

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 350**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24	(2006.01)	C12N 1/21	(2006.01)
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 5/10	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)	C12P 21/08	(2006.01)
A61P 19/02	(2006.01)	G01N 33/53	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01)		
A61P 37/06	(2006.01)		
C07K 16/18	(2006.01)		
C07K 16/46	(2006.01)		
C12N 1/15	(2006.01)		
C12N 1/19	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07815053 .9**
- 96 Fecha de presentación: **30.05.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2025749**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.02.2009**

54 Título: **Anticuerpo anti-osteopontina humana humanizado**

30 Prioridad:
31.05.2006 JP 2006152892

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.07.2012

73 Titular/es:
**Astellas Pharma Inc.
3-11, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku
Tokyo 103-8411, JP y
Juridical Foundation The Chemo-Sero-
TherapeuticResearch Institute**

72 Inventor/es:
**YAMAMOTO, Nobuchika;
SAKAI, Fumihiko;
HIGUCHI, Hirofumi;
TORIKAI, Masaharu y
NAKASHIMA, Toshihiro**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 384 350 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-osteopontina humana humanizado.

5 **Campo técnico**

El presente invento se refiere a un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana que tiene una actividad y una estabilidad excelentes.

10 **Técnica fundamental**

La osteopontina (a la que en lo sucesivo se hace referencia como "OPN") es una glicoproteína ácida ligante de calcio que se encuentra abundantemente en el hueso, y, en el caso de los seres humanos, se sabe que se pueden encontrar al menos tres isoformas debidas a diferencias en el corte y empalme de mRNA: osteopontina a (a la que en lo sucesivo se hace referencia como "OPN-a"), osteopontina b (a la que en lo sucesivo se hace referencia como "OPN-b") y osteopontina c (a la que en lo sucesivo se hace referencia como "OPN-c") (documento 1 no de patente). En particular, el precursor de la OPN-a tiene la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. n° 23 en la lista de secuencias proporcionada más adelante, y se considera que, tras la secreción, experimenta una escisión de péptido señal para formar la forma OPN-a madura de I17-N314. La forma madura de OPN es escindida in vivo por trombina en el lado C-terminal del 168° resto de arginina (en el caso de la OPN-a), lo que da lugar a un fragmento N-terminal y un fragmento C-terminal.

La OPN anteriormente descrita es responsable de una gran variedad de funciones fisiológica y patológicamente importantes y ejerce funciones tales como, por ejemplo, adhesión celular, migración celular, tumorigénesis, respuestas inmunes, inhibición de citólisis mediada por complemento, y similares. Estas diversas funciones son mediadas por una gran variedad de receptores de la superficie celular. La OPN contiene la secuencia RGD (por ejemplo, para la OPN-a, los restos 159° a 161°); las integrinas que reconocen esta secuencia RGD, tales como $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 1$ y $\alpha V\beta 5$, son receptores importantes de la OPN, de entre las cuales, las integrinas $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 1$ y $\alpha V\beta 5$ median en la adhesión celular en células del músculo liso vascular; además, la $\alpha V\beta 3$ está asociada con la migración de macrófagos, linfocitos, células endoteliales, células de músculo liso y similares.

Además, una investigación que se ha llevado a cabo hasta la fecha ha demostrado también que la OPN se une a las integrinas $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$ a través de la secuencia SVVYGLR (ID. SEC. n° 10), y se ha hallado una diferencia en el modo de unión ya que la $\alpha 4\beta 1$ se une tanto a la OPN no escindida por trombina (OPN de tipo no escindido) como a un fragmento N-terminal escindido por trombina (OPN de tipo escindido), mientras que la $\alpha 9\beta 1$ sólo se une a la OPN de tipo escindido por trombina (documentos 2 a 4 no de patente). Estas subunidades de integrina $\alpha 9$ y $\alpha 4$ y $\beta 1$ y $\beta 7$ son muy similares entre sí en términos de la secuencia de aminoácidos. Las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$ se encuentran principalmente en linfocitos y monocitos pero se expresan con niveles muy bajos en neutrófilos. Por otro lado, la $\alpha 9\beta 1$ se expresa mucho de forma selectiva en neutrófilos y es responsable de las funciones esenciales para la migración de neutrófilos a través de VCAM-1, tenascina C y similares. La $\alpha 9\beta 1$ se expresa mucho en miocitos, células epiteliales, hepatocitos y similares. Por lo tanto, se considera que los dominios citoplásmicos de la subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 9$ de integrina están implicados en diversas reacciones inflamatorias al promover cooperativamente la migración y agregación de leucocitos a sitios de inflamación a través de sus respectivas vías intracelulares ligeramente diferentes de transducción de señales, para potenciar las actividades de infiltración de los mismos.

Como se describió anteriormente, puesto que una gran variedad de integrinas promueven la migración de leucocitos y están implicadas en reacciones inflamatorias, se piensa que los fármacos que inhiben estas actividades de integrina tienen el potencial para actuar como agentes antiinflamatorios. Por ejemplo, la integrina $\alpha V\beta 3$ se expresa en osteoclastos, células endoteliales vasculares, células de músculo liso y similares; puesto que se espera que la inhibición de la unión entre la integrina $\alpha V\beta 3$ y diversos ligandos de unión de la misma ejerza una acción supresora de la destrucción articular en, por ejemplo, las articulaciones, está realmente en curso el desarrollo de un anticuerpo anti- $\alpha V\beta 3$.

Sin embargo, puesto que los receptores que pertenecen a la familia de las integrinas se expresan universalmente en una gran variedad de tejidos y son responsables de las funciones esenciales para el mantenimiento de actividades biológicas, el uso de un anticuerpo contra una integrina en el tratamiento de la artritis reumatoide o la osteoartritis puede causar una inhibición similar en otros sitios, y el inicio de reacciones negativas resulta preocupante.

Desde este punto de vista, hasta la fecha se han realizado intentos para aclarar la etiología de la artritis reumatoide, la osteoartritis y similares y para proporcionar un mejor método terapéutico.

Por ejemplo, en el Documento WO02/081522 (documento 1 de patente) se halló que, en pacientes con reumatismo y pacientes con osteoartritis, la concentración de OPN en fluido de cavidad articular tenía valores elevados y, en pacientes con reumatismo, aumentaba la relación entre el fragmento N-terminal de tipo escindido por trombina y la OPN total, y se confirmó que la OPN estaba profundamente asociada con el inicio de estas enfermedades. En el

5 documento 1 de patente, se generaron anticuerpos que reconocían aisladamente el fragmento N-terminal y el fragmento C-terminal que resultaban de la escisión de OPN con trombina, respectivamente, y en un estudio en que se usaban estos se mostró que, en pacientes con artritis reumatoide, en particular, el fragmento N-terminal escindido por trombina presentaba elevadas concentraciones en la cavidad articular. En este fragmento N-terminal coexisten tanto la secuencia RGD como la secuencia SVVYGLR (ID. SEC. nº 10), ambas reconocidas por integrinas de tipo humano; se ha confirmado que un anticuerpo que bloquea simultáneamente estas dos secuencias inhibe mucho la unión de OPN e integrina y es eficaz en el tratamiento de la artritis reumatoide, la osteoartritis y similares.

10 Específicamente, en el documento 1 de patente, se generó un anticuerpo que inhibe la unión entre la secuencia RGD de OPN humana y la integrina y la unión entre la secuencia SVVYGLR de OPN humana (ID. SEC. nº 10) y la integrina, y su efecto fue confirmado mediante experimentos de adhesión celular, migración celular y similares. Además, se consiguió un anticuerpo contra un péptido sintético que correspondía a la secuencia interna de la OPN de ratón y, usando un modelo patológico de artritis en ratón, se confirmó su efecto como fármaco terapéutico.

15 Por lo tanto, puesto que la OPN de ratón tiene la secuencia RGD y la secuencia SLAYGLR (ID. SEC. nº 12), ambas reconocidas por integrina de ratón, en posiciones de la secuencia de aminoácidos homólogas a las de la OPN humana, se consiguió el anticuerpo M5 como un anticuerpo que bloquea simultáneamente estas secuencias. Se confirmó que la unión de este anticuerpo M5 a la OPN de ratón y al producto de la misma digerido con trombina era inhibida por el péptido GRGDSP, que comprende la secuencia RGD, y que este anticuerpo M5 inhibía la migración de monocitos activados por TNF- α , procedentes del bazo del ratón. Cuando se examinó este anticuerpo M5 utilizando un sistema de cultivo de órganos de cráneos de ratón, se observó una acción supresora de la destrucción ósea. Además cuando se administró el anticuerpo anteriormente descrito a un modelo de ratón con artritis por colágeno, se confirmó un evidente efecto terapéutico (documento 1 de patente y documento 5 no de patente).

20 Estos resultados sugieren acusadamente que un anticuerpo que bloquea simultáneamente la unión entre la secuencia RGD y la integrina de tipo humano y entre la secuencia SVVYGLR (ID. SEC. nº 10) y la integrina de tipo humano inhibe la unión entre la OPN y la integrina y es eficaz en el tratamiento de la artritis reumatoide y similares, y muestran además que se espera que el anticuerpo sea eficaz no sólo en el tratamiento de formas de reumatismo tales como la artritis reumatoide juvenil y el reumatismo crónico sino también en el tratamiento de la artritis psoriásica y la psoriasis. El rechazo crónico de injertos después de un trasplante de órgano se caracteriza por lesiones obstructivas en vasos sanguíneos y bronquios; a partir de investigaciones histológicas de los mismos, se considera que, puesto que la activación de células T y macrófagos causa la producción de citocinas y factores de crecimiento y el trastorno de células endoteliales vasculares, y puesto que también el crecimiento de músculo liso vascular causa fibrosis y similares, el estado progresa hacia la obstrucción vascular (documentos 6 a 8 no de patente).

25 Se ha comunicado que la OPN actúa como una proteína esencial en esta activación de macrófagos y esta fibrosis de músculo liso vascular (documento 9 no de patente); un anticuerpo inhibidor de OPN puede suprimir el proceso hacia la fibrosis al suprimir la migración de monocitos y neutrófilos. Por lo tanto, se espera que el anticuerpo suprima el rechazo crónico de injertos después de un trasplante de órgano para contribuir a la incorporación de órganos y sea eficaz en el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como enfermedad autoinmune sistémica, lupus eritematoso, uveítis, enfermedad de Behcet, miositis múltiple, nefritis glomeruloproliferativa y sarcoidosis. Se ha confirmado también que el nivel de expresión de OPN aumenta en varios cánceres, y que la OPN promueve el progreso canceroso y las metástasis (documentos 10 a 12 no de patente), y que el crecimiento de células cancerosas y las metástasis son suprimidos por un anticuerpo anti-OPN (documento 3 de patente, documento 13 no de patente).

30 Por lo tanto, también se espera que un anticuerpo anti-OPN sea eficaz en el tratamiento de diversos cánceres.

35 En el Documento WO03/027151 (documento 2 de patente) se describen un anticuerpo quimérico anti-osteopontina humana que tiene tanto la región variable del anticuerpo 2K1 de ratón anti-osteopontina humana descrito en el documento 1 de patente como la región constante de un anticuerpo humano, y un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana que tiene tanto la región determinante de complementariedad del anticuerpo 2K1 como la región de armazón y la región constante de un anticuerpo humano.

40 Mientras tanto, en el mercado se dispone ya de un gran número de anticuerpos monoclonales para tratamientos, incluyendo anticuerpos para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, rituximab, trastuzumab y bevacizumab), anticuerpos para el tratamiento del reumatismo (por ejemplo, infliximab y adalimumab), anticuerpos para el tratamiento para suprimir el rechazo de injertos (por ejemplo, muromonab y basiliximab) y similares.

45 A causa de sus características básicas de especificidad y seguridad elevadas, parece que se acelerarán la investigación y el desarrollo de preparaciones de anticuerpos monoclonales, particularmente para que se dirijan a una gran variedad de enfermedades para las que es difícil desarrollar fármacos terapéuticos de bajo peso molecular.

50 Por otro lado, el mayor problema planteado en el desarrollo de dichos productos farmacéuticos de anticuerpo atañe a la productividad de anticuerpos. Las dosis clínicas de los anticuerpos monoclonales que han sido lanzados al mercado son generalmente del orden de varios mg/kg, por lo que se requieren costes de producción considerables.

55

60

65

Por esta razón, seleccionar un anticuerpo que presente una excelente actividad y, de entre los anticuerpos que muestran la misma actividad, un anticuerpo de elevados niveles de expresión y elevada estabilidad hacia una proteína, es un requisito muy importante para la aplicación real como un producto farmacéutico de anticuerpo.

- 5 Documento 1 de patente: Folleto para la Publicación de Patente Internacional nº WO02/081522.
Documento 2 de patente: Folleto para la Publicación de Patente Internacional nº WO03/027151.
Documento 3 de patente: Folleto para la Publicación de Patente Internacional nº WO06/043954.
- 10 Documento 1 no de patente: Y. Saitoh et al. (1995): Laboratory Investigation 72, 55-63.
Documento 2 no de patente: Y. Yokosaki et al. (1999): The Journal of Biological Chemistry 274, 36.328-36.334.
- 15 Documento 3 no de patente: P. M. Green et al. (2001): FEBS Letters 503, 75-79.
Documento 4 no de patente: S. T. Barry et al. (2000): Experimental Cell Research 258, 342-351.
Documento 5 no de patente: Yamamoto et al. (2003): The Journal of Clinical Investigation 112, 181-188.
- 20 Documento 6 no de patente: P. Freese et al. (2001): Nephrology, dialysis, transplantation 16, 2401-2406.
Documento 7 no de patente: J. R. Waller et al. (2001): British Journal of Surgery 88, 1429-1441.
- 25 Documento 8 no de patente: S. R. Lehtonen et al. (2001): Transplantation 72, 1138-1144.
Documento 9 no de patente: A. O'Regan et al. (2000): International Journal of Experimental Pathology 81, 373-390.
Documento 10 no de patente: G. F. Weber (2001): Biochimica et Biophysica Acta 1552, 61-85.
- 30 Documento 11 no de patente: H. Rangaswami et al. (2006): TRENDS in Cell Biology 16, 79-87.
Documento 12 no de patente: S. S. Forootan et al. (2006): Int. J. Cancer 118, 2255-2261.
- 35 Documento 13 no de patente: Z. Hu et al. (2005): Clin. Cancer Res. 11, 4646-4652.

Descripción del invento

Problemas que van a resolver el invento

- 40 El presente invento se desarrolló a la vista de las circunstancias anteriormente descritas y está destinado a proporcionar un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana que presente unas actividades (actividad ligante de antígenos, actividad inhibidora de la migración de leucocitos, y similares) y/o una estabilidad (resistencia al calor, condiciones de bajo pH, agentes desnaturalizantes y similares) mejores que las de los anticuerpos anti-osteopontina humana convencionales. Los presentes inventores llevaron a cabo extensas investigaciones con la finalidad de alcanzar el objeto y tuvieron éxito a la hora de generar un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana que tuviera dichas características.
- 45

Medios para resolver los problemas

- 50 En consecuencia, el presente invento tiene las características siguientes:
- (1) un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana, que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 1, y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 3.
- 55
- (2) El anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana descrito en el anterior punto (1), en que la región constante de cadena pesada del anticuerpo es Igy1 humana.
- 60
- (3) El anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana descrito en el anterior punto (1), en que la región constante de cadena ligera del anticuerpo es Iglk humana.
- (4) El anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana descrito en el anterior punto (1), en que la región constante de cadena pesada del anticuerpo es Igy1 humana y la región constante de cadena ligera del anticuerpo es Iglk humana.
- 65

(5) Un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 25 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 27.

(6) Un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana descrito en el anterior punto (1).

(7) Un vector de expresión que comprende el polinucleótido descrito en el anterior punto (6).

(8) Una célula huésped que lleva incorporado el vector de expresión descrito en el anterior punto (7).

(9) Un método para producir un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana, que comprende una operación para cultivar la célula huésped descrita en el anterior punto (8) para permitir que la célula exprese el anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana.

Efecto del invento

El presente invento proporciona un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana que presenta unas actividades (actividad ligante de antígenos, actividad inhibidora de la migración de leucocitos, y similares) y/o una estabilidad (resistencia al calor, condiciones de bajo pH, agentes desnaturalizantes y similares) mejores que las de los anticuerpos anti-osteopontina humana convencionales.

Breve descripción de los dibujos

En la Figura 1 se muestra la secuencia de bases (columna superior: ID. SEC. nº 15) y la secuencia de aminoácidos (columna inferior: ID. SEC. nº 16) de un DNA que comprende la región de codificación de R2K1-VH1.7 incorporada a un vector (la porción subrayada es la secuencia líder para la expresión secretora).

