 140

ES 2 676 570 T3

Tyr Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Glu Cys Glu Tyr Val Arg Glu Cys Gly
145 150 155 160

Glu Leu Glu Leu Pro Gln His Val Leu Met Asn Cys Ser His Pro Leu
165 170 175

Gly Asn Phe Ser Phe Asn Ser Gln Cys Ser Phe His Cys Thr Asp Gly
180 185 190

Tyr Gln Val Asn Gly Pro Ser Lys Leu Glu Cys Leu Ala Ser Gly Ile
195 200 205

Trp Thr Asn Lys Pro Pro Gln Cys Leu Ala Ala Gln Cys Pro Pro Leu
210 215 220

Lys Ile Pro Glu Arg Gly Asn Met Thr Cys Leu His Ser Ala Lys Ala
225 230 235 240

Phe Gln His Gln Ser Ser Cys Ser Phe Ser Cys Glu Glu Gly Phe Ala
245 250 255

Leu Val Gly Pro Glu Val Val Gln Cys Thr Ala Ser Gly Val Trp Thr
260 265 270

Ala Pro Ala Pro Val Cys Lys
275

<210> 6

<211> 279

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Quimera-4Q (la sustitución de Q por H4 en P-selectina humana elimina el sitio de glicosilación putativo)

ES 2 676 570 T3

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> H a Q

5

<400> 6

Trp Thr Tyr Gln Tyr Ser Thr Lys Ala Tyr Ser Trp Asn Ile Ser Arg
1 5 10 15

Lys Tyr Cys Gln Asn Arg Tyr Thr Asp Leu Val Ala Ile Gln Asn Lys
20 25 30

ES 2 676 570 T3

Asn Glu Ile Asp Tyr Leu Asn Lys Val Leu Pro Tyr Tyr Ser Ser Tyr
 35 40 45
 Tyr Trp Ile Gly Ile Arg Lys Asn Asn Lys Thr Trp Thr Trp Val Gly
 50 55 60
 Thr Lys Lys Ala Leu Thr Asn Glu Ala Glu Asn Trp Ala Asp Asn Glu
 65 70 75 80
 Pro Asn Asn Lys Arg Asn Asn Glu Asp Cys Val Glu Ile Tyr Ile Lys
 85 90 95
 Ser Pro Ser Ala Pro Gly Lys Trp Asn Asp Glu His Cys Leu Lys Lys
 100 105 110
 Lys His Ala Leu Cys Tyr Thr Ala Ser Cys Gln Asp Met Ser Cys Ser
 115 120 125
 Lys Gln Gly Glu Cys Leu Glu Thr Ile Gly Asn Tyr Thr Cys Ser Cys
 130 135 140
 Tyr Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Glu Cys Glu Tyr Val Arg Glu Cys Gly
 145 150 155 160
 Glu Leu Glu Leu Pro Gln His Val Leu Met Asn Cys Ser His Pro Leu
 165 170 175
 Gly Asn Phe Ser Phe Asn Ser Gln Cys Ser Phe His Cys Thr Asp Gly
 180 185 190
 Tyr Gln Val Asn Gly Pro Ser Lys Leu Glu Cys Leu Ala Ser Gly Ile
 195 200 205
 Trp Thr Asn Lys Pro Pro Gln Cys Leu Ala Ala Gln Cys Pro Pro Leu
 210 215 220
 Lys Ile Pro Glu Arg Gly Asn Met Thr Cys Leu His Ser Ala Lys Ala
 225 230 235 240
 Phe Gln His Gln Ser Ser Cys Ser Phe Ser Cys Glu Glu Gly Phe Ala
 245 250 255
 Leu Val Gly Pro Glu Val Val Gln Cys Thr Ala Ser Gly Val Trp Thr
 260 265 270
 Ala Pro Ala Pro Val Cys Lys
 275

<210> 7

<211> 282

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> Quimera-5 (posiciones de la P-selectina humana 1-121; en adelante P-selectina de ratón)

<400> 7

ES 2 676 570 T3

Trp Thr Tyr His Tyr Ser Thr Lys Ala Tyr Ser Trp Asn Ile Ser Arg
1 5 10 15

Lys Tyr Cys Gln Asn Arg Tyr Thr Asp Leu Val Ala Ile Gln Asn Lys
20 25 30

Asn Glu Ile Asp Tyr Leu Asn Lys Val Leu Pro Tyr Tyr Ser Ser Tyr
35 40 45

Tyr Trp Ile Gly Ile Arg Lys Asn Asn Lys Thr Trp Thr Trp Val Gly
50 55 60

Thr Lys Lys Ala Leu Thr Asn Glu Ala Glu Asn Trp Ala Asp Asn Glu
65 70 75 80

Pro Asn Asn Lys Arg Asn Asn Glu Asp Cys Val Glu Ile Tyr Ile Lys
85 90 95

Ser Pro Ser Ala Pro Gly Lys Trp Asn Asp Glu His Cys Leu Lys Lys
100 105 110

Lys His Ala Leu Cys Tyr Thr Ala Ser Cys Gln Asp Met Ser Cys Ser
115 120 125

Asn Gln Gly Glu Cys Ile Glu Thr Ile Gly Ser Tyr Thr Cys Ser Cys
130 135 140

Tyr Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Glu Cys Glu Tyr Val Lys Glu Cys Gly
145 150 155 160

