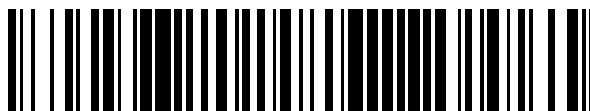


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 519 047**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2009 E 09700904 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2243829**

54 Título: **Anticuerpo humanizado anti-integrina- α 9-humana mejorado**

30 Prioridad:

11.01.2008 JP 2008004975

31.10.2008 JP 2008282496

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

06.11.2014

73 Titular/es:

**ASTELLAS PHARMA INC. (100.0%)
5-1, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku
Tokyo 103-8411, JP**

72 Inventor/es:

**UEHARA, KENJI;
HIGUCHI, HIROFUMI;
NAKASHIMA, TOSHIHIRO;
ISHIKAWA, DAISUKE;
YAMAMOTO, NOBUCHIKA;
FUJITA, HIROTADA y
SAKAI, FUMIHIKO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 519 047 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 humanizado anti-integrina- $\alpha 9$ humana mejorado

La presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana mejorado como se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Más en particular, se refiere a un anticuerpo Y9A2 humanizado mejorado que tiene actividad de unión a una proteína integrina $\alpha 9$ humana para inhibir la adhesión celular dependiente de integrina $\alpha 9$, y actividad y/o propiedades mejoradas en comparación con el anticuerpo Y9A2 anti-integrina $\alpha 9$ humana de ratón. Se espera que el anticuerpo humanizado sea un fármaco para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide, enfermedades inmunitarias tales como alergias y rechazos de injertos, y otras enfermedades diversas implicadas con la integrina $\alpha 9$ en sus patogénesis.

Técnica antecedente

La integrina, una glicoproteína de la superficie celular, es una molécula de adhesión que funciona principalmente como receptor para la adhesión celular a las matrices extracelulares (colágeno, laminina y similares) y miembros de la familia de inmunoglobulinas (ICAM-1, VCAM-1 y similares), y actúa como mediador en la transducción de señales desde las matrices extracelulares. De ese modo, las células reciben señales desde las matrices extracelulares, y se induce la diferenciación, proliferación, muerte celular, y similares. La integrina es un heterodímero que consiste en dos subunidades, la cadena α y la cadena β ; existen diferentes cadenas α y cadenas β que se dan en una gran diversidad de combinaciones, y existen 24 miembros de la superfamilia de integrinas. Los ratones con inactivación génica de las integrinas son inviables o enfermos independientemente de qué subunidad falte, lo que sugiere que las integrinas individuales son necesarias para el mantenimiento de la vida. Por lo tanto, se cree que la integrina, que transmite información en condiciones ambientales a las células para estimular sus respuestas, funciona en todas las situaciones de los fenómenos biológicos, y actúan como mediadores en una gran variedad de estados patológicos.

Como tal, la integrina es indispensable para la supervivencia de los organismos, y se cree que desempeña un papel incluso en estados patológicos; se ha informado de ciertos casos en los que su inhibición ayuda a mejorar estados patológicos. Por ejemplo, se ha aprobado un inhibidor de la integrina $\alpha \text{IIb}\beta 3$ específica de plaquetas como fármaco terapéutico para la reestenosis tras PCTA conocido como abciximab (nombre comercial: ReoPro; Eli Lilly). Natalizumab (nombre comercial: Antegren; empresa ELAN), un inhibidor de $\alpha 4\beta 1$ (VLA4), se ha aprobado como fármaco terapéutico para esclerosis múltiple. El inhibidor de $\alpha \text{v}\beta 3$ Vitaxin (empresa MEDIMMUNE) está en desarrollo en estudios clínicos por su acción inhibitoria de la neovascularización, acción inhibitoria de la activación de osteoclastos, y similares.