En la Figura 2 se muestra la secuencia de bases (columna superior: ID. SEC. nº 17) y la secuencia de aminoácidos (columna inferior: ID. SEC. nº 18) de un DNA que comprende la región de codificación de R2K1-VH1.8 incorporada a un vector (la porción subrayada es la secuencia líder para la expresión secretora).

En la Figura 3 se muestra la secuencia de bases (columna superior: ID. SEC. nº 19) y la secuencia de aminoácidos (columna inferior: ID. SEC. nº 20) de un DNA que comprende la región de codificación de R2K1-VL1.7 incorporada a un vector (la porción subrayada es la secuencia líder para la expresión secretora).

En la Figura 4 se muestra la secuencia de bases (columna superior: ID. SEC. nº 21) y la secuencia de aminoácidos (columna inferior: ID. SEC. nº 22) de un DNA que comprende la región de codificación de R2K1-VL1.8 incorporada a un vector (la porción subrayada es la secuencia líder para la expresión secretora).

En la Figura 5 se muestran los resultados de un examen de la capacidad ligante del anticuerpo 2K1 quimérico y el anticuerpo 2K1 humanizado hacia el péptido hOPN5 mediante un método de ELISA.

En la Figura 6 se muestran los resultados de un examen de la capacidad ligante del anticuerpo 2K1 quimérico y el anticuerpo 2K1 humanizado, térmicamente tratados a 70 °C, hacia el péptido hOPN5 mediante un método de ELISA. Se muestran las relaciones con respecto a la capacidad ligante sin el tratamiento térmico como 100%.

En la Figura 7 se muestran los resultados de un examen de la capacidad ligante del anticuerpo 2K1 quimérico y el anticuerpo 2K1 humanizado, tratados con un tampón de pH 5, hacia el péptido hOPN5 mediante un método de ELISA. Se muestran las relaciones con respecto a la capacidad ligante sin el tratamiento con tampón de pH 5 como 100%.

En la Figura 8 se muestran los resultados de un gráfico de las longitudes de onda espectrales de fluorescencia máxima del anticuerpo 2K1 quimérico y el anticuerpo 2K1 humanizado, tratados con tampones que contienen hidrócloruro de guanidina en distintas concentraciones.

En la Figura 9 se muestran los resultados de una medición de los contenidos estructurales aleatorios en el anticuerpo 2K1 quimérico y el anticuerpo 2K1 humanizado, tratados con tampones con diferentes niveles de pH, por di-croísmo circular (CD; del inglés, circular dichroism).

La Figura 10 es una ilustración que muestra los resultados de un examen de la estabilidad térmica del anticuerpo 2K1 quimérico y el anticuerpo 2K1 humanizado usando un calorímetro diferencial ultrasensible de barrido. La flecha discontinua y la flecha continua indican las T_m del anticuerpo 2K1 quimérico y el anticuerpo R2K1v1.7, respectivamente.

En la Figura 11 se muestran los efectos inhibidores de la adhesión celular de R2K1v1.7 y R2K1v0 sobre la OPN humana.

5 En la Figura 12 se muestran los efectos de R2K1v1.7 sobre la hinchazón articular en monos con artritis provocada por colágeno. Los datos se muestran como valor medio \pm error estándar para 8 animales, 7 animales y 5 animales en el grupo testigo, el grupo de 25 mg/kg y el grupo de 50 mg/kg, respectivamente. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$: significativamente diferente del grupo testigo según se determina mediante la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

10 En la Figura 13 se muestran los resultados de un análisis, por HPLC, de R2K1v1.7-scFv purificado.

En la Figura 14 se muestran los resultados de un examen de la capacidad ligante de R2K1v1.7-scFv purificado hacia el péptido hOPN5 mediante un método de ELISA.

15 En la Figura 15 se muestran los resultados de una SDS-PAGE sobre el anticuerpo R2K1v1.7 de tipo molécula completa y sobre el $F(ab')_2$ y el $F(ab')_2$ -PEG purificado del anticuerpo R2K1v1.7.

En la Figura 16 se muestran los resultados de un examen de la capacidad ligante del $F(ab')_2$ -PEG de R2K1v1.7 hacia el péptido hOPN5 por BIAcore.

20

Mejor modo de llevar el invento a cabo

A continuación se describe con detalle el presente invento.

25 Los presentes inventores llevaron a cabo extensas investigaciones para resolver los anteriormente descritos problemas relativos a los anticuerpos anti-osteopontina humana convencionales y tuvieron éxito en cuanto a conseguir un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana que tuviera unas actividades y/o una estabilidad mejores que las del anticuerpo 2K1 quimérico y el anticuerpo 2K1 humanizado descritos en el Documento WO03/027151 (documento 2 de patente).

30

La estructura básica de una molécula de anticuerpo es compartida por todas las clases y se configura con una cadena pesada que tiene un peso molecular de 50.000 a 70.000 y una cadena ligera que tiene un peso molecular de 20.000 a 30.000. Una cadena pesada consiste normalmente en una cadena polipeptídica que comprende aproximadamente 440 aminoácidos; las cadenas pesadas tienen estructuras características de las diferentes clases y son denominadas cadenas γ , μ , α , δ y ϵ , que corresponden a IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Además, la IgG se encuentra como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y las correspondientes cadenas son denominadas $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ y $\gamma 4$, respectivamente. Una cadena ligera consiste normalmente en una cadena polipeptídica que comprende aproximadamente 220 aminoácidos; se conocen dos tipos, el tipo L y el tipo K, y las cadenas son denominadas λ y κ , respectivamente. Con respecto a la configuración peptídica de la estructura básica de una molécula de anticuerpo, dos cadenas pesadas homólogas y dos cadenas ligeras homólogas están unidas por medio de enlaces disulfuro (enlaces S-S) y enlaces no covalentes, y el peso molecular es de 150.000 a 190.000. Los dos tipos de cadena ligera son capaces de aparearse con cualquier cadena pesada. Cada molécula de anticuerpo consiste siempre en dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas.

35

40

45 Hay cuatro enlaces S-S intracatenarios en una cadena pesada (cinco enlaces para las cadenas μ y ϵ) y dos en una cadena ligera; se forma un bucle por 100 a 110 restos de aminoácido, y esta estructura estérica es similar entre los bucles y es denominada "dominio o unidad estructural". Para ambas cadenas pesadas y cadenas ligeras, la secuencia de aminoácidos del dominio situado en el extremo N de las mismas es inconstante, incluso en un patrón de referencia de la misma clase (subclase) de la misma especie animal, y este dominio es denominado "región variable" (región V, región variable) (los dominios se expresan como V_H y V_L , respectivamente). La secuencia de aminoácidos de la cara C-terminal de las mismas es casi constante en cada clase o subclase y es denominada "región constante" (región C, región constante) (los dominios se expresan como C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_L , respectivamente).

50

55 El sitio determinante antigénico de un anticuerpo está configurado con V_H y V_L , y la especificidad de unión depende de la secuencia de aminoácidos de este sitio. Por otro lado, actividades biológicas tales como la unión a complementos o a diferentes células reflejan las diferencias en la estructura de la región C entre las diversas clases de Ig. Se ha hallado que la variabilidad de las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada está casi limitada a tres pequeñas regiones hipervariables que existen en ambas cadenas, y estas regiones son denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR; del inglés, complementarity determining regions). La porción restante de la región variable es denominada "región de armazón" y es relativamente constante. Normalmente, sólo de 5 a 60 10 aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de cada región variable han formado el sitio ligante de antígenos.

60

65 En la presente descripción, a un anticuerpo que tiene una región variable procedente de un anticuerpo de ratón (al que también se hace referencia como anticuerpo heterólogo dador) como región variable reactiva con antígenos, y

una región constante procedente de un anticuerpo humano como región constante, se hace referencia como "anticuerpo quimérico"; a un anticuerpo quimérico que reconoce osteopontina y fragmentos de la misma se hace referencia como "anticuerpo quimérico anti-osteopontina". A un anticuerpo recombinante preparado al sustituir todas las regiones, salvo la región determinante de la complementariedad (sitio ligante de antígenos), de una molécula de anticuerpo antigénicamente específica de un mamífero no humano (por ejemplo, un ratón) por aminoácidos de anticuerpo humano se hace referencia como "anticuerpo humanizado". En los anticuerpos humanizados se incluyen aquellos que tienen una modificación de aminoácidos (sustitución, inserción, supresión, adición) realizada en la región de armazón de los mismos, como el anticuerpo del presente invento.

En general, se sabe que, en la preparación de un anticuerpo humanizado, cuando la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad sólo es simplemente injertada en el armazón del anticuerpo humano molde, la actividad ligante de antígenos disminuye en comparación con la del anticuerpo original de ratón en muchos casos. Se confirmó que el anticuerpo 2K1 humanizado anteriormente descrito ejerce una actividad inhibidora de la adhesión celular muy baja sobre la OPN y, por lo tanto, es inadecuado para uso como un producto farmacéutico de anticuerpo, aunque es capaz de unirse a péptidos de OPN (Ejemplo 9 posterior).

Los presentes inventores llevaron a cabo extensas investigaciones para mejorar las reducciones de actividad en los anticuerpos humanizados y para obtener un anticuerpo humanizado que tuviera mejor estabilidad para uso como un producto farmacéutico de anticuerpo, y hallaron que un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana que comprendía una región variable de cadena pesada que consistía en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 1 y una región variable de cadena ligera que consistía en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 3 presentaba actividades significativamente mejoradas y/o mejor estabilidad en términos de diversos índices de estabilidad, en comparación con anticuerpos quiméricos y humanizados anti-osteopontina humana convencionales. Como tal, el anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana del presente invento ha sido preparado realizando modificaciones en ciertos aminoácidos de las regiones de armazón de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo humano molde, y tiene una región de armazón con una secuencia distinta de la de un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana convencional preparado al injertar sólo la región determinante de la complementariedad (documento 2 de patente).

El anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana del presente invento puede ser fácilmente preparado por los expertos en la técnica basándose en la información de secuencias de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del mismo aquí descritas, usando un método comúnmente conocido en la técnica. Específicamente, se preparan un fragmento génico de región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de bases que codifica los aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo del presente invento (ID. SEC. nº 1), y un fragmento génico de región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de bases que codifica los aminoácidos de región variable de cadena ligera del anticuerpo del presente invento (ID. SEC. nº 3). Luego se juntan los genes de regiones variables con un gen de región constante en una clase apropiada de anticuerpo humano para preparar un gen de anticuerpo humanizado. A continuación, se junta este gen de anticuerpo humanizado con un vector de expresión apropiado y se introduce en una célula cultivada. Finalmente, se cultiva esta célula cultivada, por lo que se puede obtener un anticuerpo humanizado a partir del sobrenadante del cultivo.

Cada uno de los fragmentos génicos de región variable anteriormente descritos que codifican los aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo del presente invento (ID. SEC. nº 1 e ID. SEC. nº 3) pueden ser preparado, por ejemplo, preparando un fragmento génico que codifique la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera, respectivamente, del anticuerpo 2K1 humanizado, descrito en el Documento WO03/027151, de acuerdo con el método descrito en el documento, y provocando una mutación en el sitio especificado del fragmento génico que codifica la región de armazón del anticuerpo 2K1 humanizado. Para provocar una mutación en el sitio especificado de la región de armazón, se pueden utilizar diversos métodos obvios para los expertos en la técnica, tal como la mutagénesis dirigida al sitio (Current Protocols in Molecular Biology, redactado por Ausubel et al. (1987) y editado por John Wiley & Sons, sección 8.1-8.5). Alternativamente, los fragmentos génicos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo del presente invento pueden ser también sintetizados basándose en las secuencias de bases diseñadas en relación con las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera (ID. SEC. nº 1 e ID. SEC. nº 3) o basándose en las secuencias de bases de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo del presente invento, mostradas por la ID. SEC. nº 5 y la ID. SEC. nº 7, usando un método de síntesis génica comúnmente conocido en la técnica. En cuanto a dicho método de síntesis génica, se pueden utilizar diversos métodos obvios para los expertos en la técnica, tal como el método de síntesis de genes de anticuerpos descrito en el Documento WO90/07861.

A continuación, se juntan los fragmentos génicos de regiones variables anteriormente descritos y el gen de región constante del anticuerpo humano, para preparar un gen de anticuerpo humanizado. Aunque como región constante del anticuerpo humano usado se puede escoger cualquier subclase de región constante, se puede usar preferiblemente Igy1 humana como región constante de cadena pesada e Igk humana como región constante de cadena ligera.

Después de la preparación de este gen de anticuerpo humanizado, se pueden llevar a cabo la introducción del gen de anticuerpo humanizado en un vector de expresión, la introducción del vector de expresión en células cultivadas, el cultivo de las células cultivadas, la purificación del anticuerpo y demás utilizando diversos métodos comúnmente conocidos en la técnica, o con referencia a los métodos para preparar un anticuerpo quimérico anti-osteopontina humana o un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana, descritos en el Documento WO02/081522 o WO03/027151. En cuanto al vector de expresión que se va a unir al gen de anticuerpo humanizado así obtenido, se pueden usar los vectores de expresión descritos en el Boletín Oficial WO94/20632 de Publicación de Patente Internacional, tales como AG- γ 1 y AG- κ , pero el vector de expresión no está sujeto a limitación con tal de que sea capaz de expresar el gen de anticuerpo humanizado. Es preferible utilizar un vector de expresión que ya tenga un gen de región constante de Ig humana, tal como AG- γ 1 o AG- κ , ya que se convertiría en un vector de expresión que tendría el gen de anticuerpo humanizado simplemente cuando se insertara en él el gen de región variable de anticuerpo humanizado.

Mediante, por ejemplo, el método del fosfato cálcico y similares, se introduce el vector de expresión anteriormente descrito en células cultivadas.

Como ejemplos de las células cultivadas en que se introduce el vector de expresión, se pueden utilizar células cultivadas tales como células CHO-DG44, y se pueden cultivar mediante un método convencional.

Después del cultivo anteriormente descrito, el anticuerpo acumulado en el sobrenadante del cultivo puede ser purificado mediante, por ejemplo, diversas cromatografías utilizando una columna de proteína A.

La actividad antigénica del anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana así obtenido puede ser medida mediante, por ejemplo, un ensayo ELISA en que se usa un péptido de osteopontina y similares como se describe más adelante en un ejemplo, BIAcore (BIAcore Company) y similares. La actividad inhibidora de la migración de leucocitos del anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana puede ser medida mediante, por ejemplo, el cultivo de monocitos humanos de sangre periférica en presencia de un anticuerpo de ensayo y OPN u OPN de tipo escindido por trombina, como se describe más adelante en un ejemplo. El anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana del presente invento presenta una actividad biológica para inhibir la migración de monocitos humanos de sangre periférica activados por una citocina (por ejemplo, TNF- α) hacia OPN de tipo escindido por trombina.

A continuación, el anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana así generado es examinado en cuanto a diversos índices de estabilidad. El anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana del presente invento presenta los siguientes índices de estabilidad A) a D):

A) Presenta estabilidad térmica, en que la actividad ligante hacia un péptido que comprende la secuencia SVVYGLR (ID. SEC. n° 10) después de un tratamiento térmico en PBS a 70 °C durante 2 horas no es inferior al 90% de la actividad sin el tratamiento térmico.

B) La temperatura de transición de punto medio (T_m) es al menos 5 °C mayor que la de un anticuerpo quimérico que tiene una región variable procedente de un anticuerpo heterólogo dador y una región constante procedente de un anticuerpo humano.

C) Presenta resistencia al hidrócloruro de guanidina en concentraciones al menos 0,5 M mayores con respecto a un anticuerpo quimérico que tiene una región variable procedente de un anticuerpo heterólogo dador y una región constante procedente de un anticuerpo humano.

D) Presenta resistencia a niveles de pH al menos 0,3 menores con respecto a un anticuerpo quimérico que tiene una región variable procedente de un anticuerpo heterólogo dador y una región constante procedente de un anticuerpo humano.