Lys Val Asn Ile Pro Gln His Val Leu Met Asn Cys Ser His Pro Leu
165 170 175

Gly Glu Phe Ser Phe Asn Ser Gln Cys Thr Phe Ser Cys Ala Glu Gly
180 185 190

Tyr Glu Leu Asp Gly Pro Gly Glu Leu Gln Cys Leu Ala Ser Gly Ile
195 200 205

ES 2 676 570 T3

Trp Thr Asn Asn Pro Pro Lys Cys Asp Ala Val Gln Cys Gln Ser Leu
210 215 220

Glu Ala Pro Pro His Gly Thr Met Ala Cys Met His Pro Ile Ala Ala
225 230 235 240

Phe Ala Tyr Asp Ser Ser Cys Lys Phe Glu Cys Gln Pro Gly Tyr Arg
245 250 255

Ala Arg Gly Ser Asn Thr Leu His Cys Thr Gly Ser Gly Gln Trp Ser
260 265 270

Glu Pro Leu Pro Thr Cys Glu Ala Ile Ala
275 280

<210> 8

<211> 282

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Quimera-6 (posiciones de la P-selectina humana 1-177; en adelante P-selectina de ratón)

10

<400> 8

ES 2 676 570 T3

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

ES 2 676 570 T3

Lys Gln Gly Glu Cys Leu Glu Thr Ile Gly Asn Tyr Thr Cys Ser Cys
 130 135 140

Tyr Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Glu Cys Glu Tyr Val Arg Glu Cys Gly
 145 150 155 160

Glu Leu Glu Leu Pro Gln His Val Leu Met Asn Cys Ser His Pro Leu
 165 170 175

Gly Glu Phe Ser Phe Asn Ser Gln Cys Thr Phe Ser Cys Ala Glu Gly
 180 185 190

Tyr Glu Leu Asp Gly Pro Gly Glu Leu Gln Cys Leu Ala Ser Gly Ile
 195 200 205

Trp Thr Asn Asn Pro Pro Lys Cys Asp Ala Val Gln Cys Gln Ser Leu
 210 215 220

Glu Ala Pro Pro His Gly Thr Met Ala Cys Met His Pro Ile Ala Ala
 225 230 235 240

Phe Ala Tyr Asp Ser Ser Cys Lys Phe Glu Cys Gln Pro Gly Tyr Arg
 245 250 255

Ala Arg Gly Ser Asn Thr Leu His Cys Thr Gly Ser Gly Gln Trp Ser
 260 265 270

Glu Pro Leu Pro Thr Cys Glu Ala Ile Ala
 275 280

<210> 9

<211> 282

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 676 570 T3

<223> Quimera-7 (posiciones de la P-selectina humana 1-97; en adelante P-selectina de ratón)

<400> 9

Trp Thr Tyr His Tyr Ser Thr Lys Ala Tyr Ser Trp Asn Ile Ser Arg
1 5 10 15

Lys Tyr Cys Gln Asn Arg Tyr Thr Asp Leu Val Ala Ile Gln Asn Lys
20 25 30

5 Asn Glu Ile Asp Tyr Leu Asn Lys Val Leu Pro Tyr Tyr Ser Ser Tyr
35 40 45

ES 2 676 570 T3

Tyr Trp Ile Gly Ile Arg Lys Asn Asn Lys Thr Trp Thr Trp Val Gly
 50 55 60

Thr Lys Lys Ala Leu Thr Asn Glu Ala Glu Asn Trp Ala Asp Asn Glu
 65 70 75 80

Pro Asn Asn Lys Arg Asn Asn Glu Asp Cys Val Glu Ile Tyr Ile Lys
 85 90 95

Ser Asn Ser Ala Pro Gly Lys Trp Asn Asp Glu Pro Cys Phe Lys Arg
 100 105 110

Lys Arg Ala Leu Cys Tyr Thr Ala Ser Cys Gln Asp Met Ser Cys Ser
 115 120 125

Asn Gln Gly Glu Cys Ile Glu Thr Ile Gly Ser Tyr Thr Cys Ser Cys
 130 135 140

Tyr Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Glu Cys Glu Tyr Val Lys Glu Cys Gly
 145 150 155 160

Lys Val Asn Ile Pro Gln His Val Leu Met Asn Cys Ser His Pro Leu
 165 170 175

Gly Glu Phe Ser Phe Asn Ser Gln Cys Thr Phe Ser Cys Ala Glu Gly
 180 185 190

Tyr Glu Leu Asp Gly Pro Gly Glu Leu Gln Cys Leu Ala Ser Gly Ile
 195 200 205

Trp Thr Asn Asn Pro Pro Lys Cys Asp Ala Val Gln Cys Gln Ser Leu
 210 215 220

Glu Ala Pro Pro His Gly Thr Met Ala Cys Met His Pro Ile Ala Ala
 225 230 235 240

Phe Ala Tyr Asp Ser Ser Cys Lys Phe Glu Cys Gln Pro Gly Tyr Arg
 245 250 255

Ala Arg Gly Ser Asn Thr Leu His Cys Thr Gly Ser Gly Gln Trp Ser
 260 265 270

Glu Pro Leu Pro Thr Cys Glu Ala Ile Ala
 275 280

<210> 10

<211> 282

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> Quimera-8 (aminoácidos de P-selectina humana sustituidos en P-selectina de ratón en las posiciones 4, 14, 17, 21, 22)