La integrina $\alpha 9\beta 1$ se expresa en macrófagos, células NKT, células dendríticas, y neutrófilos, y supuestamente desempeña papeles importantes en la infiltración y adhesión de estas células inflamatorias, la resorción ósea y similares. Recientemente se ha informado que la integrina $\alpha 9\beta 1$ está implicada en la formación de osteoclastos, y se ha propuesto su implicación en la destrucción ósea (Documento no patente 1). Los ligandos conocidos de la misma incluyen la osteopontina truncada (OPN N-terminal), VCAM-1, Tenascina-C y similares. Clínicamente, se han observado niveles significativamente elevados de integrina $\alpha 9\beta 1$ en los tejidos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide (Documento no patente 2).

Por lo tanto, si se desarrollase un anticuerpo monoclonal que se uniese de manera específica a la proteína integrina $\alpha 9$ para actuar inhibiendo la adhesión celular dependiente de integrina $\alpha 9$ sería útil en el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de diversas enfermedades implicadas con la integrina $\alpha 9$ en sus patogénesis.

Los anticuerpos que se ha informado que exhiben una acción inhibitoria de la función en la integrina $\alpha 9$ humana son el anticuerpo monoclonal de ratón Y9A2 (Documento no patente 3), y 1K11, 24I11, 21C5 y 25B6 (Documento de patente 1) y 28S1 (Documento de patente 2). Los resultados experimentales in vitro han demostrado que estos anticuerpos son capaces de inhibir la adhesión celular dependiente de integrina $\alpha 9$ humana. Entre ellos, debido a que Y9A2 inhibe la adhesión celular a osteopontina y Tenascina-C, se considera muy prometedor como candidato a fármaco de anticuerpos contra la integrina $\alpha 9$.

Se debería indicar, sin embargo, que Y9A2 es un anticuerpo derivado de ratón preparado mediante la inmunización de un ratón con un antígeno, y, por lo tanto, la administración directa del mismo a un ser humano es prácticamente imposible desde el punto de vista de la seguridad (inducción de antigenicidad) y eficacia (semivida reducida). Por lo tanto, es necesario llevar a cabo una modificación para convertir el anticuerpo en una molécula que tenga una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano a la vez que se mantiene la actividad de Y9A2, es decir, una humanización.

En la actualidad, como método de producción de un anticuerpo humanizado, lo más general es un método basado en el método que incluye injertar aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (a veces indicada más adelante en la presente memoria como CDR) como diseñó Winter et al. (documento no patente 4). También es muy conocido que el injerto simultáneo de aminoácidos no solamente de CDR, sino también de aminoácidos de regiones distintas de CDR implicados en el mantenimiento estructural de CDR o de la unión a un antígeno, es decir, una región estructural (a veces indicada más adelante en la presente memoria como FR), de un anticuerpo exógeno que es el donante de aminoácidos de la CDR a un anticuerpo humano que es el aceptor de la CDR, es importante

para la reproducción de la actividad inherente del anticuerpo donante (documentos no patentes 4 y 5).

Sin embargo, la producción de un anticuerpo humanizado basada en el injerto de CDR incluye varios problemas. En primer lugar, el problema más general es que incluso una selección adecuada de los aminoácidos de FR necesarios para la reproducción de la actividad de un anticuerpo donante no puede eliminar la dificultad de obtener un anticuerpo humanizado que tenga una afinidad hacia un antígeno y una actividad biológica que supere la del anticuerpo donante.

En años recientes, se ha comercializado un gran número de anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos como productos farmacéuticos monoclonales. La dosis eficaz de cualquiera de ellos es extremadamente elevada, y es de varios mg por kg de peso corporal. Por lo tanto, los anticuerpos farmacéuticos son inevitablemente caros, lo que a su vez incrementa la carga económica de los pacientes y los costes médicos. Los factores principales que definen la dosis eficaz de un fármaco de anticuerpo incluyen la afinidad del anticuerpo hacia un antígeno y la cantidad del antígeno presente en el organismo. A partir de tales aspectos, en particular, una mejora de la afinidad de un anticuerpo hacia un antígeno conduce a una reducción de la dosis, y es una mejora extremadamente útil que también da como resultado la reducción de la carga económica de los pacientes y los costes médicos.