Aquí, los índices A) y B) anteriormente descritos son índices de estabilidad frente al calor; puesto que el anticuerpo presenta mejores características en estos índices, es más ventajoso en términos de estabilidad en almacenamiento de larga duración y en forma de dosificación. Es decir, una preparación de anticuerpo es a menudo problemática con respecto a la estabilidad en almacenamiento porque es una proteína, por lo que se prepara a veces como una preparación liofilizada (esto es problemático en términos de conveniencia en los escenarios de la práctica médica porque se debe disolver en el momento de su uso; en particular, una preparación de proteína tarda a menudo más de 30 segundos en disolverse, lo que a su vez plantea a menudo una carga en los escenarios de la práctica médica); sin embargo, cualquier anticuerpo que tenga una buena estabilidad térmica puede ser almacenado, incluso en disolución, mientras se garantiza una estabilidad a largo plazo bajo refrigeración durante 2 años o más. En realidad, se garantiza que R2K1v1.7, el anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana del presente invento descrito más adelante en un ejemplo, es estable durante aproximadamente 1 año incluso a temperatura ambiental (25 °C). Si es factible una preparación en disolución, es posible preparar preparaciones más convenientes en forma de jeringas precargadas y similares. Un anticuerpo de elevada estabilidad térmica que satisfaga los índices anteriormente descritos ofrece una variedad de preparaciones más amplia, lo que hace posible componer preparaciones que satisfa-

gan necesidades médicas más grandes y aumentar las opciones.

El índice C) anteriormente descrito es un índice relativo a la resistencia a sales; un anticuerpo que tenga dicha resistencia a sales permite la investigación de una fórmula más ventajosa en la elaboración de una preparación farmacéutica. Particularmente en jeringas precargadas, este índice es útil porque a menudo se utilizan elevadas concentraciones de sales a la hora de diseñar una preparación de proteína en concentración elevada, tal como de 100 a 200 µg/ml.

El índice D) anteriormente descrito es un índice relativo a la resistencia al pH; un anticuerpo que tenga dicha resistencia al pH permite un tratamiento con menores niveles de pH en la operación de inactivación vírica del proceso de producción y purificación del anticuerpo y, por lo tanto, es útil. Por esta razón, tener una resistencia al pH menor que la de los anticuerpos ordinarios en tan sólo aproximadamente 0,3 unidades sería una ventaja importante.

Se describe a continuación el método de ensayo para el índice A). En primer lugar, un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana de ensayo es diluido en PBS (preferiblemente hasta 50 µg/ml) y es térmicamente tratado a 70 °C durante 2 horas. A continuación, se restituye la temperatura de la dilución al valor ambiental y se mide la actividad ligante del anticuerpo hacia un péptido que comprende la secuencia SVVYGLR (ID. SEC. nº 10) mediante, por ejemplo, el método de ELISA de Kon et al. [Journal of Cellular Biology 88: 420-432 (2002)]. La actividad ligante de este anticuerpo térmicamente tratado es comparada con la actividad ligante del mismo anticuerpo pero medida sin el tratamiento térmico. El anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana del presente invento, cuando es sometido a este tratamiento térmico, presenta una actividad ligante no inferior al 90% de la actividad ligante del mismo anticuerpo, aunque no tratado, hacia un péptido que comprende la secuencia SVVYGLR (ID. SEC. nº 10). Preferiblemente, el péptido que comprende la secuencia SVVYGLR (ID. SEC. nº 10) utilizado en este ensayo de índices es un péptido de osteopontina que tiene la secuencia (CVDTYDGRGDSVVYGLRS (ID. SEC. nº 13).

Se describe a continuación el método de ensayo para el índice B). En primer lugar, se ajustan un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana de ensayo y el anticuerpo 2K1 quimérico descrito en el Documento WO03/027151 (C2K1) usando una disolución tampón apropiada [preferiblemente, tampón de citrato 20 mM + NaCl 120 mM (pH de 6,0)], y se puede evaluar la estabilidad frente al calentamiento utilizando un calorímetro diferencial de barrido (preferiblemente, la plataforma VP Capillary DSC de MicroCal Company). La temperatura de transición de punto medio (T_m), que muestra la temperatura de degeneración, del anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana del presente invento es al menos 5 °C mayor que la de C2K1.

Se describe a continuación el método de ensayo para el índice C). En primer lugar, se disuelven un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana de ensayo y el anteriormente descrito anticuerpo 2K1 quimérico (C2K1) en una disolución tampón que comprende hidrócloruro de guanidina en diversas concentraciones que van de 0 a 5 M [preferiblemente, una disolución de fosfato sódico 20 mM + NaCl 120 mM (pH de 7,0)] y se ajustan las concentraciones de las disoluciones a un valor apropiado (preferiblemente, 50 µg/ml). A continuación, se deja reposar cada muestra de disolución a 10 °C durante la noche, después de lo cual se mide el espectro fluorescente de cada muestra. Específicamente, se barre la fluorescencia emitida por el triptófano bajo una luz de excitación de 280 nm, a lo largo del intervalo de longitudes de onda que va de 320 nm a 370 nm. La longitud de onda de intensidad máxima se desplaza debido al relajamiento de la estructura estérica del anticuerpo proteico por el hidrócloruro de guanidina. Tanto para el anticuerpo de ensayo como para el anticuerpo quimérico se mide la concentración de hidrócloruro de guanidina para un desplazamiento de la longitud de onda de intensidad máxima. Para el anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana del presente invento, la concentración de hidrócloruro de guanidina para un desplazamiento de la anteriormente descrita longitud de onda de intensidad máxima es al menos 0,5 M mayor que para C2K1.

Se describe a continuación el método de ensayo para el índice D). En primer lugar, se ajustan un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana de ensayo y el anteriormente descrito anticuerpo 2K1 quimérico (C2K1) utilizando una disolución tampón apropiada [preferiblemente, tampón de citrato 20 mM + NaCl 120 mM (pH de 6,0)] (preferiblemente, 2 mg/ml) y, mientras se añade a los mismos una disolución ácida (preferiblemente, HCl 0,1 N) y agua, se prepara una muestra de cada nivel de pH bajo en la concentración especificada (1 mg/ml). Una vez que se ha tratado esta muestra a temperatura ambiental durante 1 hora, se mide el espectro de dicroísmo circular (CD). Se mide el espectro de CD a lo largo del intervalo de longitudes de onda que va de 205 nm a 260 nm y se mide la relación de contenido de estructura aleatoria para cada muestra de cada anticuerpo tratada a pH bajo, basándose en el método analítico espectral por CD de Yang et al. [Methods in Enzymology, 130, 208-269 (1986)]. El pH al cual la relación de contenido de estructura aleatoria en el anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana del presente invento comienza a aumentar es al menos aproximadamente 0,3 menor que el correspondiente a C2K1.

Los presentes inventores llevaron a cabo extensas investigaciones usando modificaciones combinatorias del gen de la región de armazón mediante mutagénesis dirigida al sitio y similares, y estudios de estabilidad usando los índices de estabilidad A) a D) anteriormente descritos, basándose en el anticuerpo humanizado descrito en el Documento WO03/027151, y por vez primera tuvieron éxito en cuanto a obtener un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana que tuviera unas actividades (actividad ligante de antígenos, actividad inhibidora de la migración de leucoci-

tos, y similares) y/o una estabilidad (resistencia al calor, condiciones de bajo pH, agentes desnaturalizantes y similares) mejores que las de los anticuerpos anti-osteopontina humana convencionales, haciendo que las porciones de armazón del anticuerpo humano (FR1 a 4) fueran la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 1 (números de aminoácido 1 a 30, 36 a 49, 67 a 98, y 106 a 116, respectivamente) y la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 3 (números de aminoácido 1 a 23, 40 a 54, 62 a 93, y 103 a 113, respectivamente). El anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana del presente invento fue examinado en cuanto a la actividad ligante de antígenos, la actividad inhibidora de la migración de leucocitos y diversos índices de estabilidad anteriormente descritos y se halló que tenía las actividades y presentaba todos los índices A) a D) como características del mismo.

El anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana del presente invento, que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 1 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 3, puede ser fácilmente obtenido sintetizando un DNA que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 1 y un DNA que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 3 usando un método comúnmente conocido en la técnica, juntándolos en una clase apropiada de gen de región constante de anticuerpo humano, preferiblemente el gen de la región constante Igy1 humana para la cadena pesada y el gen de la región constante Igk humana para la cadena ligera, para construir un gen de anticuerpo humanizado, introduciendo el gen de anticuerpo humanizado en un vector de expresión usando diversos métodos comúnmente conocidos en la técnica o el método descrito en el Documento WO02/081522 o WO03/027151 y similares, introduciendo el vector de expresión en células cultivadas, cultivando las células cultivadas, y purificando el anticuerpo a partir del cultivo obtenido. En cuanto al gen de cadena pesada de anticuerpo humanizado preferible del presente invento, obtenido al juntar el gen de región variable de cadena pesada mostrado por la ID. SEC. nº 1 y el gen de región constante de cadena pesada Igy1 humana, se puede mencionar un gen que comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 25, más preferiblemente un gen que comprende la secuencia de bases mostrada por la ID. SEC. nº 24. En cuanto al gen de cadena ligera de anticuerpo humanizado preferible del presente invento, obtenido al juntar el gen de región variable de cadena ligera mostrado por la ID. SEC. nº 3 y el gen de región constante de cadena ligera Igk humana, se puede mencionar un gen que comprende una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 27, más preferiblemente un gen que comprende la secuencia de bases mostrada por la ID. SEC. nº 26. En cuanto al anticuerpo anti-osteopontina humanizado del presente invento, codificado por un gen de cadena pesada que comprende la secuencia de bases mostrada por la ID. SEC. nº 24 y un gen de cadena ligera que comprende la secuencia de bases mostrada por la ID. SEC. nº 26, se puede mencionar R2K1v1.7, descrito más adelante en un ejemplo.

Alternativamente, el anticuerpo humanizado anti-osteopontina del presente invento, que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 1 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 3, puede ser también sintetizado con un DNA que codifica la anteriormente descrita secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 1 y un gen de región constante de cadena pesada de anticuerpo humano, y un DNA que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 3 y un gen de región constante de cadena ligera de anticuerpo humano, como moldes, usando un sistema de transcripción/traducción exento de células. El sistema de transcripción/traducción exento de células utilizado puede ser uno comercialmente asequible y puede ser preparado de acuerdo con un método *per se* conocido, específicamente el método descrito por J. M. Pratt et al., "Transcription and Translation", redactado por B. D. Hames y S. J. Higgins, IRL Press, Oxford, 179-209 (1984), y similares para extracto de *Escherichia coli*. En cuanto al lisado celular comercialmente asequible, se pueden mencionar el sistema de extracto de *E. coli* S30 (fabricado por Promega Company), el sistema de traducción rápida RTS 500 (fabricado por Roche Company) y similares, derivados de *Escherichia coli*, se pueden mencionar el sistema de lisado de reticulocitos de conejo (fabricado por Promega Company) y similares, derivados de reticulocitos de conejo, y se pueden mencionar PROTEIOS™ (fabricado por TOYOBO Company) y similares, derivados de germen de trigo. Entre ellos, son adecuados aquellos en que se utiliza un lisado de germen de trigo. En cuanto a un método para preparar un lisado de germen de trigo, se pueden utilizar, por ejemplo, el método descrito por F. B. Johnston et al., Nature 179, 160-161 (1957) o A. H. Erickson et al., Meth. Enzymol. 96, 38-50 (1996) y similares.

El presente invento también abarca fragmentos de anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana (fragmentos de anticuerpo) tales como fragmentos de región variable de cadena sencilla (scFv), Fab, Fab' y F(ab')₂, que comprenden una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 1 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 3, y conservan las actividades.

El conector para unir una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), que se puede utilizar para preparar scFv, no está sujeto a limitación con tal de que el fragmento de anticuerpo del presente invento pueda tener las características anteriormente descritas; se puede mencionar, por ejemplo, un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por GGGGSGGGGSGGGGS (ID. SEC. nº 14). Los expertos en la técnica son capaces de preparar un anticuerpo fusionado del anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana o un fragmento de anticuerpo y otro péptido o proteína, y de preparar un anticuerpo modificado con un agente modificador unido a él, basándose en el presente invento. El otro péptido o proteína utilizado para la fusión no está sujeto

a limitación con tal de que no reduzca la actividad ligante del anticuerpo; se pueden mencionar, por ejemplo, albúmina sérica humana, diversas etiquetas peptídicas, un motivo peptídico helicoidal artificial, proteínas ligantes de maltosa, glutatión S-transferasa, diversas toxinas, otros péptidos o proteínas capaces de provocar multimerización y similares. El agente modificador utilizado para la modificación no está sujeto a limitación con tal de que no reduzca la actividad ligante del anticuerpo; por ejemplo, se pueden mencionar polietilenglicol, cadenas de azúcar, fosfolípidos, liposomas, compuestos de bajo peso molecular y similares.

El presente invento también proporciona un gen que codifica el anticuerpo del presente invento o un fragmento del mismo, y un vector de expresión que lo comprende. El vector de expresión del presente invento no está sujeto a limitación con tal de que sea capaz de expresar un gen que codifica el anticuerpo del presente invento o un fragmento del mismo en diversas células huésped procarionóticas y/o eucarióticas, y producir estos polipéptidos. Por ejemplo, se pueden mencionar vectores plasmídicos, vectores víricos (por ejemplo, adenovirus y retrovirus) y similares.

El vector de expresión del presente invento puede comprender un gen que codifica el anticuerpo del presente invento o un fragmento del mismo, y un promotor funcionalmente unido al gen. En cuanto al promotor para que se exprese el polipéptido del presente invento en una bacteria, cuando el huésped es una bacteria del género *Escherichia*, se pueden mencionar, por ejemplo, el promotor Trp, el promotor lac, el promotor recA, el promotor λ PL, el promotor lpp, el promotor tac y similares. En cuanto al promotor para que se exprese el anticuerpo del presente invento o un fragmento del mismo en una levadura, se pueden mencionar, por ejemplo, el promotor PH05, el promotor PGK, el promotor GAP y el promotor ADH; cuando el huésped es una bacteria del género *Bacillus*, se pueden mencionar el promotor SL01, el promotor SP02, el promotor penP y similares. Cuando el huésped es una célula eucariótica tal como una célula de mamífero, se pueden mencionar el promotor derivado de SV40, el promotor de retrovirus, el promotor de choque térmico y similares.

Cuando se usa una bacteria, particularmente *Escherichia coli*, como célula huésped, el vector de expresión del presente invento puede comprender además un codón de iniciación, un codón de parada, una región terminadora y una unidad replicable. Cuando se utiliza una levadura, una célula de animal o una célula de insecto como huésped, el vector de expresión del presente invento puede comprender un codón de iniciación y un codón de parada. En este caso, pueden estar contenidas una secuencia potenciadora, regiones no codificadoras en el lado 5' y el lado 3' de un gen que codifica el polipéptido del presente invento, una juntura de corte y empalme, un sitio de poliadenilación, o una unidad replicable y similares. De acuerdo con el uso previsto, puede estar contenido un marcador de selección de uso común (por ejemplo, tetraciclina, ampicilina o kanamicina).

El presente invento también proporciona un transformante que lleva incorporado el gen del presente invento. Dicho transformante puede ser preparado, por ejemplo, transformando una célula huésped con el vector de expresión del presente invento. La célula huésped usada para preparar un transformante no está sujeta a limitación con tal de que se empareje con el vector de expresión anteriormente mencionado y sea transformable; como ejemplos, se pueden mencionar diversas células tales como células naturales o líneas artificialmente establecidas de células de uso común en el campo técnico del presente invento [por ejemplo, bacterias (bacterias del género *Escherichia* y bacterias del género *Bacillus*), levaduras (del género *Saccharomyces*, el género *Pichia* y similares) células de animales o células de insectos (por ejemplo, Sf9) y similares]. La transformación se puede llevar a cabo mediante un método *per se* conocido.

El presente invento también proporciona un método para producir el anticuerpo del presente invento o un fragmento del mismo, que comprende dejar que una célula huésped exprese el gen del presente invento, es decir, utilizar dicho transformante.

En la producción del anticuerpo del presente invento o un fragmento del mismo, se puede cultivar el transformante en un medio nutriente. El medio nutriente contiene preferiblemente una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno inorgánico o una fuente de nitrógeno orgánico, necesarias para el crecimiento del transformante. Como ejemplos de la fuente de carbono, se pueden mencionar glucosa, dextrano, almidón soluble, sacarosa y similares; como ejemplos de la fuente de nitrógeno inorgánico o la fuente de nitrógeno orgánico, se pueden mencionar sales de amonio, nitratos, aminoácidos, extracto de embrión de maíz, peptona, caseína, extracto de carne, torta de soja, extracto de patata y similares. Si se desea, pueden estar contenidos otros nutrientes [por ejemplo, sales inorgánicas (por ejemplo, cloruro cálcico, dihidrogenofosfato sódico y cloruro magnésico), vitaminas, antibióticos (por ejemplo, tetraciclina, neomicina, ampicilina, kanamicina y similares) y similares].