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> N a H

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> N a I

20

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> V a K

25

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> R a N

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

ES 2 676 570 T3

<222> (22)..(22)

<223> H a R

<400> 10

5

Trp Thr Tyr His Tyr Ser Thr Lys Ala Tyr Ser Trp Asn Ile Ser Arg
1 5 10 15

Lys Phe Cys Arg Asn Arg Phe Thr Asp Leu Val Ala Ile Gln Asn Lys
20 25 30

Asn Glu Ile Ala His Leu Asn Asp Val Ile Pro Phe Phe Asn Ser Tyr
35 40 45

Tyr Trp Ile Gly Ile Arg Lys Ile Asn Asn Lys Trp Thr Trp Val Gly
50 55 60

Thr Asn Lys Thr Leu Thr Glu Glu Ala Glu Asn Trp Ala Asp Asn Glu
65 70 75 80

Pro Asn Asn Lys Lys Asn Asn Gln Asp Cys Val Glu Ile Tyr Ile Lys
85 90 95

Ser Asn Ser Ala Pro Gly Lys Trp Asn Asp Glu Pro Cys Phe Lys Arg
100 105 110

ES 2 676 570 T3

Lys Arg Ala Leu Cys Tyr Thr Ala Ser Cys Gln Asp Met Ser Cys Ser
 115 120 125
 Asn Gln Gly Glu Cys Ile Glu Thr Ile Gly Ser Tyr Thr Cys Ser Cys
 130 135 140
 Tyr Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Glu Cys Glu Tyr Val Lys Glu Cys Gly
 145 150 155 160
 Lys Val Asn Ile Pro Gln His Val Leu Met Asn Cys Ser His Pro Leu
 165 170 175
 Gly Glu Phe Ser Phe Asn Ser Gln Cys Thr Phe Ser Cys Ala Glu Gly
 180 185 190
 Tyr Glu Leu Asp Gly Pro Gly Glu Leu Gln Cys Leu Ala Ser Gly Ile
 195 200 205
 Trp Thr Asn Asn Pro Pro Lys Cys Asp Ala Val Gln Cys Gln Ser Leu
 210 215 220
 Glu Ala Pro Pro His Gly Thr Met Ala Cys Met His Pro Ile Ala Ala
 225 230 235 240
 Phe Ala Tyr Asp Ser Ser Cys Lys Phe Glu Cys Gln Pro Gly Tyr Arg
 245 250 255
 Ala Arg Gly Ser Asn Thr Leu His Cys Thr Gly Ser Gly Gln Trp Ser
 260 265 270
 Glu Pro Leu Pro Thr Cys Glu Ala Ile Ala
 275 280

REIVINDICACIONES

- 5 1. un anticuerpo o su fragmento de unión que se une específicamente con un epítipo conformacional de P-selectina que está dentro de las posiciones de aminoácidos 1–35 de SEQ ID NO:1 y en donde dicho anticuerpo o su fragmento de unión bloquea la unión de PSGL–1 con P-selectina y disocia los complejos preformados de P-selectina/PSGL–1 para usar para la disociación de complejos preformados de P-selectina/PSGL–1 en el tratamiento de una condición o trastorno inflamatorio o trombótico en un sujeto que lo necesita.
- 10 2. Un anticuerpo o su fragmento de unión para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la condición o trastorno inflamatorio o trombótico son al menos uno o varios seleccionados del grupo que consiste en: crisis de dolor vasooclusivo de células falciformes, trombosis, aterosclerosis, metástasis tumoral, reacciones alérgicas, tiroiditis, psoriasis, dermatitis, nefritis, lupus eritematoso, esclerodermia, sepsis, rinitis, anafilaxis, diabetes, esclerosis múltiple, rechazo al injerto, enfermedad de injerto vs. huésped, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad intestinal inflamatoria, artritis y lesión de reperusión isquémica, condiciones asociadas con trauma extenso o inflamación crónica, síndrome de respuesta inflamatoria sistemática y falla multiorgánica.
- 15 3. Un anticuerpo o su fragmento de unión para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el anticuerpo es capaz de causar una disociación de la unión de célula–célula entre las células endoteliales activas y los leucocitos, linfocitos, glóbulos rojos falciformes y/o plaquetas.
- 20 4. Un anticuerpo o su fragmento de unión para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el anticuerpo es capaz de causar una disociación de la unión de célula–célula entre las plaquetas activadas y los leucocitos, linfocitos, glóbulos rojos falciformes y/o células endoteliales.
- 25 5. Un anticuerpo o su fragmento de unión para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el anticuerpo es monoclonal.
6. Un anticuerpo o su fragmento de unión para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el anticuerpo es quimérico, humano o humanizado.
7. Un anticuerpo o su fragmento de unión para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el anticuerpo comprende una inmunoglobulina seleccionada de la clase que consiste en IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.
8. Un anticuerpo o su fragmento de unión para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el anticuerpo o su fragmento de unión es una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o una quimera de IgG2/G4.
9. Un fragmento de unión a anticuerpo para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el fragmento de unión comprende al menos uno de un fragmento de Fab, Fab', F(ab)2 o scFv.
- 30 10. Un fragmento de unión a anticuerpo para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde dicho anticuerpo es para administración al sujeto por vía parenteral, intramuscular, intraperitoneal, epidural u oral, intravenosa, subcutánea o en una forma nebulizada.
- 35 11. Un fragmento de unión a anticuerpo para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión es para administración al sujeto de una cantidad de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg, en donde la administración puede ser oral, por inhalación, por inyecciones subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratraqueal, intravesical o intraperitoneal y se puede administrar cada 24 a 48 horas, por semana, cada 14 días o cada 4 semanas.