Para llevar a cabo una afinidad mejorada de un anticuerpo hacia un antígeno, a menudo se adopta un método que incluye la introducción de la sustitución de aminoácidos en una región variable del anticuerpo. Sin embargo, cuando el anticuerpo y el antígeno son diferentes, también varía la secuencia y la estructura estérica de los aminoácidos de CDR, así como la posición de los aminoácidos implicados en las interacciones antígeno-anticuerpo. Por lo tanto, es prácticamente imposible definir que la posición de los aminoácidos de FR a injertar junto con la CDR sea aplicable a cualquier anticuerpo.

Otro problema es que, aunque los aminoácidos de una CDR completa de un anticuerpo de ratón donante se injerten en general en un anticuerpo humano molde en la preparación de un anticuerpo humanizado basado en el injerto de CDR, una secuencia de aminoácidos de CDR derivada de un anticuerpo de ratón, que es importante para la unión a un antígeno, a veces muestra antigenicidad contra el ser humano, lo que a menudo provoca la generación de un anticuerpo anti-idiotipo.

Es decir, para la producción de un anticuerpo humanizado, la selección de un anticuerpo aceptor adecuado y la selección de los aminoácidos de CDR y los aminoácidos de FR a sustituir son indispensables para conferir una actividad mayor que la de un anticuerpo donante a la vez que se evita la generación de antigenicidad en el ser humano, y la estabilidad reducida del anticuerpo. Esto requiere un ingenio considerable, y pruebas y errores.

documento de patente 1: WO 2006/075784

documento de patente 2: WO 2008/007804

documento no patente 1: Journal of Bone and Mineral Research, 2006, 21: 1657-1665

documento no patente 2: The Journal of Clinical Investigation, 2005, 115: 1060-1067

documento no patente 3: Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 1996, 15: 664-672

documento no patente 4: Science, 239, 1534-1536 (1988)

documento no patente 5: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 10029-10033 (1989)

Descripción de la invención

Problemas a resolver mediante la invención

Un objetivo de la presente invención es resolver los diversos problemas anteriormente mencionados relacionados con los anticuerpos humanizados, y proporcionar un anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana que tenga una actividad y/o propiedades mejoradas en comparación con un anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ humana de ratón donante (Y9A2).

Medios para resolver los problemas

Por lo tanto, la presente invención comprende las invenciones de los siguientes puntos (1) - (15) como sustancias y métodos útiles médicamente o industrialmente.

(1) Un anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera seleccionadas de lo siguiente:

(a) una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:11 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:17

- (b) una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:13 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:17, y
- 5 (c) una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:15 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:9.
- (2) El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana descrito en (1) anteriormente, en el que la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es IgY1 humano.
- 10 (3) El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana descrito en (1) anteriormente, en el que la región constante de la cadena ligera del anticuerpo es Igk humano.
- (4) El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana descrito en (1) anteriormente, en el que la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es IgY1 humano y la región constante de la cadena ligera del anticuerpo es Igk humano.
- 15 (5) El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana descrito en (1) anteriormente, en el que la cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:19 y la cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:25.
- (6) El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana descrito en (1) anteriormente, en el que la cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:21 y la cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:25.
- 20 (7) El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana descrito en (1) anteriormente, en el que la cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:23 y la cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:27.
- (8) Un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según (1) y una secuencia que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según (1).
- 25 (9) Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según (1) y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según (1).
- 30 (10) Una célula hospedadora que se selecciona del grupo que consiste en los siguientes (a) y (b),
- (a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según (1) y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según la reivindicación 1; y
- 35 (b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según (1) y con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según (1).
- 40 (11) Un método para producir un anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana, que comprende una etapa de cultivo de la célula hospedadora según (10) para permitir la expresión del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana.
- (12) Un anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana producido mediante el método según (11).
- 45 (13) Una preparación farmacéutica para la artritis reumatoide, que comprende el anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según cualquiera de (1) a (7) y (12).
- (14) Un anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según cualquiera de (1) a (7) y (12) para el uso como un medicamento.
- (15) El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según cualquiera de (1) a (7) y (12) para el uso en un método para prevenir o tratar la artritis reumatoide.