El cultivo del transformante puede ser llevado a cabo mediante un método *per se* conocido. Las condiciones de cultivo, por ejemplo, la temperatura, el pH del medio y el tiempo de cultivo, se seleccionan según sea apropiado. Por ejemplo, cuando el huésped es una célula de animal, se puede utilizar como medio un medio MEM que contiene aproximadamente de 5 a 20% de suero bovino fetal (Science, volumen 122, página 501, 1952), medio DMEM (Virology, volumen 8, página 396, 1959), medio RPMI 1640 (J. Am. Med. Assoc., volumen 199, página 519, 1967), medio 199 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., volumen 73, página 1, 1950) y similares. El pH del medio es preferiblemente de aproximadamente 6 a 8, el cultivo se lleva normalmente a cabo a una temperatura de aproximadamente 30 a 40 °C durante aproximadamente 15 a 72 horas, y el cultivo puede ser aireado o agitado según sea necesario. Cuando el

huésped es una célula de insecto, se pueden mencionar el medio de Grace que comprende suero bovino fetal (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, volumen 82, página 8404, 1985) y similares, y el pH de los mismos es preferiblemente de aproximadamente 5 a 8. El cultivo se lleva normalmente a cabo a una temperatura de aproximadamente 20 a 40 °C durante 15 a 100 horas, y el cultivo puede ser aireado o agitado según sea necesario. Cuando el huésped es una bacteria, un actinomiceto, una levadura o un hongo filamentoso, es apropiado, por ejemplo, un medio líquido que comprenda las fuentes nutrientes anteriormente descritas. Es preferible un medio que tenga un pH de 5 a 8. Cuando el huésped es *E. coli*, se pueden mencionar el medio LB, el medio M9 (Miller et al., Exp. Mol. Genet., Cold Spring Harbor Laboratory, página 431, 1972) y similares como medios preferibles. En este caso, el cultivo puede ser llevado normalmente a cabo a una temperatura de 14 a 43 °C durante aproximadamente 3 a 24 horas, mientras se airea o agita el cultivo según es necesario. Cuando el huésped es una bacteria del género *Bacillus*, el cultivo puede ser llevado normalmente a cabo a una temperatura de 30 a 40 °C durante aproximadamente 16 a 96 horas, mientras se airea o agita el cultivo según es necesario. Cuando el huésped es una levadura, se puede mencionar el medio mínimo de Burkholder (Bostian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, volumen 77, página 4505, 1980) como ejemplo del medio, y el pH es deseablemente de 5 a 8. El cultivo se lleva normalmente a cabo a una temperatura de aproximadamente 20 a 35 °C durante aproximadamente 14 a 144 horas, y el cultivo puede ser aireado o agitado según sea necesario.

Se puede recuperar, preferiblemente aislar y purificar, el anticuerpo del presente invento o un fragmento del mismo a partir de un transformante cultivado como el anteriormente descrito. Como ejemplos del método de aislamiento y purificación se pueden mencionar los métodos basados en diferencias de solubilidad, tales como la precipitación con sales y la precipitación con disolventes; los métodos basados en diferencias de peso molecular, tales como la diálisis, la ultrafiltración, la filtración en gel, y la electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico; los métodos basados en diferencias de carga eléctrica, tales como la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía sobre hidroxilapatito; los métodos basados en una afinidad específica, tal como la cromatografía de afinidad; los métodos basados en diferencias de hidrofobia, tal como la cromatografía de alta eficacia en estado líquido y fase inversa; los métodos basados en diferencias en el punto isoeléctrico, tal como el enfoque isoeléctrico; y similares.

El presente invento ha sido anteriormente descrito de modo general; a continuación se proporcionan ejemplos particulares a los que se hace referencia para facilitar la comprensión de aquél, ejemplos que, sin embargo, son solamente con fines ilustrativos y no limitan nunca el alcance del invento.

Ejemplos

A continuación se proporcionan ejemplos. Los procedimientos en que está implicado el uso de un kit y similares se llevaron a cabo del modo descrito en el protocolo adjunto al mismo, a menos que se afirme otra cosa.

(1. Preparación del anticuerpo 2K1 humanizado)

En el presente invento, se prepararon dos tipos de anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana preparados al humanizar el anticuerpo 2K1, que es un anticuerpo anti-osteopontina humana procedente de ratón, descrito en el Boletín Oficial WO2003/027151 de Publicación de Patente Internacional (al que más adelante también se hace referencia como anticuerpo 2K1 humanizado o anticuerpo R2K1).

Puesto que cada anticuerpo 2K1 humanizado fue generalmente preparado de acuerdo con el método descrito en el boletín oficial anteriormente descrito, se proporciona a continuación un resumen.

En primer lugar, se prepararon DNAs que codifican las regiones variables de cadena pesada (VHs) de 2 tipos de anticuerpo humanizado anti-OPN que tienen las secuencias de bases mostradas en la Figura 1 y la Figura 2, y DNAs que codifican las regiones variables de cadena ligera (VLs) de dos tipos de anticuerpo humanizado anti-OPN que tienen las secuencias de bases mostradas en la Figura 3 y la Figura 4, mediante una PCR utilizando un oligoDNA sintético. En la descripción siguiente, para distinguir las, a las VHs de anticuerpo humanizado anti-OPN humana mostradas en la Figura 1 y la Figura 2 se hace referencia como R2K1-VH1.7 y R2K1-VH1.8, respectivamente. Asimismo, a las VLs de anticuerpo humanizado anti-OPN humana mostradas en la Figura 3 y la Figura 4 se hace referencia como R2K1-VL1.7 y R2K1-VL1.8, respectivamente.

A continuación, cada uno de los DNAs anteriormente descritos que codifican las VHs de anticuerpo humanizado anti-OPN humana fue insertado en AG-γ1, que es un vector de expresión que comprende el gen para la cadena γ1 de región constante de inmunoglobulina humana, utilizando un sitio de reconocimiento para la endonucleasa HindIII de restricción y un sitio de reconocimiento para BamHI, de modo que se prepararon un plásmido de expresión de cadena pesada que tenía R2K1-VH1.7 y un plásmido de expresión de cadena pesada que tenía R2K1-VH1.8. Asimismo, cada uno de los DNAs anteriormente descritos que codifican las VLs de anticuerpo humanizado anti-OPN humana fue insertado en AG-κ, que es un vector de expresión que comprende el gen para la cadena κ de región constante de inmunoglobulina humana, de modo que se prepararon un plásmido de expresión de cadena ligera que tenía R2K1-VL1.8 y un plásmido de expresión de cadena ligera que tenía R2K1-VL1.7. Estos plásmidos de expresión fueron introducidos en *Escherichia coli* y proliferaron en ella, y fueron purificados utilizando un kit comercialmente asequible para purificación de plásmidos (QIAGEN Company).

- Finalmente, se transfectaron células CHO-DG44 con diversas combinaciones de los plásmidos de expresión purificados anteriormente descritos mediante el método del fosfato cálcico y se seleccionaron células en un medio MEM (Invitrogen Company) que comprendía geneticina (Invitrogen Company) y FCS dializado (Invitrogen Company), por lo que se obtuvieron células que expresaban dos tipos de anticuerpo 2K1 humanizado. Es decir, se expresaron el anticuerpo R2K1v1.8, que es un anticuerpo 2K1 humanizado que consiste en una cadena pesada que tiene R2K1-VH1.8 y una cadena ligera que tiene R2K1-VL1.8, y el anticuerpo R2K1v1.7, que es un anticuerpo 2K1 humanizado que consiste en una cadena pesada que tiene R2K1-VH1.7 y una cadena ligera que tiene R2K1-VL1.7.
- Se dejó que las células que producían cada anticuerpo R2K1, obtenidas mediante los procedimientos anteriormente descritos, se desarrollaran completamente en un medio MEM complementado con FCS dializado al 10%, y se sembraron las células en una botella rodante (BD Biosciences Company) y se cultivaron bajo las condiciones de 37 °C y una velocidad de rotación de 1 rpm. Varios días más tarde, se confirmó que las células se adherían a la pared del vaso y crecían en ella, se desechó el caldo de cultivo, se cambió el medio por 500 ml de medio MEM exento de suero, y se cultivaron las células bajo las condiciones anteriormente descritas. Aproximadamente 2 semanas más tarde, cuando muchas células se habían desprendido de la pared del vaso, el cultivo fue detenido y el sobrenadante del cultivo fue filtrado a través de un filtro de 0,22 µm y fue recuperado para obtener un sobrenadante de cultivo que contenía cada anticuerpo R2K1.
- Con estos sobrenadantes de cultivo como materiales de partida y utilizando una columna de proteína A (MILLIPORE Company) y una columna de intercambio aniónico (Amersham Company), se obtuvieron varios miligramos de cada uno de los dos tipos de anticuerpo humanizado purificado, es decir, el anticuerpo R2K1v1.8 y el anticuerpo R2K1v1.7.
- En los diversos experimentos descritos más adelante, se utilizaron los anticuerpos purificados obtenidos del modo anteriormente descrito. El anticuerpo 2K1 quimérico (al que más adelante también se hace referencia como anticuerpo C2K1) utilizado se obtuvo mediante el método descrito en el susodicho Boletín Oficial WO2003/027151 de Publicación de Patente Internacional.
- (2. Confirmación por ELISA de la capacidad de unión con un péptido de osteopontina humana)
- Se compararon las actividades ligantes de cada anticuerpo R2K1 y del anticuerpo C2K1 hacia un péptido de osteopontina humana (CVDTYDGRGDSVVYGLRS: ID. SEC. nº 13) con referencia al método de ELISA de Kon et al. [Journal of Cellular Biology 88: 420-432 (2002)]. Se proporciona a continuación un resumen.
- Se hizo reaccionar el péptido que tenía la secuencia anteriormente descrita (al que más adelante también se hace referencia como "péptido hOPN5") con BSA que llevaba incorporado un grupo maleimida introducido utilizando Sulfo-EMCS (Dojindo Laboratories), para preparar un producto de conjugación de hOPN5-BSA. Se inmovilizó el producto de conjugación de hOPN5-BSA, en una cantidad de 200 ng/100 µl/pocillo, en una placa para ELISA (Nunc Company) a 4 °C durante la noche y se lavó la placa, después de lo cual se llevó a cabo un bloqueo con PBS complementado con BSA al 1% a 4 °C durante la noche. Se añadió a la placa, en una cantidad de 100 µl/pocillo, una muestra de anticuerpo diluida con PBS complementado con BSA al 1% y se dejó reaccionar el conjunto a 37 °C durante 1 hora. La detección se llevó a cabo utilizando un anticuerpo anti-IgG humana (H + L) marcado con peroxidasa (HRP) (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.). Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm utilizando un dispositivo lector de microplacas (Molecular Devices Company).
- Como resultado, se confirmó que las capacidades ligantes del anticuerpo R2K1v1.7 y el anticuerpo R2K1v1.8 con respecto al péptido hOPN5 eran equivalentes a la del anticuerpo C2K1 (Figura 5).
- (3. Actividad inhibitoria del anticuerpo R2K1 sobre la migración de monocitos humanos de sangre periférica)
- Se examinó la actividad inhibitoria del anticuerpo purificado sobre la migración de monocitos de sangre periférica activados con citocinas, del modo descrito a continuación.
- En primer lugar, se diluyó al doble, con medio RPMI 1640, sangre heparinizada extraída de una persona sana. Se cubrió Ficoll-Paque (Farmacia K.K.) con la sangre diluida y se centrifugó el conjunto a 400xg durante 30 minutos a temperatura ambiental. La capa blanca que se veía en la interfase entre el plasma y el Ficoll-Paque fue recuperada y utilizada como monocitos. Los monocitos así obtenidos fueron cultivados y activados con TNF-α humano (20 ng/ml) durante la noche y fueron utilizados en experimentos de migración.
- Los experimentos de migración se llevaron a cabo utilizando una cámara para microquimiotaxis de 48 pocillos (Neuro Probe Inc.). La OPN humana fue escindida mediante una reacción con trombina bovina (Sigma) a 37 °C durante 2 horas. Se añadió cada uno de los anticuerpos R2K1 y el anticuerpo C2K1 en diversas concentraciones y se dejó que la mezcla reposara a 37 °C durante 15 minutos, después de lo cual se añadió a la cámara inferior (la concentración final de OPN humana fue 10 µg/ml). Se fijó sobre la cámara un filtro de policarbonato (5 µm de tamaño de poro) y se

añadieron 50 µl de una suspensión celular (2×10^6 células/ml) a la cámara superior.

Después de un cultivo a 37 °C en presencia de CO₂ al 5% durante 2 horas, se retiró el filtro de policarbonato y se separaron las células situadas sobre la superficie del filtro superior, después de lo cual se tiñeron las células con Diff-Quick (Baxter Company). Se contó el número de células sobre la superficie del filtro superior bajo 40 aumentos y se expresaron los resultados como la cuenta celular media (células/mm³) ± error estándar de la media (SEM; del inglés, standard error of mean) para 6 pocillos (Tabla 1). A partir de estos resultados, tanto el anticuerpo R2K1v1.7 como el anticuerpo R2K1v1.8 inhibían la migración de monocitos humanos de sangre periférica activados por TNF-α hacia la osteopontina humana escindida por trombina, como con el anticuerpo C2K1.

Tabla 1

R2K1v1.7 y R2K1v1.8

	Cuenta celular media	SEM
Medio	701,7	24,8
Thr-OPN	881,7	24,0
R2K1v1.7, 50 µg/ml	723,3	43,0
R2K1v1.8, 50 µg/ml	688,3	16,6
C2K1		
	Cuenta celular media	SEM
Medio	686,7	15,9
Thr-OPN	860,0	30,7
C2K1, 50 µg/ml	671,7	48,5

(4. Evaluación de la estabilidad térmica por ELISA)

Cada uno del anticuerpo C2K1 y los dos tipos de anticuerpo R2K1 fue diluido hasta 50 µg/ml con PBS y fue tratado durante 2 horas en un baño de agua a 70 °C. A continuación, se restituyó la temperatura de cada dilución al valor ambiental y se representó gráficamente, como actividad residual, la relación entre la absorbancia obtenida mediante el ELISA anteriormente descrito y la absorbancia de una muestra no tratada. La actividad residual se calculó utilizando los valores de absorbancia que caían en el intervalo de 0,2 a 2,0 con linealidad (lo mismo se aplica más adelante). Como resultado, se halló que la actividad residual después del tratamiento anteriormente descrito era mayor para el anticuerpo R2K1v1.7 y el anticuerpo R2K1v1.8 que para el anticuerpo C2K1 (Figura 6). En particular, el anticuerpo R2K1v1.7 presentaba una actividad residual que superaba el 90%. Esto demostró que el anticuerpo R2K1v1.7 y el anticuerpo R2K1v1.8 tenían una estabilidad térmica mejorada en comparación con el anticuerpo C2K1.

(5. Evaluación de la resistencia a un pH bajo por ELISA)

Cada una de las provisiones purificadas del anticuerpo C2K1 y los dos tipos de anticuerpo R2K1 fue diluida con PBS hasta 50 µg/ml. Se ajustó el pH de cada dilución a 5 con HCl 1 N utilizando un pH-metro (HORIBA Company) y se trató cada dilución a 25 °C durante 2 horas. A continuación, se ajustó el pH de la dilución a 7 con Tris-HCl 1 M (pH de 9,5) y se representó gráficamente, como actividad residual, la relación entre la absorbancia obtenida mediante el ELISA anteriormente descrito y la absorbancia de una muestra no tratada. Como resultado, se halló que la actividad residual después del tratamiento anteriormente descrito era significativamente mayor para el anticuerpo R2K1v1.7 que para el anticuerpo C2K1 y el anticuerpo R2K1v1.8 (Figura 7). Esto demostró que el anticuerpo R2K1v1.7 tenía una resistencia mejorada a un pH bajo en comparación con el anticuerpo R2K1v1.8 y el anticuerpo C2K1.