Figura 1

P-selectina humana/ratón

	A	Dominio de lectina	B	C1	D
Humano 1	WTYHYSTKAYSWNISRKYCQNR	YTDLVAIQNKNEIDYLNKVL	PPYSSYYWIGIRKNNKTW		
Ratón 1	WTYNYSTKAYSWNSRVFCRRHF	YTDLVAIQNKNEIAHLNDVI	PPFNSSYYWIGIRKINNKW		
		D	E1	C2	E2 C3
Humano 61	TWVGT	KKALTEAEENWADNEPNNKRN	NEDCVEIYIKSP	SAPGKWNDER	HCLKKKHAALCYTA
Ratón 61	TWVGT	NKTLTEAEENWADNEPNNKKN	QDCVEIYIKSN	SAPGKWNDER	PCFKKRAALCYTA
		F	Dominio EGF		CR1
Humano 121	▼ SCQDMSCSKQGE	CLETIGNYTCSCYPGYGPECEYV	RECGELELPQH	VLMNCSHPLGNFS	
Ratón 121	SCQDMSCSNQGE	CIETIGSYTCSCYPGYGPECEYV	KECGKVNIPQH	VLMNCSHPLGEFS	
			▼	CR2	
Humano 181	FNSQCSFHCTDGYQVNGPSKLE	CLASGIWTKPPQCLAAQ	CPPLKIPERGNMTCLHSAKA		
Ratón 181	FNSQCTFSCAEGYELDGP	GELQCLASGIWTKNPPK	DAVQCSLEAPPHGTMACMHPIAA		
Humano 241	FQHQS	SCSFSCEE	GFALVGPEVVQCTASGV	WTAPAPVCK---	
Ratón 241	FAYDSS	CKFECQPGYRARGSNTLHCTGSGQWSE	PLPTCEAIA		