Efecto de la invención

Según la presente invención, se proporciona un anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana que tiene una actividad y/o propiedades mejoradas en comparación con un anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ humana de ratón donante. El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana de la presente invención tiene una acción anti-inflamatoria intensa y una acción supresora intensa de la destrucción ósea bloqueando las interacciones entre la integrina $\alpha 9$ humana y los diversos ligandos de la misma, y es útil para la profilaxis o el tratamiento de diversas enfermedades que implican a la integrina $\alpha 9$ humana en la patogénesis. Además, el anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana de la presente invención proporciona mejoras superiores en las aplicaciones clínicas, tales como la reducción de la dosis, la prolongación del intervalo de administración, la mejora del método de administración (p.ej., inyección subcutánea) y similares, y contribuye enormemente a la eficacia terapéutica y a la mejora del cumplimiento por parte de los pacientes.

Descripción breve de los dibujos

La Fig. 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la región VH de un anticuerpo Y9A2 de ratón.

La Fig. 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la región VL de un anticuerpo Y9A2 de ratón.

La Fig. 3 muestra la constitución del oligoADN para producir un gen que codifica RY9A2VHv5, que es un ejemplo de VH de un anticuerpo Y9A2 humanizado.

La Fig. 4 muestra la constitución del oligoADN para producir un gen que codifica RY9A2VLv01, que es un ejemplo de VL de un anticuerpo Y9A2 humanizado.

La Fig. 5 muestra los resultados de un ELISA celular de un anticuerpo Y9A2 quimérico y un anticuerpo RY9A2v501.

La Fig. 6 muestra los resultados de un ELISA celular de un anticuerpo Y9A2 quimérico y un anticuerpo RY9A2v801.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se describe con detalle a continuación.

Los presentes inventores han demostrado un ingenio y consideración considerables para la producción de un anticuerpo humanizado del anticuerpo Y9A2 anti-integrina $\alpha 9$ humana de ratón, y han tenido éxito en la producción de tres tipos de anticuerpos anti-integrina $\alpha 9$ humana humanizados (también mencionados más adelante en la presente memoria como anticuerpo Y9A2 humanizado o RY9A2) que tienen actividades y/o propiedades significativamente mejoradas en comparación con Y9A2.

Concretamente, los presentes inventores injertaron primero la secuencia de aminoácidos de CDR y varios aminoácidos de FR de una región variable de la cadena pesada (también denominada más adelante en la presente memoria VH) y una región variable de la cadena ligera (también denominada más adelante en la presente memoria VL) del anticuerpo Y9A2 anti-integrina $\alpha 9$ humana de ratón (también denominado más adelante en la presente memoria anticuerpo Y9A2 de ratón) en un anticuerpo humano molde para preparar dos tipos de anticuerpos anti-integrina $\alpha 9$ humana humanizados RY9A2v501 y RY9A2v801 que tienen cada uno una actividad equivalente a la de un anticuerpo Y9A2 de ratón. La CDR se determinó según la clasificación de Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest 4ª ed., Public Health Service, NIH, Washington DC, 1987). Las secuencias de aminoácidos de las VHs de RY9A2v501 y RY9A2v801 son SEQ ID N°: 5 y SEQ ID N°: 7, respectivamente. En el presente documento, la VH de RY9A2v801 es la VH de RY9A2v501 en la que 4 residuos de aminoácidos de los residuos de aminoácidos de la FR derivada del anticuerpo Y9A2 de ratón se sustituyen por los aminoácidos del anticuerpo humano molde correspondiente. La secuencia de aminoácidos de las VLs de los dos anticuerpos humanizados se muestra en SEQ ID N°: 9 y es común a los dos anticuerpos.

A continuación, con el objetivo de producir un anticuerpo humanizado que tenga una afinidad superior hacia la integrina $\alpha 9$ humana que la del anticuerpo Y9A2 de ratón original, a la vez que se evita el riesgo de producción de antigenicidad de un anticuerpo humanizado y de estabilidad de conservación reducida del anticuerpo, los presentes inventores consideraron la sustitución de secuencias de aminoácidos en las CDRs de VH y VL de los dos tipos anteriormente mencionados de anticuerpos humanizados. Como resultado, se confirmó que los 3 tipos siguientes de anticuerpos anti-integrina $\alpha 9$ humana humanizados tuvieron actividades y/o propiedades significativamente mejoradas en comparación con las del anticuerpo Y9A2 de ratón original.