(6. Evaluación de la resistencia al hidrocloreto de guanidina por espectrometría de fluorescencia)

Se ajustó cada uno del anticuerpo C2K1 y los dos tipos de anticuerpo R2K1 a 50 µg/ml utilizando un tampón de fosfato sódico 20 mM + NaCl 120 mM (pH de 7) que contenía diferentes concentraciones de hidrocloreto de guanidina (para el testigo, no se añadió hidrocloreto de guanidina) y se dejó que reposaran a 10 °C durante la noche, después de lo cual se midió el espectro de fluorescencia de cada muestra. La medición del espectro de fluorescencia se llevó a cabo utilizando el espectrofluorómetro FP-6500 (JASCO Company). Utilizando una cubeta que tenía un paso óptico de 3 mm, se barrió la fluorescencia emitida por el triptófano, excitado por una luz de 280 nm, a lo largo del intervalo de longitudes de onda que va de 320 nm a 370 nm. Se comparó la relación entre la concentración de hidrocloreto de guanidina y la longitud de onda de intensidad máxima entre los anticuerpos. Como resultado, se observó un desplazamiento de la longitud de onda de intensidad máxima, debido al relajamiento de la estructura estérica de la proteína, desde el momento en que la concentración de hidrocloreto de guanidina excedió justo de 1 M para C2K1 o 2 M para R2K1v1.8, mientras que la longitud de onda de intensidad máxima para R2K1v1.7 no se desplazó hasta 3,8 M (Figura 8). Esto demostró que el anticuerpo R2K1v1.7 tenía una resistencia mejorada al hidrocloreto de gua-

nidina en comparación con el anticuerpo R2K1V1.8 y el anticuerpo C2K1.

(7. Evaluación de la resistencia a un pH bajo por CD)

5 Se ajustó cada uno del anticuerpo C2K1 y el anticuerpo R2K1v1.7 a 2 mg/ml con tampón de citrato 20 mM + NaCl 120 mM (pH de 6). Se añadieron HCl 0,1 N y agua destilada a los mismos para preparar muestras con diversos niveles de pH que tenían una concentración de anticuerpo de 1 mg/ml; tras haber sido tratadas a temperatura ambiental durante 1 hora, se midió el espectro de CD de cada muestra.

10 Las mediciones de dicroísmo circular (CD) se llevaron a cabo utilizando el espectropolarímetro J-820 (JASCO Company). Utilizando una cubeta que tenía un paso óptico de 0,1 mm, se midió el espectro de CD a lo largo del intervalo de longitudes de onda que va de 205 nm a 260 nm. En el análisis espectral se empleó el programa JWSSE-4890 para análisis de estructuras secundarias de proteínas modelo (JASCO Company), que se basa en el método analítico espectral por CD de Yang et al. [Methods in Enzymology, 130, 208-269 (1986)]. Se compararon las relaciones entre la proporción de contenido de estructura aleatoria, según se calcula por este método, y el pH de tratamiento entre los anticuerpos. Como resultado, la proporción de contenido de estructura aleatoria aumentaba a partir de un pH de 3 para el anticuerpo C2K1, mientras que no se observó aumento alguno de estructura aleatoria hasta un pH de 2,7 para R2K1v1.7 (Figura 9). Esto confirmó que el anticuerpo R2K1v1.7 tenía una resistencia a un nivel de pH 0,3 menor que el anticuerpo C2K1.

20 (8. Evaluación de la estabilidad térmica utilizando un calorímetro diferencial de barrido)

25 Se disolvió cada uno del anticuerpo C2K1 y el anticuerpo R2K1v1.7 en tampón de citrato 20 mM + NaCl 120 mM (pH de 6,0), en una concentración de 1 mg/ml, y se examinó su estabilidad térmica usando un calorímetro diferencial ultrasensible de barrido de MicroCal Company (plataforma VP Capillary DSC). Los resultados se muestran en la Figura 10. La temperatura de transición en el punto medio (T_m), que indica la temperatura de mayor desnaturalización de la estructura, fue 76,0 °C para el anticuerpo C2K1 y 82,8 °C para el anticuerpo R2K1v1.7; se confirmó un aumento de aproximadamente 6 °C. Esto demostró que el anticuerpo R2K1v1.7 tenía una estabilidad térmica notablemente mejorada.

30 (9. Efecto inhibitorio de la adhesión celular del R2K1v1.7 sobre OPN)

35 Para comparar los efectos farmacológicos del anticuerpo R2K1v1.7 del presente invento de esta solicitud y los de un anticuerpo humanizado anti-OPN comúnmente conocido (al que más adelante se hace referencia como R2K1v0; véase el Documento WO03/027151), se examinaron los efectos inhibitorios de la adhesión celular de estos dos anticuerpos sobre la OPN humana.

1. Cultivo y pasaje de células

40 Se obtuvieron células Jurkat E6.1 de Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., y se subcultivaron y cultivaron utilizando RPMI 1640 (FCS al 10%, penicilina-estreptomicina).

2. Preparación de reactivos

45 Tampón de adhesión (medio L-15, BSA al 1%, HEPES 50 mM, pH de 7,4)

Disolución de PMA {40 ng/ml de 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA) [Sigma] en tampón de adhesión}

50 Disolución de VC para tinción [violeta cristal (VC) al 0,5%, formamida al 1%, metanol al 20%]

Disolución de GST {5 µg/ml de glutatión S-transferasa (GST) [Sigma] en PBS (-)}

Disolución de IgG₁ humana {400 µg/ml en PBS (-) [CALBIOCHEM]}

55 3. Preparación de osteopontina (OPN) N-terminal humana escindida con trombina

Se preparó OPN N-terminal humana escindida con trombina y fusionada con GST (N-OPN humana-GST, 1,6 mg/ml) del modo descrito en el Documento WO02/081522 y se utilizó en los experimentos después de ser diluida con PBS (-) hasta 5 µg/ml.

60 4. Preparación de fármacos de ensayo

65 Se diluyó cada uno de R2K1v1.7 (18,6 mg/ml) y R2K1v0 (4,39 mg/ml) con PBS (-) hasta 4, 12, 40, 120 y 400 µg/ml; se añadió IgG₁ humana a todas estas disoluciones diluidas para obtener una concentración total de proteína de 400 µg/ml.

5. Agrupamiento

Grupo del blanco (GST)

5

Grupo testigo

Grupo de fármacos de ensayo

10 R2K1v1.7 (1, 3, 10, 30, 100 µg/ml)

R2K1v0 (1, 3, 10, 30, 100 µg/ml)

6. Experimentos de adhesión celular

15

Se añadieron 25 µl de la disolución de N-OPN humana-GST a todos los pocillos de una microplaca de 96 pocillos salvo a los pocillos del blanco, o se añadieron 25 µl de la disolución de GST para el grupo del blanco, y se incubó la placa a 37 °C durante 1 hora, después de lo cual se lavó dos veces la placa con PBS (-). Se añadieron 50 µl de la disolución de PMA y se incubó la placa a 37 °C durante 30 minutos, después de lo cual se añadieron 25 µl de la disolución del fármaco de ensayo (grupo del fármaco de ensayo) o de la disolución de IgG₁ humana (grupo del blanco y grupo testigo). Se suspendieron células Jurkat E6.1 en el tampón de adhesión para obtener una densidad celular de 2x10⁶ células/ml y se añadieron 25 µl a todos los pocillos. Se centrifugó la suspensión a 15xg durante 1 minuto para que precipitaran las células en el fondo de la placa, después de lo cual se incubó la placa a 37 °C durante 1 hora. Tras la compleción de la reacción, se invirtió la placa y se centrifugó a 47xg durante 2 minutos y se separó el sobrenadante (células no adherentes). Para la cuantificación de células adherentes, se añadieron 25 µl de la disolución de tinte VC y se dejó que la placa reposara a temperatura ambiental durante 10 minutos para que se tiñeran y fijaran las células, después de lo cual se lavó la placa tres veces con agua pura, se añadieron 25 µl de una disolución de Triton-X100 al 1% a todos los pocillos y, una vez que se hubo confirmado la solubilización de las células, se midió la absorbancia (medición a una longitud de onda de 595 nm) usando un dispositivo lector de microplacas (SPECTRAMax250, Molecular Devices).

20

25

30

7. Análisis

En los experimentos se emplearon 5 pocillos por grupo. Se calcularon el valor medio de absorbancia y el índice de supresión para cada grupo y se calcularon los valores de IC50 (concentraciones del fármaco de ensayo para un índice de supresión del 50%). El índice de supresión para el grupo del blanco fue definido como 100% y el del grupo testigo como 0%. Los valores de IC50 fueron calculados representando gráficamente el logaritmo de la concentración del fármaco de ensayo en el eje X y el índice de supresión en el eje Y, y aplicando los datos a una ecuación de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados. En los cálculos de los valores de IC50 se emplearon los datos obtenidos con concentraciones del fármaco de ensayo que presentaban una relación lineal de dosis-respuesta. A partir de los resultados mostrados en la Figura 11, se entiende que el efecto inhibitorio de la adhesión celular de un anticuerpo humanizado anti-OPN humana comúnmente conocido es muy pequeño, mientras que R2K1v1.7 presenta un excelente efecto inhibitorio de la adhesión celular (valor de IC50: 6,4).

35

40

45 (10. Efectos de R2K1v1.7 sobre la artritis provocada con colágeno en macaco cangrejero)

Se inmunizaron hembras de macaco cangrejero con colágeno bovino de tipo II (Collagen Gijyutsu Kenshukai) en emulsión en adyuvante completo de Freund (Becton Dickinson and Company), aplicado a los lomos y las colas 36 días antes de la medicación, y se administró un refuerzo 15 días antes de la medicación. Los animales se dispusieron aleatoriamente en tres grupos tratados con medicación (n = 10) sobre la base de cambios porcentuales en el peso corporal y en el área oblonga de la articulación interfalángica proximal con respecto a los niveles previos a la inmunización. Se administró R2K1v1.7 o disolvente testigo en una dosis de 25 mg/kg o 50 mg/kg por inyección intravenosa una vez a la semana, ocho veces en total. El primer día de medicación fue definido como día 0. Durante el período de administración, los días 0, 6, 13, 20, 27, 34, 41, 48 y 55 se controló el área oblonga de la articulación interfalángica proximal como un signo de hinchazón articular. Se midieron los ejes menor y mayor de las articulaciones interfalángicas proximales de las patas anteriores y posteriores usando calibres, se calcularon las áreas oblongas y se utilizó el valor medio de las áreas oblongas de 16 dedos como área oblonga de la articulación interfalángica proximal. Se calcularon los cambios porcentuales en el área oblonga de la articulación interfalángica proximal con respecto al valor previo a la medicación tomado como 100. El día 0, y los días 6, 13, 20, 27, 34, 41, 48 y 55 (6 días después de la medicación) se recogió plasma y se midieron R2K1v1.7 y el anticuerpo anti- R2K1v1.7. Esta concentración medida de R2K1v1.7 en el plasma corresponde al nivel valle. Se llevó a cabo el análisis de los datos después de suprimir los datos relativos a los animales positivos para el anticuerpo anti- R2K1v1.7 y a los animales que murieron durante el periodo de estudio.

50

55

60

65 Se generó el anticuerpo anti-R2K1v1.7 en 1 animal del grupo de R2K1v1.7 en dosis de 25 mg/kg y en 4 animales del

grupo de R2K1v1.7 en dosis de 50 mg/kg. Dos animales del grupo del disolvente testigo, 2 animales del grupo de R2K1v1.7 en dosis de 25 mg/kg y 1 animal del grupo de R2K1v1.7 en dosis de 50 mg/kg murieron después de la medicación. Los casos de muerte se atribuyeron a un debilitamiento general debido a una inflamación grave. El tratamiento con 50 mg/kg de R2K1v1.7 redujo significativamente la hinchazón de las patas, según se midió por el cambio porcentual en el área oblonga de la articulación interfalángica proximal con respecto al grupo del disolvente testigo, entre el día 27 y el día 55 (Figura 12). R2K1v1.7 en una dosis de 25 mg/kg no ejerció efecto significativo alguno sobre el cambio en el área oblonga de la articulación interfalángica proximal. En dosis de 25 mg/kg y 50 mg/kg, las concentraciones valle de R2K1v1.7 en el plasma fueron de 38,41 a 76,13 µg/ml y de 73,91 a 125,3 µg/ml, respectivamente. En cuanto a la secuencia SVVYGLR de OPN humana, a diferencia de la correspondiente secuencia de OPN de mono (SVAYGLR) (ID. SEC. n° 11), la afinidad ligante de R2K1v1.7 por este péptido de OPN humana es más de 100 veces mayor que la afinidad ligante por el correspondiente péptido de OPN de mono. Con estos hallazgos en mente, se estima que la concentración plasmática eficaz de R2K1v1.7 en el tratamiento de la artritis no es superior a 100 µg/ml.

11. Preparación de scFv de R2K1v1.7)

Mediante una PCR con los anteriormente descritos plásmido de expresión de cadena pesada que tiene R2K1-VH1.7 y plásmido de expresión de cadena ligera que tiene R2K1-VL1.7 como moldes, se preparó un fragmento de DNA que codifica un fragmento de región variable de cadena sencilla (scFv) que tiene la estructura VH1.7-conector-VL1.7 [el conector era la secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada por GGGGSGGGGSGGGGS (ID. SEC. n° 14)]. Al final de este fragmento de DNA se añade una secuencia reconocida por las endonucleasas de restricción Sfil y NotI. Este fragmento de DNA fue digerido con las endonucleasas de restricción Sfil y NotI y fue insertado en el sitio Sfil y el sitio NotI del vector pCANTAB5E (J. D. Marks et al., J. Mol. Biol., volumen 222, páginas 581-97, 1991), también previamente digerido con Sfil y NotI, por lo que se preparó un plásmido de expresión de scFv de R2K1-VH1.7. A este plásmido de expresión se añade, cadena abajo de la región de codificación de scFv, una secuencia de bases que codifica la etiqueta E. Este plásmido fue introducido en la cepa HB2151 de *Escherichia coli* de acuerdo con un método convencional y fue sembrado en una placa de agar SOBAG (una placa SOB que contiene glucosa al 2% y 100 µg/ml de ampicilina) para obtener un clon transformante. A partir del clon obtenido se extrajo un DNA plasmídico; la secuencia de la región de codificación de scFv fue confirmada mediante un análisis de la secuencia de bases del DNA con el DNA plasmídico como molde. En el análisis de la secuencia de bases del DNA se empleó el Kit DTCS-Quick Start y el Sistema CEQ2000XL para Análisis de DNA (ambos de Beckman Coulter, K. K.). La secuencia de bases obtenida es mostrada por la ID. SEC. n° 9.

Una vez que el clon de *Escherichia coli* cuya secuencia de bases fue confirmada hubo sido cultivado usando un medio 2xYT que contenía glucosa al 2% y 100 µg/ml de ampicilina, se suspendió una porción del mismo en un medio 2xYT complementado con IPTG 1 mM y 100 µg/ml de ampicilina y se cultivó adicionalmente durante la noche para provocar la expresión de scFv. Tras la compleción del cultivo, las células fueron recuperadas por centrifugación, suspendidas en PBS que contenía EDTA 1 mM y dejadas reposar en hielo durante 30 minutos. A continuación, la suspensión fue centrifugada a 10.000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante fue recuperado y fue filtrado a través de un filtro de 0,45 µm, por lo que se obtuvo una fracción periplásmica que contenía scFv. El scFv de R2K1v1.7 (al que más adelante se hace referencia como R2K1v1.7-scFv) fue purificado de esta fracción periplásmica por cromatografía de afinidad usando un anticuerpo anti-etiqueta E.

El R2K1v1.7-scFv así preparado fue sometido a una cromatografía de filtración en gel; a partir del patrón de separación mostrado en la Figura 13, se confirmó que casi todo era monómero.

(12. Confirmación de la capacidad de unión de R2K1v1.7-scFv hacia un péptido de osteopontina humana)

Se midió la actividad ligante del R2K1v1.7-scFv purificado hacia el péptido hOPN5 mediante un método de ELISA. En general, el método era igual al anteriormente descrito; en esta medición, como anticuerpo marcado se utilizó un anticuerpo anti-etiqueta E marcado con HRP. Los resultados se muestran en la Figura 14. Se confirmó que el R2K1v1.7-scFv purificado no se unía al testigo negativo de BSA pero se unía específicamente al péptido hOPN5.