Unión de 2 etapas Biacore

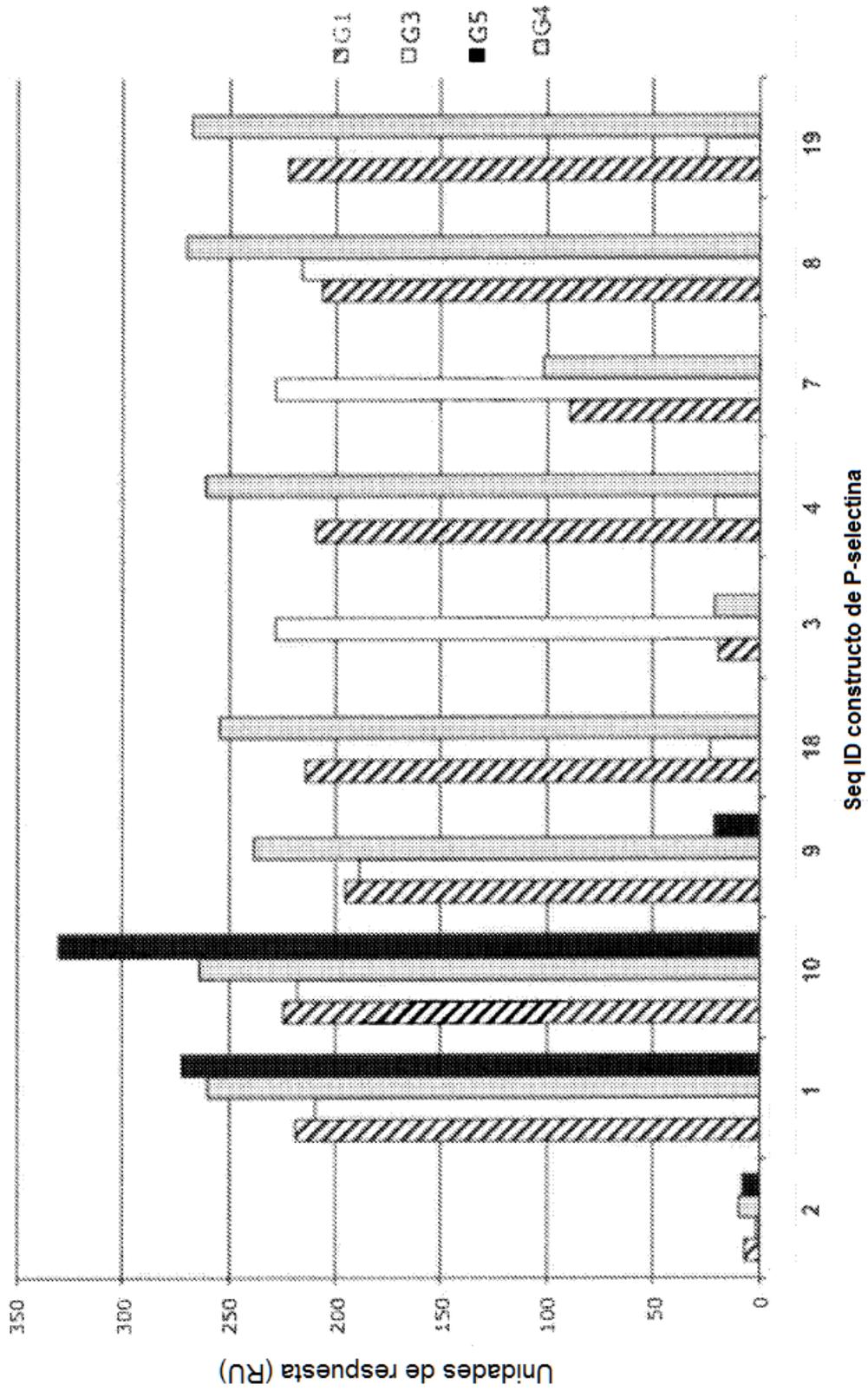


Figura 2