1) Un anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana que comprende una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:11 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:17.

2) Un anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana que comprende una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:13 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:17.

3) Un anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana que comprende una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:15 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:9.

Los expertos en la técnica pueden preparar fácilmente el anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana de la presente invención basándose en la información de secuencias sobre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera del mismo descritas en la presente memoria, mediante el uso de un método conocido habitualmente en la técnica. De manera específica, se prepara un segmento génico de la región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de bases que codifica los aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado de la presente invención, y un segmento génico de la región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de bases que codifica los aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado de la presente invención. Después, los genes de la región variable se unen a un gen de la región constante de una clase adecuada de anticuerpo humano para preparar un gen de anticuerpo humanizado. A continuación, este gen de anticuerpo humanizado se une a un vector de expresión adecuado, y se introduce en una célula cultivada. Finalmente, esta célula cultivada se cultiva, por lo que se puede obtener un anticuerpo humanizado del sobrenadante de cultivo.

Cada uno de los segmentos génicos de la región variable anteriormente descritos que codifican los aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y de la cadena ligera del anticuerpo humanizado de la presente invención se pueden sintetizar, por ejemplo, basándose en las secuencias de bases de las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera o en las secuencias de bases diseñadas basándose en las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera y mediante un método de síntesis génica conocido en la técnica. Como tal método de síntesis génica, se pueden usar diversos métodos conocidos para los expertos habituales en la técnica, tales como el método de síntesis génica de anticuerpos descrito en el documento WO90/07861 y similares. Además, una vez que se obtiene un segmento génico de la región variable del anticuerpo de la presente invención, también se pueden obtener otros anticuerpos de la presente invención introduciendo una mutación en un sitio determinado del segmento génico. Como tal método de introducción de mutaciones, se pueden usar diversos métodos evidentes para los expertos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons, Sección 8.1-8.5).

A continuación, se unen los segmentos génicos de la región variable anteriormente descritos y el gen de la región constante del anticuerpo humano para preparar un gen de anticuerpo humanizado. Aunque se puede elegir cualquier subclase de región constante (p.ej., $\gamma 1$, $\gamma 2$, γ y $\gamma 4$ como cadenas pesadas, regiones constantes de las cadenas λ y κ como cadenas ligeras) como región constante del anticuerpo humano usado, se puede usar preferiblemente Ig $\gamma 1$ humano como la región constante de la cadena pesada, e Ig κ humano como la región constante de la cadena ligera.

Con posterioridad a la preparación de este gen de anticuerpo humanizado, se puede 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 similares mediante el uso de diversos métodos conocidos habitualmente en la técnica, o con referencia a los métodos de preparación de un anticuerpo anti-osteopontina humana humanizado, descritos en los documentos WO2007/139164 o WO2003/027151.

Como vector de expresión a unir al gen de anticuerpo humanizado así obtenido, se pueden usar los vectores de expresión descritos en el boletín oficial de publicación de patente internacional WO94/20632, tales como AG- $\gamma 1$ y AG- κ , pero el vector de expresión no está sujeto a ninguna 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 la región constante de Ig humana tal como AG- $\gamma 1$ o AG- κ , porque se convertiría en un vector de expresión que tendría el gen de anticuerpo humanizado simplemente cuando el gen de la región variable del anticuerpo humanizado se inserte en él. En un vector de expresión, se puede usar una secuencia líder para estimular la secreción extracelular y la expresión de un anticuerpo. Como tal secuencia líder, se puede usar una secuencia líder derivada de Y9A2 o una secuencia líder derivada de otro anticuerpo (p.ej., el anticuerpo anti-osteopontina humanizado descrito en el documento WO2007/139164).