(13. Preparación de un fragmento de anticuerpo modificado con polietilenglicol)

Una vez que el anticuerpo R2K1v1.7 hubo sido tratado con pepsina mediante un método estándar, se obtuvo F(ab')₂ purificado utilizando una columna HP de proteína G (ambos de Amersham Biosciences K.K.) y una columna de alta resolución de HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 (Amersham Biosciences K.K.). Posteriormente, el F(ab')₂ purificado fue reducido con DTT 0,1 M para activar el grupo tiol, tras lo cual se llevó a cabo una filtración en gel usando una columna de Sephadex G-25 (Amersham Biosciences K.K.) para separar el DTT. El Fab' así obtenido fue mezclado con polietilenglicol-maleimida SUNBRIGHT ME-120MA (NOF Corporation) en una relación molar de 1:10 y fue dejado en reposo a 4 °C durante la noche para causar una reacción de copulación. Una vez que se hubo añadido yodoacetamida (Nacalai Tesque) para detener la reacción de copulación, se obtuvo un F(ab')₂ modificado con polietilenglicol [al que también se hace referencia más adelante como F(ab')₂-PEG] por filtración en gel usando una columna de alta resolución de HiPrep 16/60 Sephacryl S-200. En la Figura 15 se muestran los resultados de una SDS-PAGE. Por

comparación con $F(ab')_2$ no modificado sometido a electroforesis como testigo de referencia, se confirmó un aumento del peso molecular por la modificación con polietilenglicol.

5 (14. Confirmación de la actividad ligante de $F(ab')_2$ -PEG hacia un péptido de osteopontina)

10 La actividad ligante del $F(ab')_2$ -PEG purificado de R2K1v1.7 hacia el péptido hOPN5 fue confirmada utilizando un ensayo de resonancia de plasmones superficiales. Se inmovilizó el péptido hOPN5 biotinizado sobre un Chip Sensor SA (BIAcore Company) y se confirmó su actividad ligante usando el $F(ab')_2$ -PEG, previamente diluido hasta 5 $\mu\text{g/ml}$ con tampón de HBS-EP (BIAcore Company); los resultados se muestran en la Figura 16. A partir de una subida en la señal, se confirmó que este $F(ab')_2$ -PEG tenía la misma actividad ligante que R2K1v1.7 hacia el péptido hOPN5.

Aplicabilidad industrial

15 Puesto que el anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana del presente invento es excelente en cuanto a actividades (actividad ligante de antígenos, actividad inhibitoria de la migración de leucocitos, y similares) y/o estabilidad (resistencia al calor, condiciones de bajo pH, agentes desnaturalizantes y similares), es útil como un agente más eficaz que los anticuerpos anti-osteopontina humana convencionales.

20 Aunque el presente invento ha sido descrito poniendo énfasis en realizaciones preferidas, resulta obvio a los expertos en la técnica que se pueden modificar las realizaciones preferidas. El presente invento pretende que el presente invento pueda ser materializado por métodos distintos a los descritos con detalle en la presente memoria descriptiva. En consecuencia, el presente invento abarca todas las modificaciones abarcadas en el alcance de las "REIVINDICACIONES" adjuntas.

25 Esta solicitud se basa en la solicitud de patente nº 2006-152892, presentada en Japón.

ES 2 384 350 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Astellas Pharma Inc.
Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute

<120> Anticuerpo anti-osteopontina humana humanizado

<130> 091084

<150> JP 2006-152892

<151> 2006-05-31

<160> 27

<170> PatentIn, versión 3.3

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 1

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 2

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

```

ES 2 384 350 T3

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

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

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 4

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

ES 2 384 350 T3

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

Arg

<210> 5
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Región R2K1-VH1.7

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(348)

<400> 5
 cag gtg cag ctg cag cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tcc gtg aag gtc tcc tgc aag gct ttg ggg tat acc ttc act gac tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 gaa atg cac tgg gtg aag cag acc cct gta cat ggg ctt gag tgg att 144
 Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 gga gct att cat cca gga aga ggt ggt act gcc tac aat cag aag ttc 192
 Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 aag ggc aag gcc acg ctg acc gcg gac aaa tcc act agt aca gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg gag ctg agc agc ctg aca tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 aca aga att act ggg tac ttc gat gtc tgg ggg caa ggg acc acg gtc 336
 Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 acc gtc tcc tca 348
 Thr Val Ser Ser
 115

ES 2 384 350 T3

<210> 6
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Región R2K1-VH1.8

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(348)

<400> 6
 cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag ctg gtg agg cct ggg tcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 tcc gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggg tat acc ttc act gac tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 gaa atg cac tgg gtg aag cag acc cct gta cat ggg ctt gag tgg att 144
 Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 gga gct att cat cca gga aga ggt ggt act gcc tac aat cag aag ttc 192
 Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 aag ggc aag gcc acg ctg acc gcg gac aaa tcc act agt aca gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg gag ctg agc agc ctg aca tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 aca aga att act ggg tac ttc gat gtc tgg ggg caa ggg acc acg gtc 336
 Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 acc gtc tcc tca 348
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Región R2K1-VL1.7

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)

<400> 7
 gat gtt gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg agc gtc acc ctt gga 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

ES 2 384 350 T3

cag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg agc tct caa agc att gta cat agt 96
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

aat gga aac acc tat ttg gaa tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct 144
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac aga ttc agc ggc agt ggg tca ggc act gat ttc aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc agg gtt gaa gct gaa gac gtc gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

tca cat gtt ccg ctc acg ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 336
 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

cgt 339
 Arg

<210> 8
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Región R2K1-VL1.8

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)

<400> 8

gat gtt gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc ctt gga 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

cag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg agc tct caa agc att gta cat agt 96
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

aat gga aac acc tat ttg gaa tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct 144
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac aga ttc agc ggc agt ggg tca ggc act gat ttc aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc agg gtt gaa gct gaa gac gtc gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288

ES 2 384 350 T3

Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	
			85					90						95		
tca	cat	ggt	ccg	ctc	acg	ttt	ggc	cag	ggg	acc	aag	ctg	gag	atc	aaa	336
Ser	His	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
			100				105					110				

cgt 339
Arg

<210> 9
<211> 732
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> R2K1v1.7-scFv

<400> 9

caggtgcagc	tcagcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	cgtgaaggtc	60
tcctgcaagg	ctttggggta	taccttcaact	gactatgaaa	tgactgggt	gaagcagacc	120
cctgtacatg	ggcttgagtg	gattggagct	attcatccag	gaagaggtgg	tactgcctac	180
aatcagaagt	tcaagggcaa	ggccacgctg	accgcggaca	aatccactag	tacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgac	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtac	aagaattact	300
gggtacttcg	atgtctgggg	gcaagggacc	acggtcaccg	tctcctcagg	tggaggcggg	360
tcaggcggag	gtggctctgg	cggtggcgga	tcggatgttg	tgatgacca	gtctccactc	420
tccctgagcg	tcacccttgg	acagccggcc	tccatctcct	gcaggagctc	tcaaagcatt	480
gtacatagta	atggaaacac	ctatctggaa	tggtagctgc	agaagccagg	gcagtctcca	540
cagctcctga	tctataaagt	ttccaaccga	ttttctgggg	tcccagacag	attcagcggc	600
agtgggtcag	gcactgattt	cacactgaaa	atcagcaggg	ttgaagctga	agacgtcgga	660
gtttattact	gctttcaagg	ttcacatgtt	ccgctcacgt	ttggccaggg	gaccaagctg	720
gagatcaaac	gt					732

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido parcial de osteopontina de ser humano o cerdo

<400> 10

Ser	Val	Val	Tyr	Gly	Leu	Arg
1				5		

<210> 11
<211> 7
<212> PRT

ES 2 384 350 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido parcial de osteopontina de mono

<400> 11

Ser Val Ala Tyr Gly Leu Arg
1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido parcial de osteopontina de ratón o rata

<400> 12

Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg
1 5

<210> 13

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido parcial de osteopontina

<400> 13

Cys Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu
1 5 10 15

Arg Ser

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Conector

<400> 14

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 15

<211> 441

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> R2K1-VH1.7 representado en la Figura 1

<220>

<221> CDS

<222> (20)..(424)

<400> 15

ES 2 384 350 T3

cagcaagctt gccgccacc atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg 52
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu
1 5 10

tca gta act gca ggt gtc caa tcc cag gtg cag ctg cag cag tct ggg 100
Ser Val Thr Ala Gly Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
15 20 25

gct gag gtg aag aag cct ggg gcc tcc gtg aag gtc tcc tgc aag gct 148
Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
30 35 40

ttg ggg tat acc ttc act gac tat gaa atg cac tgg gtg aag cag acc 196
Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr
45 50 55

cct gta cat ggg ctt gag tgg att gga gct att cat cca gga aga ggt 244
Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly
60 65 70 75

ggt act gcc tac aat cag aag ttc aag ggc aag gcc acg ctg acc gcg 292
Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala
80 85 90

gac aaa tcc act agt aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aca tct 340
Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser
95 100 105

gag gac acg gcc gtg tat tac tgt aca aga att act ggg tac ttc gat 388
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp
110 115 120

gtc tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtgga 434
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
125 130 135

tccgcga 441

<210> 16
<211> 135
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 16
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15
Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe
35 40 45
Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn
65 70 75 80
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

ES 2 384 350 T3

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 17
 <211> 441
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> R2K1-VH1.8 representado en la Figura 2

<220>
 <221> CDS
 <222> (20)..(424)

<400> 17
 cagcaagctt gccgccacc atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg 52
 Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu
 1 5 10
 tca gta act gca ggt gtc caa tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg 100
 Ser Val Thr Ala Gly Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
 15 20 25
 gct gag ctg gtg agg cct ggg tcc tcc gtg aag gtc tcc tgc aag gct 148
 Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
 30 35 40
 tct ggg tat acc ttc act gac tat gaa atg cac tgg gtg aag cag acc 196
 Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr
 45 50 55
 cct gta cat ggg ctt gag tgg att gga gct att cat cca gga aga ggt 244
 Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly
 60 65 70 75
 ggt act gcc tac aat cag aag ttc aag ggc aag gcc acg ctg acc gcg 292
 Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala
 80 85 90
 gac aaa tcc act agt aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aca tct 340
 Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser
 95 100 105
 gag gac acg gcc gtg tat tac tgt aca aga att act ggg tac ttc gat 388
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp
 110 115 120
 gtc tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtgga 434
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 125 130 135
 tccgcga 441

<210> 18
 <211> 135

ES 2 384 350 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 18
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 19
<211> 455
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> R2K1-VL1.7 representado en la Figura 3

<220>
<221> CDS
<222> (20)..(415)

<400> 19
cagcaagctt gccgccacc atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg 52
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met
1 5 10

ttc tgg att cct gct tcc agc agt gat gtt gtg atg act cag tct cca 100
Phe Trp Ile Pro Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro
15 20 25

ctc tcc ctg agc gtc acc ctt gga cag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg 148
Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg
30 35 40

agc tct caa agc att gta cat agt aat gga aac acc tat ttg gaa tgg 196
Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp
45 50 55

tac ctg cag aag cca ggg cag tct cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt 244

ES 2 384 350 T3

Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val
 60 65 70 75
 tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac aga ttc agc ggc agt ggg tca 292
 Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 80 85 90
 ggc act gat ttc aca ctg aaa atc agc agg gtt gaa gct gaa gac gtc 340
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val
 95 100 105
 gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt tca cat gtt ccg ctc acg ttt ggc 388
 Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly
 110 115 120
 cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cgt gactagaatt taaactttgc 435
 Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 125 130
 ttctcagtt ggatccgcga 455

<210> 20
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 20
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val
 20 25 30
 Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg
 130

<210> 21
 <211> 455
 <212> DNA
 <213> Artificial

ES 2 384 350 T3

<220>

<223> R2K1-VL1.8 representado en la Figura 4

<220>

<221> CDS

<222> (20)..(415)

<400> 21

```

cagcaagctt gccgccacc atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg      52
                Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met
                1           5           10

ttc tgg att cct gct tcc agc agt gat gtt gtg atg act cag tct cca      100
Phe Trp Ile Pro Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro
                15           20           25

ctc tcc ctg ccc gtc acc ctt gga cag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg      148
Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg
                30           35           40

agc tct caa agc att gta cat agt aat gga aac acc tat ttg gaa tgg      196
Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp
                45           50           55

tac ctg cag aag cca ggg cag tct cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt      244
Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val
                60           65           70           75

tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac aga ttc agc ggc agt ggg tca      292
Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
                80           85           90

ggc act gat ttc aca ctg aaa atc agc agg gtt gaa gct gaa gac gtc      340
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val
                95           100           105

gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt tca cat gtt ccg ctc acg ttt ggc      388
Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly
                110           115           120

cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cgt gagtagaatt taaactttgc      435
Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
                125           130

ttcctcagtt ggatccgca      455

```

<210> 22

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 22

```

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1           5           10           15

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
                20           25           30

Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
                35           40           45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
                50

```


ES 2 384 350 T3

Tyr Glu Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His Ser His
 225 230 235 240
 Lys Gln Ser Arg Leu Tyr Lys Arg Lys Ala Asn Asp Glu Ser Asn Glu
 245 250 255
 His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln Glu Leu Ser Lys Val Ser Arg Glu
 260 265 270
 Phe His Ser His Glu Phe His Ser His Glu Asp Met Leu Val Val Asp
 275 280 285
 Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe Arg Ile Ser His
 290 295 300
 Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Val Asn
 305 310

<210> 24
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena H de R2K1v1.7

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1338)

<400> 24
 cag gtg cag ctg cag cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tcc gtg aag gtc tcc tgc aag gct ttg ggg tat acc ttc act gac tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 gaa atg cac tgg gtg aag cag acc cct gta cat ggg ctt gag tgg att 144
 Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 gga gct att cat cca gga aga ggt ggt act gcc tac aat cag aag ttc 192
 Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 aag ggc aag gcc acg ctg acc gcg gac aaa tcc act agt aca gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg gag ctg agc agc ctg aca tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 aca aga att act ggg tac ttc gat gtc tgg ggg caa ggg acc acg gtc 336
 Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca 384
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

ES 2 384 350 T3

ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg 432
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc 480
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca 528
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg 576
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc 624
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca 672
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc 720
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct 768
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc 816
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca 864
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc 912
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc 960
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc 1008
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca 1056
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc 1104
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg 1152
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac 1200

ES 2 384 350 T3

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg 1248
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 1296
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa 1338
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 25
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 25
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

ES 2 384 350 T3

210		215		220
Cys Pro Pro Cys Pro	Ala Pro Glu Leu Leu	Gly Gly Pro Ser Val Phe		
225	230	235		240
Leu Phe Pro Pro Lys	Pro Lys Asp Thr	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
	245	250		255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val				
	260	265		270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr				
	275	280		285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val				
	290	295		300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys				
	305	310		315
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser				
	325	330		335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro				
	340	345		350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val				
	355	360		365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly				
	370	375		380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp				
	385	390		395
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp				
	405	410		415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His				
	420	425		430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys				
	435	440		445

<210> 26
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena L de R2K1v1.7

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(657)

<400> 26
 gat gtt gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg agc gtc acc ctt gga 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

cag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg agc tct caa agc att gta cat agt 96
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

ES 2 384 350 T3

aat gga aac acc tat ttg gaa tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct 144
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 gac aga ttc agc ggc agt ggg tca ggc act gat ttc aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 agc agg gtt gaa gct gaa gac gtc gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 tca cat gtt ccg ctc acg ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 336
 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag 384
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc 432
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa 480
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc 528
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag 576
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg 624
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 657
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 27
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 27
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

ES 2 384 350 T3

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana, que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 1 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 3.
2. El anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana de la Reivindicación 1, en que la región constante de cadena pesada del anticuerpo es Igy1 humana.
- 10 3. El anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana de la Reivindicación 1, en que la región constante de cadena ligera del anticuerpo es Igk humana.
- 15 4. El anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana de la Reivindicación 1, en que la región constante de cadena pesada del anticuerpo es Igy1 humana y la región constante de cadena ligera del anticuerpo es Igk humana.