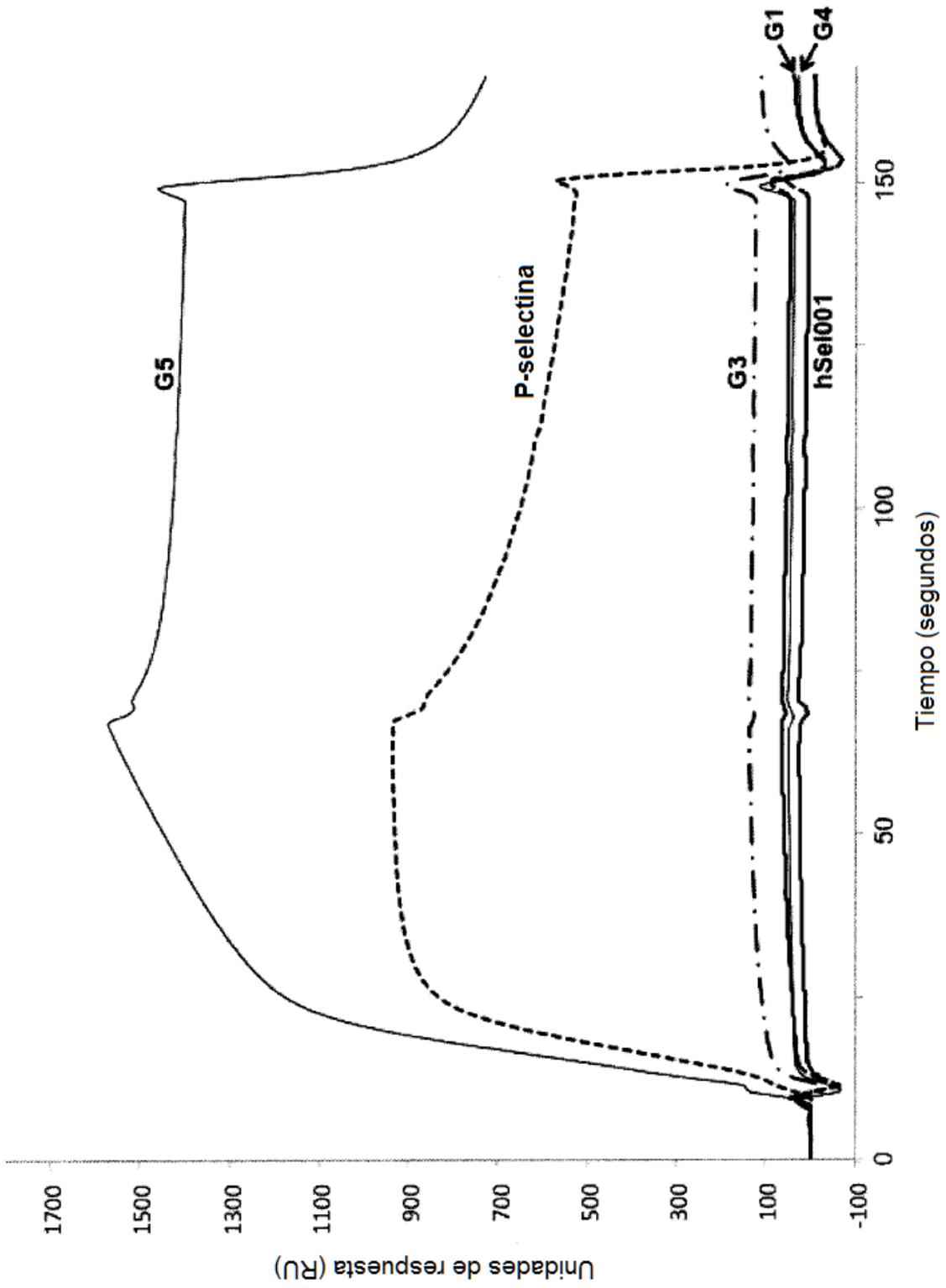


Figura 3

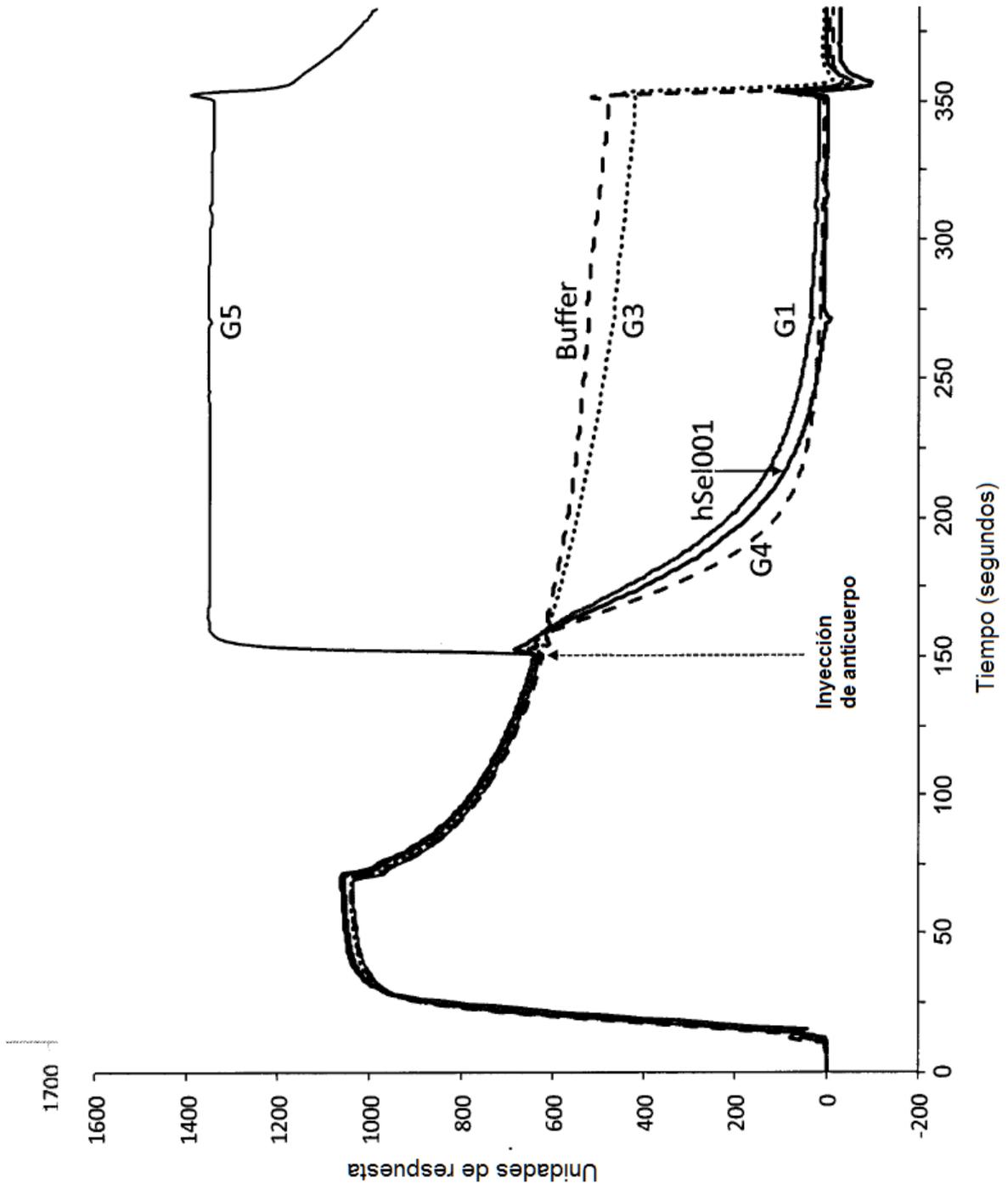


Figura 4

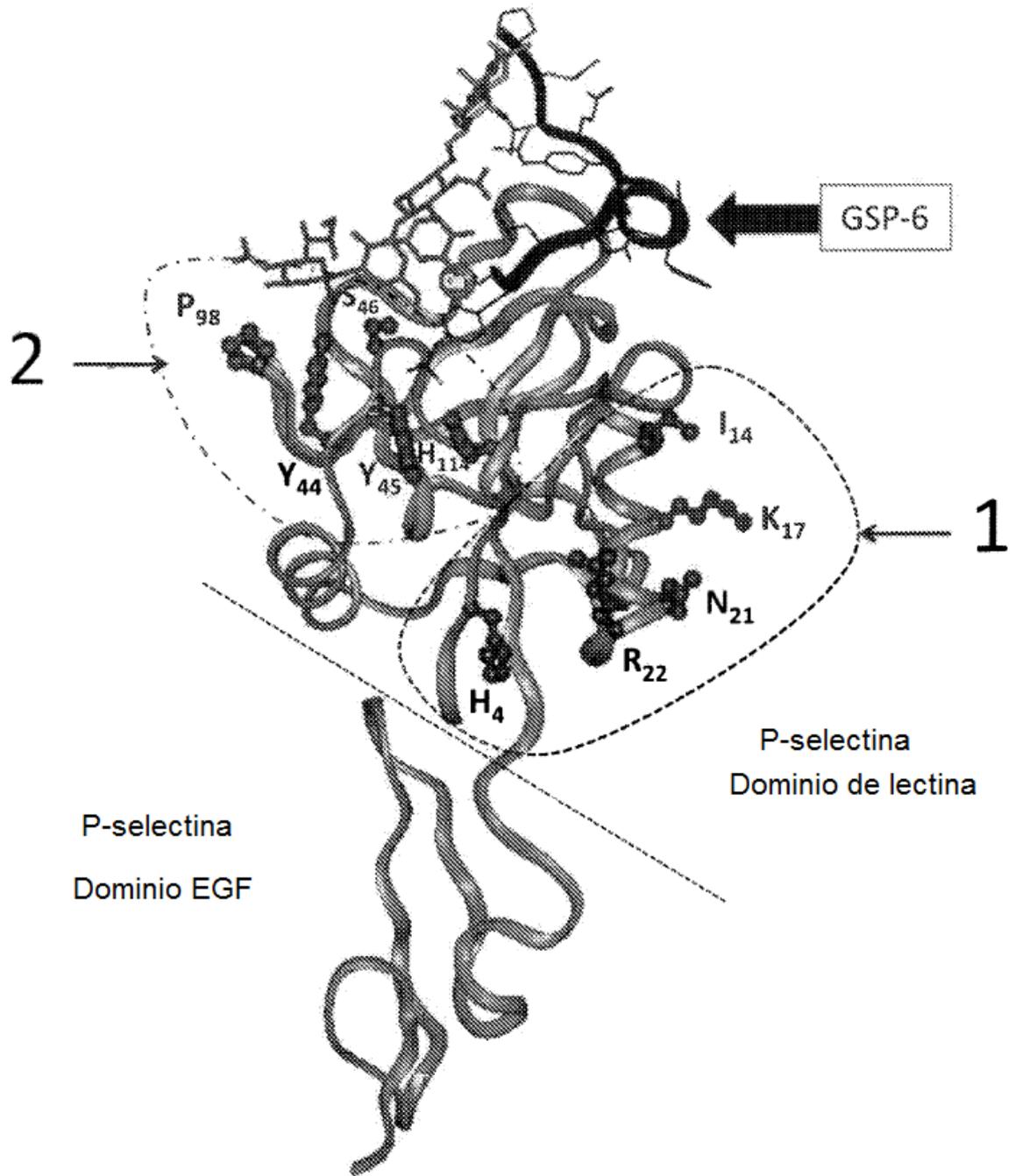


Figura 5