- 20 5. Un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana, que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 25 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la ID. SEC. nº 27.
- 25 6. Un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana de la Reivindicación 1.
7. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido descrito en la Reivindicación 6.
8. Una célula huésped que lleva incorporado el vector de expresión de la Reivindicación 7.
9. Un método para producir un anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana, que comprende una operación para cultivar la célula huésped de la Reivindicación 8 para permitir que la célula exprese el anticuerpo humanizado anti-osteopontina humana.

FIG. 1

10	20	30	40	50	60
<u>CAGCAAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAAC</u>					
HindIII		M E W S W I F L F L L S V T			
70	80	90	100	110	120
<u>TGCAGGTGTCCAATCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG</u>					
A G V Q S Q V Q L Q Q S G A E V K K P G					
130	140	150	160	170	180
GGCCTCCGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTTGGGGTATACCTTCACTGACTATGAAATGCA					
A S V K V S C K A L G Y T F T D Y E M H					
190	200	210	220	230	240
CTGGGTGAAGCAGACCCCTGTACATGGGCTTGAGTGGATTGGAGCTATTCATCCAGGAAG					
W V K Q T P V H G L E W I G A I H P G R					
250	260	270	280	290	300
AGGTGGTACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACGCTGACCGCGGACAAATC					
G G T A Y N Q K F K G K A T L T A D K S					
310	320	330	340	350	360
CACTAGTACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACACGGCCGTGTATTA					
T S T A Y M E L S S L T S E D T A V Y Y					
370	380	390	400	410	420
CTGTACAAGAATTACTGGGTACTTCGATGTCTGGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC					
C T R I T G Y F D V W G Q G T T V T V S					
430	440				
CTCAGGTGAGTGGATCCGCGA					
S	BamHI				

FIG. 2

10	20	30	40	50	60
<u>CAGCAAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAAC</u>					
HindIII		M E W S W I F L F L L S V T			
70	80	90	100	110	120
<u>TGCAGGTGTCCAATCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGG</u>					
A G V Q S Q V Q L V Q S G A E L V R P G					
130	140	150	160	170	180
<u>GTCCTCCGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACTGACTATGAAATGCA</u>					
S S V K V S C K A S G Y T F T D Y E M H					
190	200	210	220	230	240
<u>CTGGGTGAAGCAGACCCCTGTACATGGGCTTGAGTGGATTGGAGCTATTCATCCAGGAAG</u>					
W V K Q T P V H G L E W I G A I H P G R					
250	260	270	280	290	300
<u>AGGTGGTACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACGCTGACCGCGGACAAATC</u>					
G G T A Y N Q K F K G K A T L T A D K S					
310	320	330	340	350	360
<u>CACTAGTACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACACGGCCGTGTATTA</u>					
T S T A Y M E L S S L T S E D T A V Y Y					
370	380	390	400	410	420
<u>CTGTACAAGAATTACTGGGTACTTCGATGTCTGGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC</u>					
C T R I T G Y F D V W G Q G T T V T V S					
430	440	450			
<u>CTCAGGTGAGTGGATCCGCGA</u>					
S	BamHI				

FIG. 3

10	20	30	40	50	60														
<u>CAGCAAGCTTGCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGAT</u>																			
HindIII		M	K	L	P	V	R	L	L	V	L	M	F	W	I				
70	80	90	100	110	120														
<u>TCCTGCTTCCAGCAGTGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGAGCGTCACCCT</u>																			
P	A	S	S	S	D	V	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	S	V	T	L
130	140	150	160	170	180														
TGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGAGCTCTCAAAGCATTGTACATAGTAATGGAAA																			
G	Q	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N
190	200	210	220	230	240														
CACCTATTTGGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATAA																			
T	Y	L	E	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	K
250	260	270	280	290	300														
AGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGGTCAGGCACTGA																			
V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D
310	320	330	340	350	360														
TTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTTGAAGCTGAAGACGTCGGAGTTTATTACTGCTTTCA																			
F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	F	Q
370	380	390	400	410	420														
AGGTTACATGTTCCGCTCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGAGTA																			
G	S	H	V	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R		
430	440	450																	
GAATTTAAACTTTGCTTCCTCAGTTGGATCCGCGA																			
			BamHI																

FIG. 4

10	20	30	40	50	60														
<u>CAGCAAGCTTGCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGAT</u>																			
HindIII		M	K	L	P	V	R	L	L	V	L	M	F	W	I				
70	80	90	100	110	120														
<u>TCCTGCTTCCAGCAGTGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCT</u>																			
P	A	S	S	S	D	V	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	L
130	140	150	160	170	180														
TGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGAGCTCTCAAAGCATTGTACATAGTAATGGAAA																			
G	Q	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N
190	200	210	220	230	240														
CACCTATTTGGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATAA																			
T	Y	L	E	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	K
250	260	270	280	290	300														
AGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGA																			
V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D
310	320	330	340	350	360														
TTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTTGAAGCTGAAGACGTCGGAGTTTATTACTGCTTTCA																			
F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	F	Q
370	380	390	400	410	420														
AGGTTACATGTTCCGCTCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGAGTA																			
G	S	H	V	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R		
430	440	450																	
GAATTTAAACTTTGCTTCCTCAGTTGGATCCGCGA																			
			BamHI																

FIG. 5

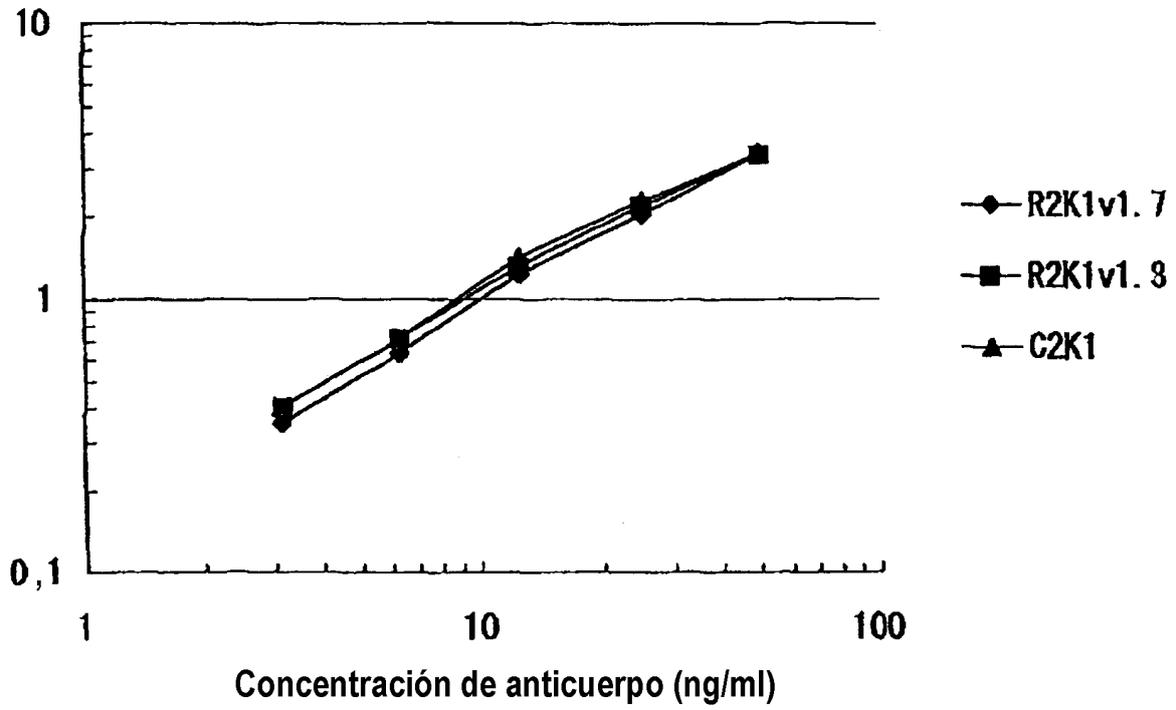


FIG. 6

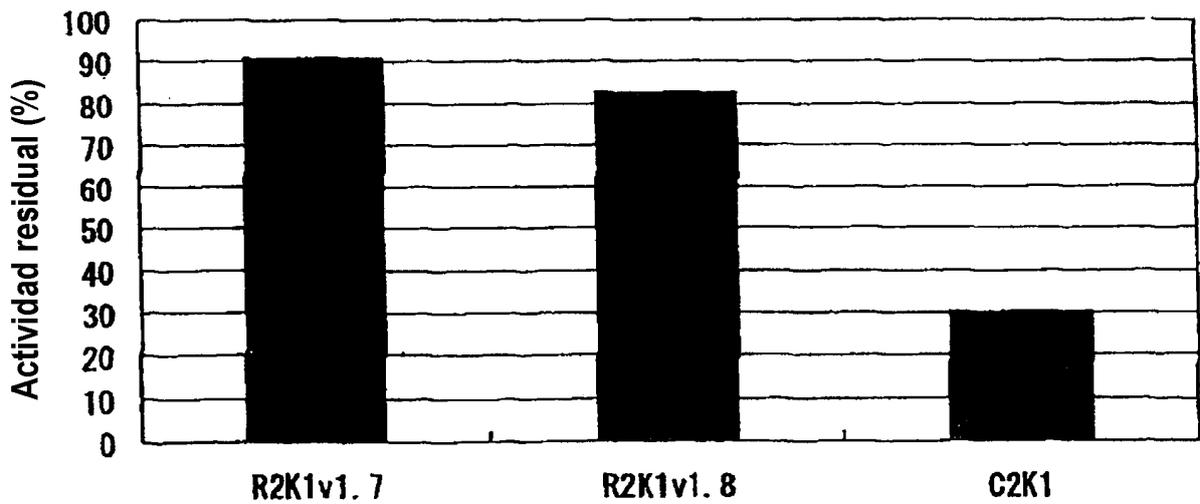


FIG. 7

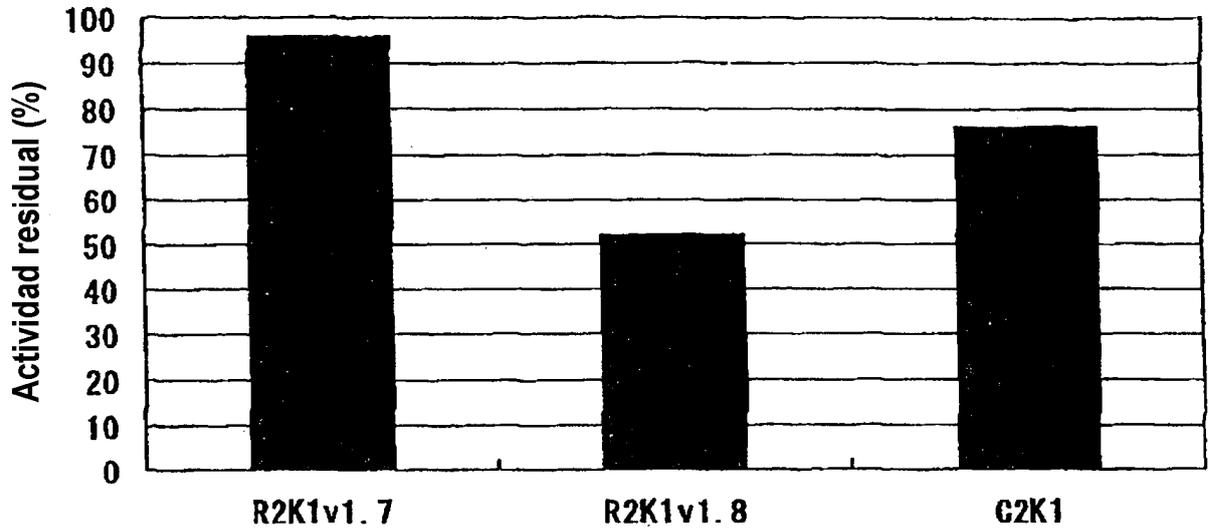


FIG. 8

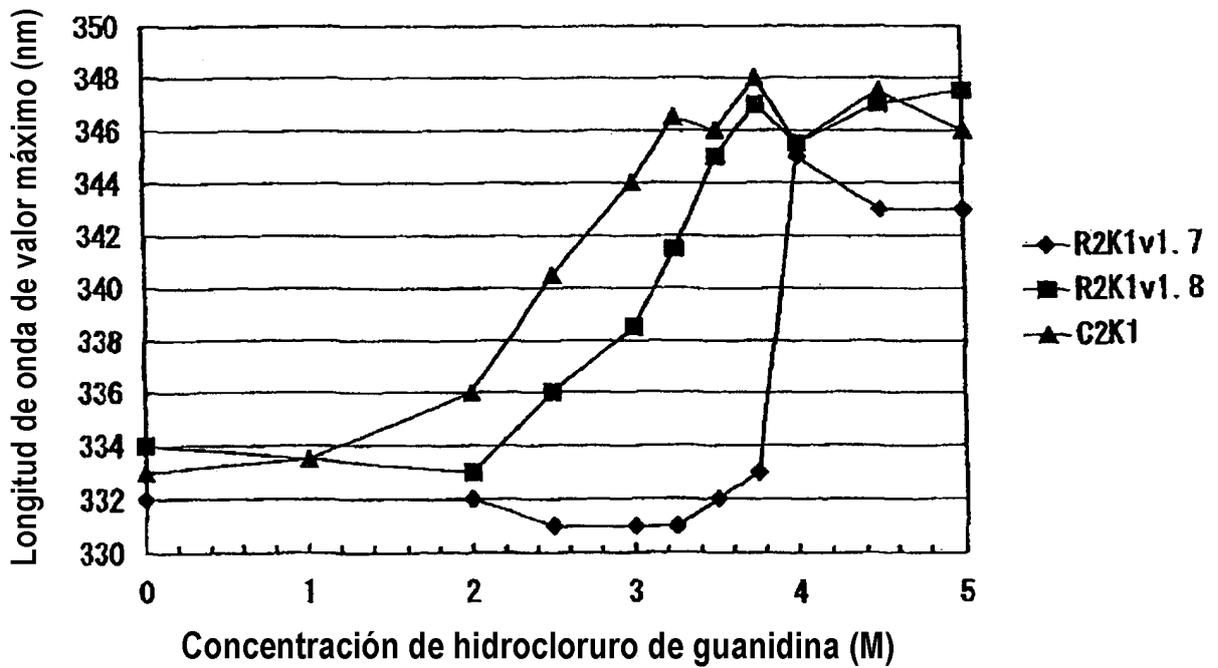


FIG. 9

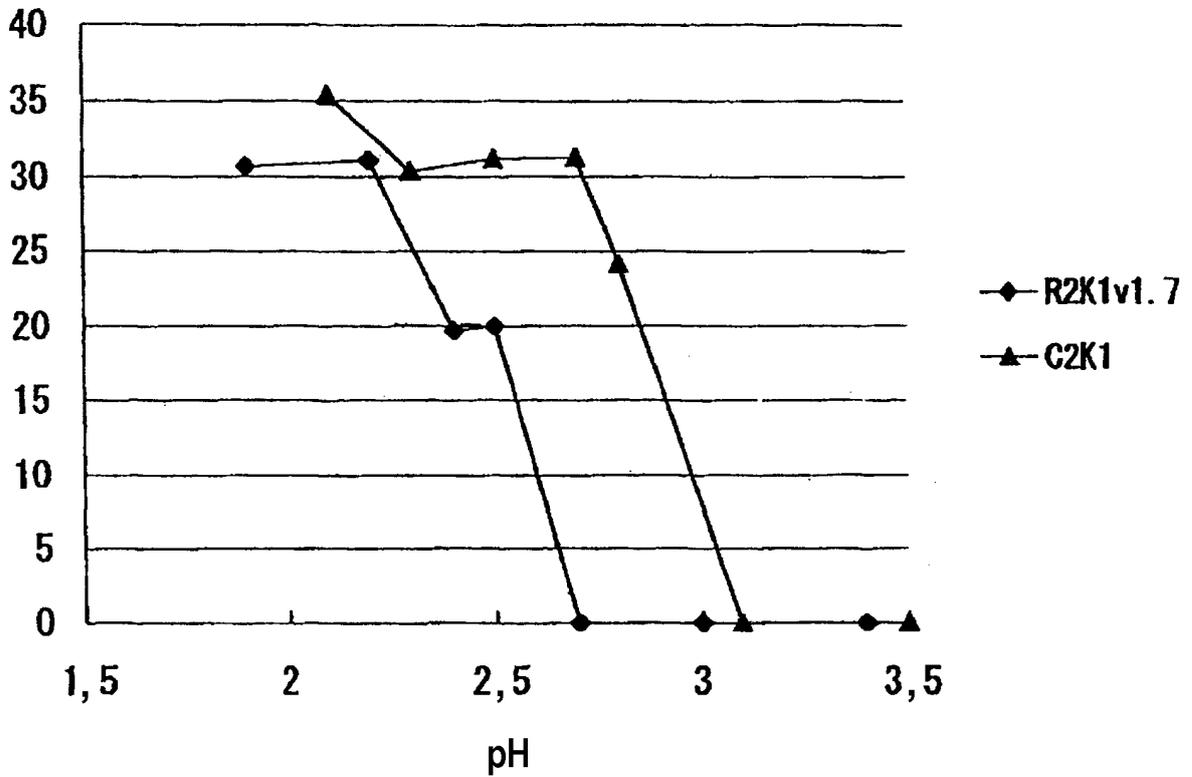


FIG. 10

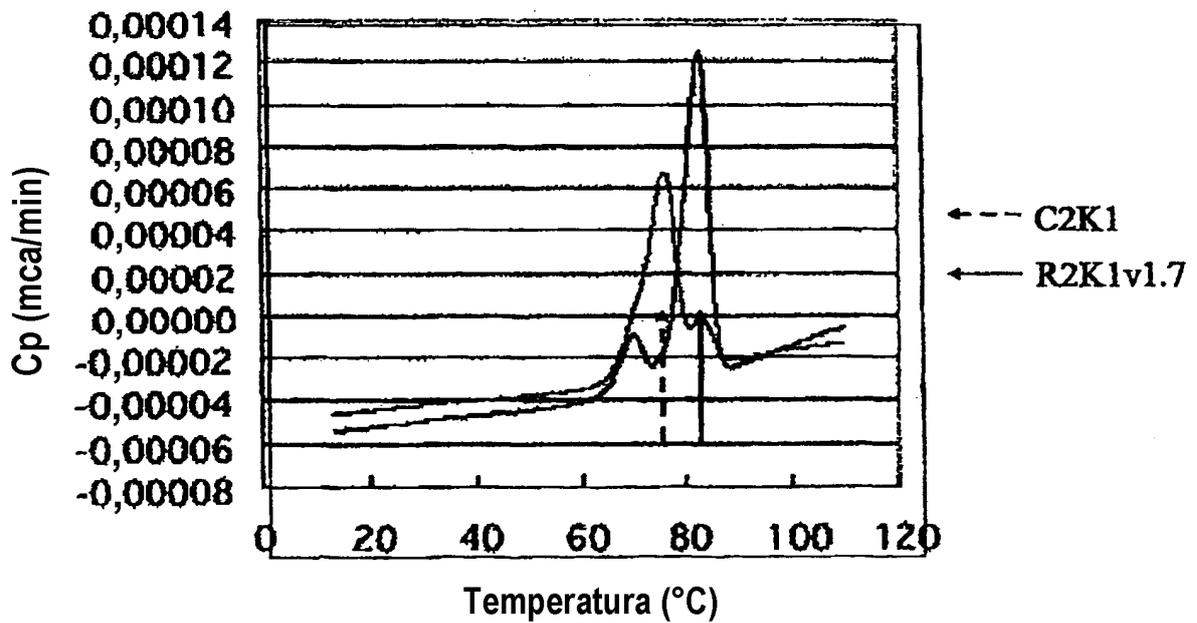


FIG. 11

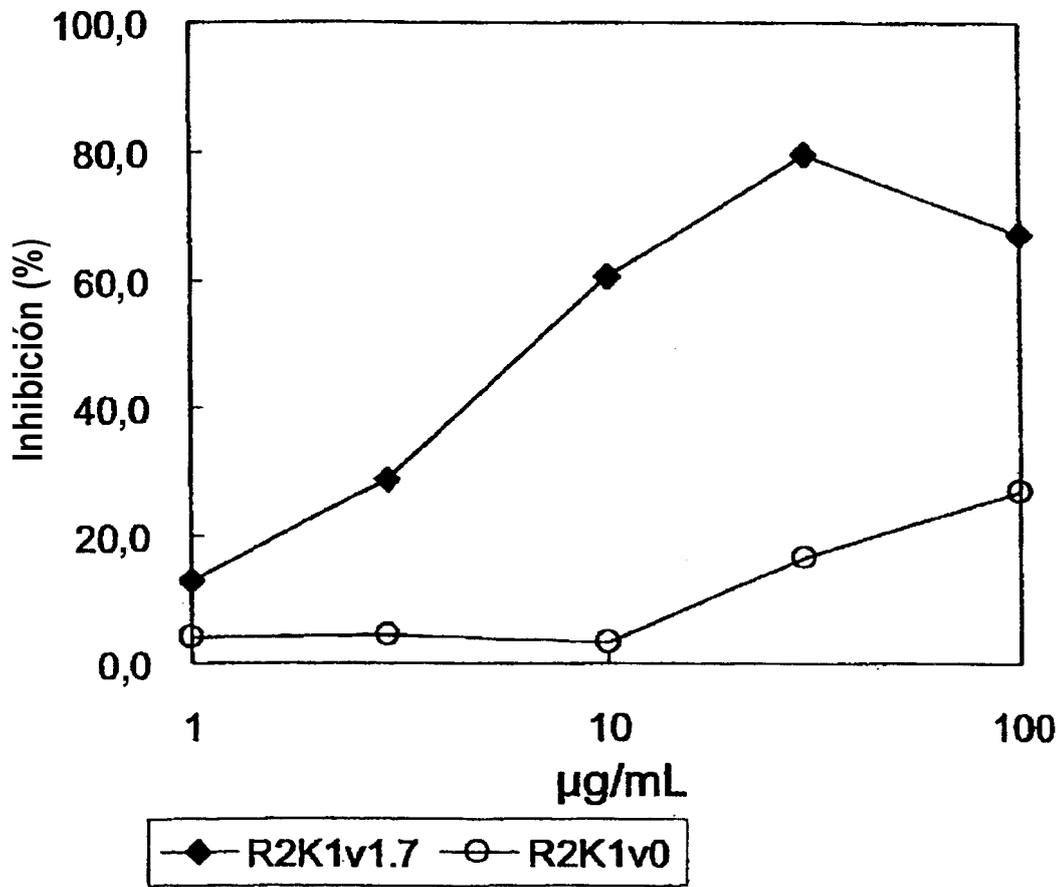


FIG. 12

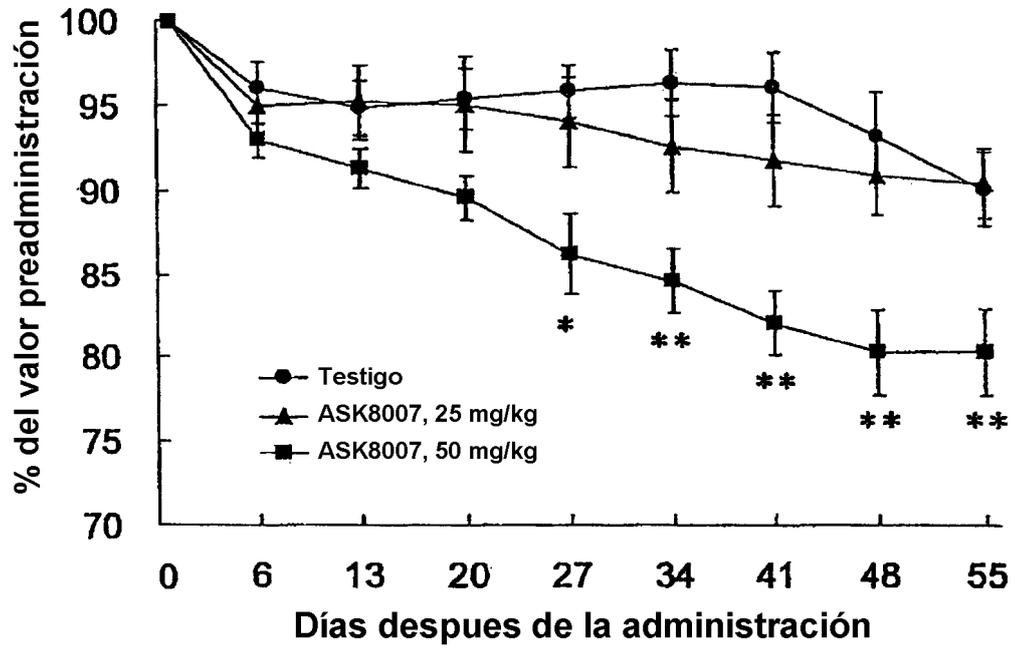


FIG. 13

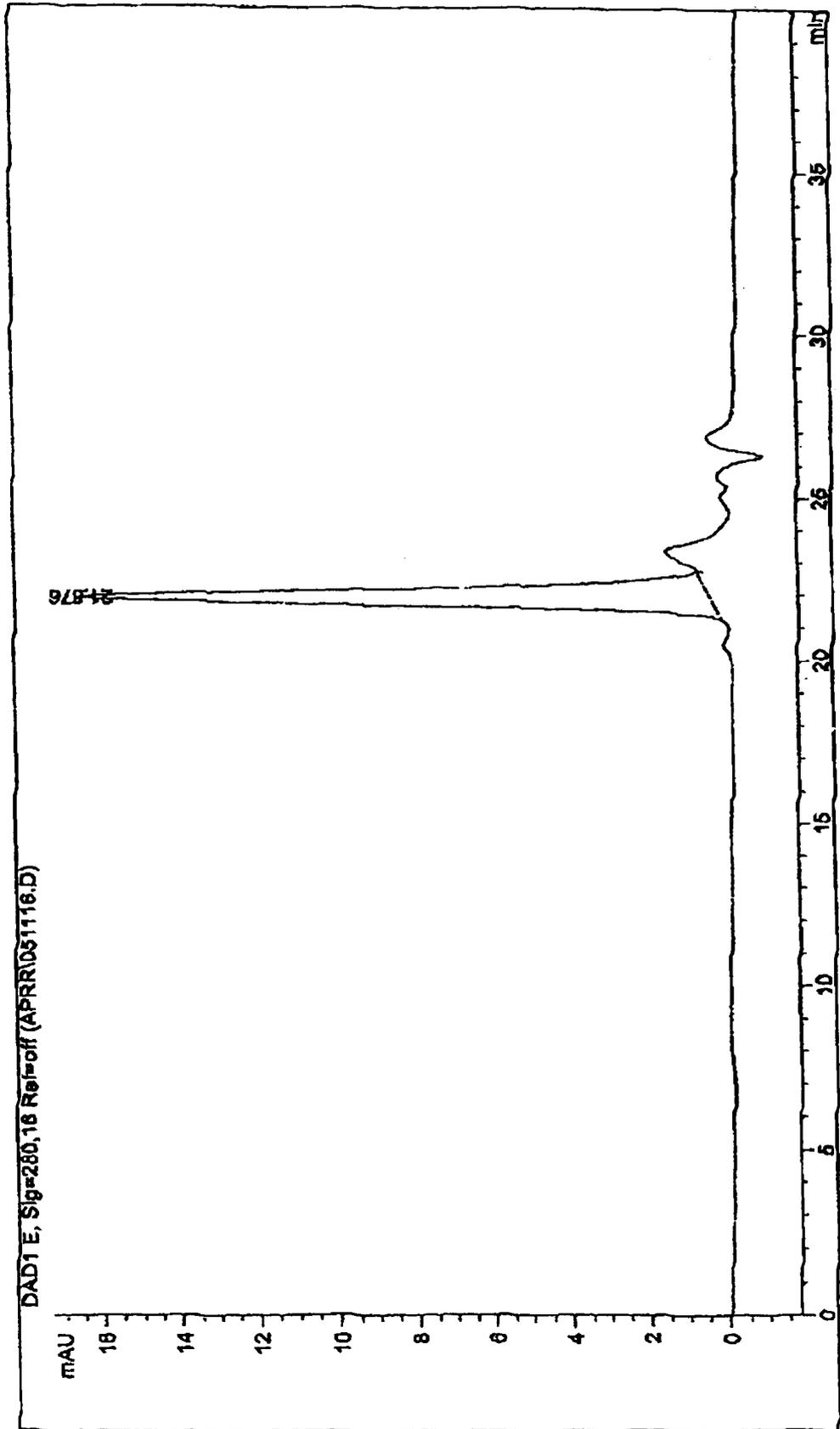


FIG. 14

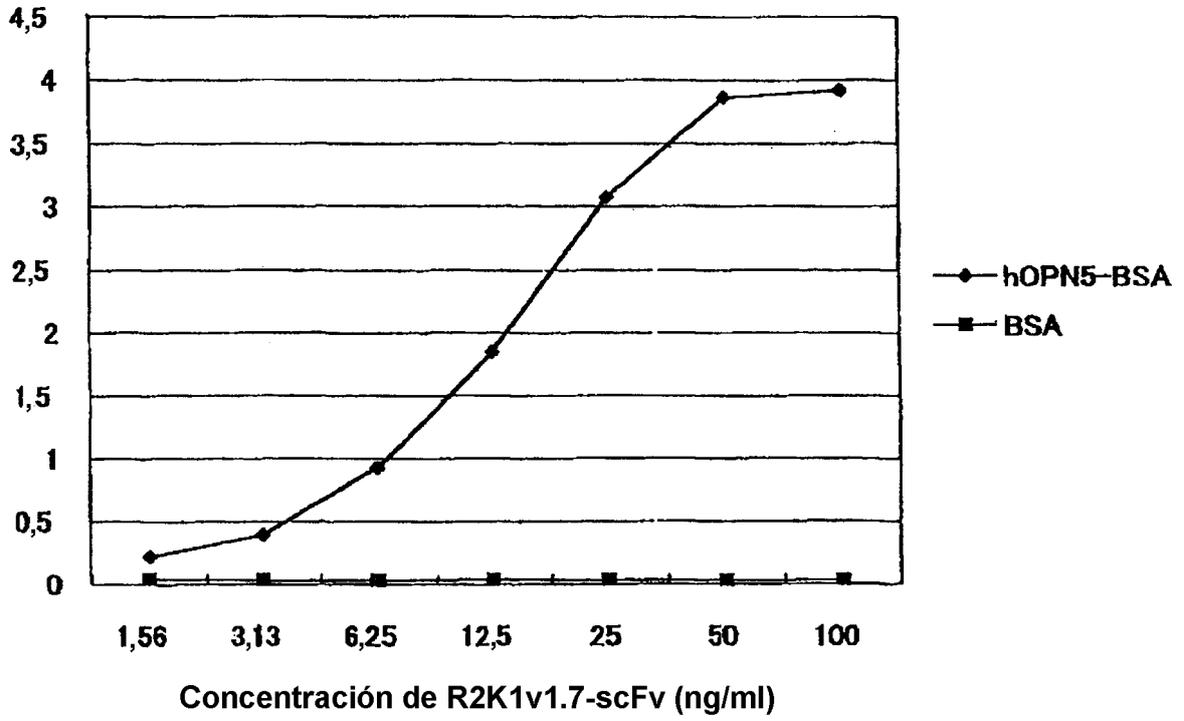


FIG. 15

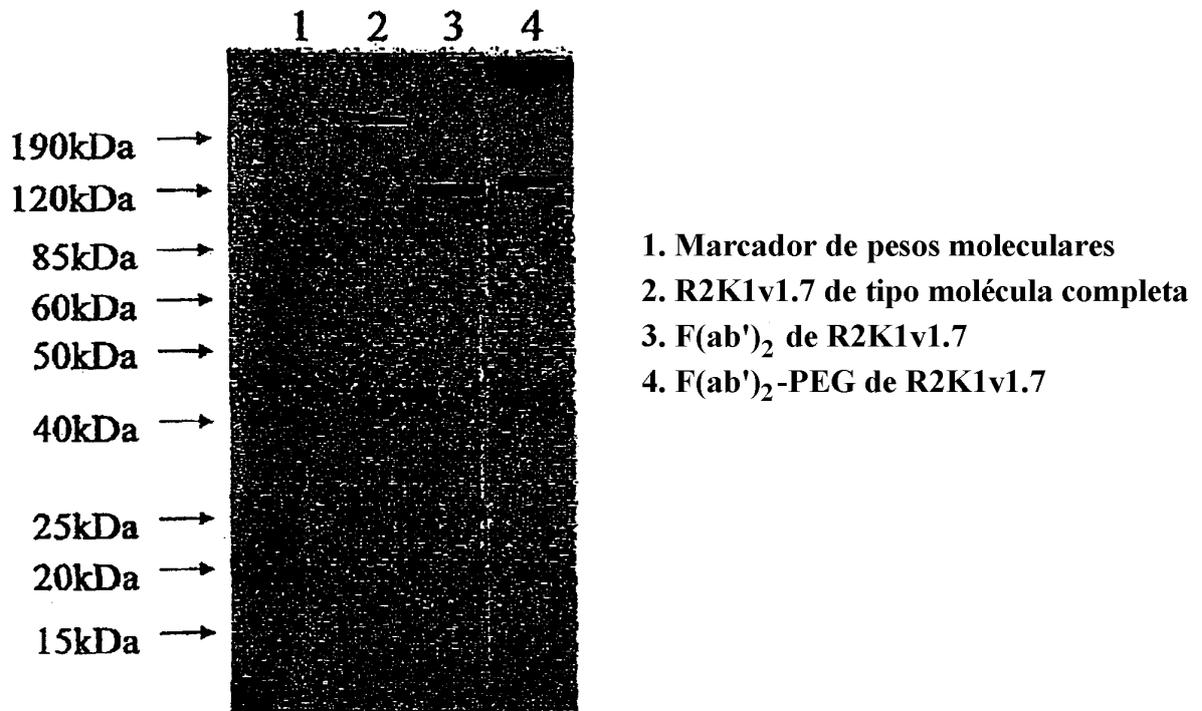


FIG. 16