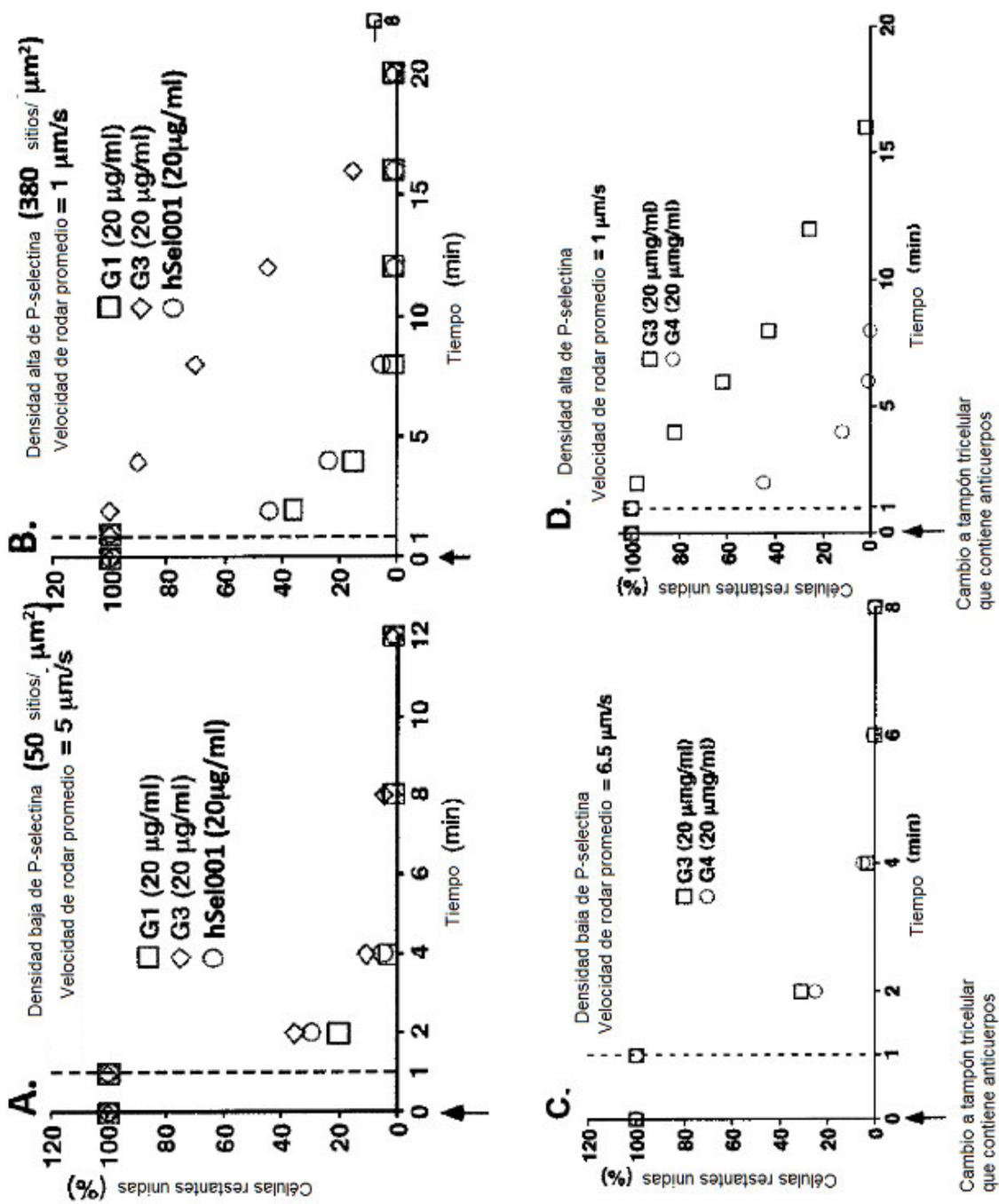


Fig. 6

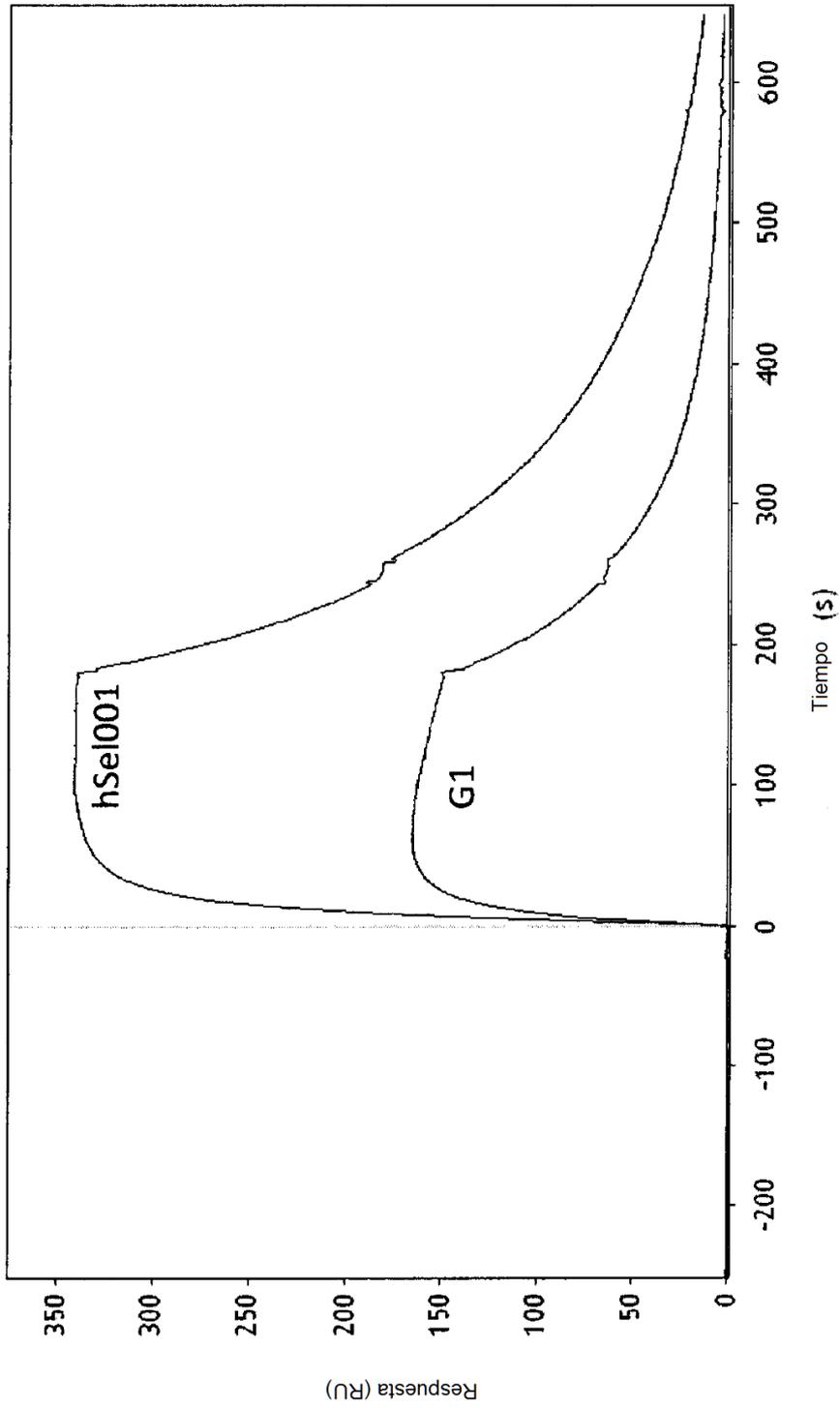


Figura 7