El vector de expresión anteriormente descrito se introduce en células cultivadas, por ejemplo, mediante el uso de un sistema de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen), un método de fosfato cálcico y similares.

Como ejemplo de las células cultivadas en las que se introduce el vector de expresión, se pueden usar células cultivadas tales como células 293, células CHO-DG44, y se pueden cultivar mediante un método convencional.

Tras el cultivo anteriormente descrito, se puede purificar el anticuerpo acumulado en el sobrenadante de cultivo mediante diversos tipos de cromatografía en columna, por ejemplo, cromatografías mediante el uso de una columna de Proteína A.

Como método para medir la actividad de unión del anticuerpo humanizado obtenido a la integrina $\alpha 9$ humana, se puede usar ELISA, FACS y similares. Cuando se usa ELISA, por ejemplo, se inmovilizan células (p.ej., células SW480) que expresan la integrina $\alpha 9$ en una placa de ELISA, se le añade un anticuerpo humanizado para provocar la reacción, y se le añade un anticuerpo secundario tal como un anticuerpo IgG humano marcado con una enzima tal

como peroxidasa de rábano (HRP) para provocar la reacción. Las células se lavan, se añade un sustrato de desarrollo de color (p.ej., TMB cuando se marca con HRP), y se mide la absorbancia.

Como método para determinar si el anticuerpo humanizado obtenido tiene una actividad inhibitoria de la función contra la integrina $\alpha 9$ humana, se puede confirmar mediante un ensayo de inhibición (descrito en J. Biol. Chem., 274:36328-36334, 1999) de la adhesión celular dependiente de moléculas de integrina $\alpha 9$ humana a la molécula de osteopontina humana. Es decir, la variante RAA (la secuencia RGD se altera a RAA para inhibir la reacción con otra integrina; a veces indicada más adelante en la presente memoria como nOPN-RAA) de OPN N-terminal (fragmento N-terminal tras la escisión de osteopontina mediante trombina; a veces indicada más adelante en la presente memoria como nOPN), que es uno de los ligandos de $\alpha 9$, se inmoviliza en una placa y se somete a bloqueo. Tras la adición de diversos anticuerpos humanizados, se añaden células de expresión de $\alpha 9$ y se incuban a 37 °C durante 1 hr. Las células se fijan y se tiñen con violeta cristal y metanol, y se lavan. El colorante de las células adheridas se extrae con Triton X-100, y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

Además, como método para determinar detalladamente si el anticuerpo humanizado obtenido tiene una actividad inhibitoria de la función contra la integrina $\alpha 9$ humana, se puede mencionar un método basado en el ensayo de inhibición de la migración celular descrito en Molecular Biology of the Cell, 12: 3214-3225, 2001. Es decir, se inmoviliza nOPN-RAA en la cámara superior de una cámara Transwell y se coloca sobre una placa, y después se añade medio F15 que contiene un 10% de FCS a la cámara inferior. Se añaden de manera simultánea células de expresión de $\alpha 9$ y el anticuerpo humanizado a la cámara superior y se incuban a 37 °C durante 16 hr. Después se cuantifican las células migradas hacia la cámara inferior de la cámara Transwell, por ejemplo, mediante un equipo de ensayo de 24 pocillos de migración celular por quimiotaxis QCM (Millipore).

Los 3 tipos de anticuerpos anti-integrina $\alpha 9$ humana humanizados de la presente invención se pueden obtener fácilmente sintetizando un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de VH mostrada en SEQ ID N°:11, 13 ó 15 y un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos VL mostrada en SEQ ID N°:17 ó 9 mediante el uso de un método conocido habitualmente en la técnica, uniéndolos a una clase adecuada de gen de la región constante de anticuerpo humano, preferiblemente el gen de la región constante de IgY1 humano para la cadena pesada y el gen de la región constante de Igk humano para la cadena ligera, para construir un gen de anticuerpo humanizado, introduciendo el gen del anticuerpo humanizado en un vector de expresión mediante el uso de diversos métodos conocidos habitualmente 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. Preferiblemente, los ADNs que codifican las secuencias de aminoácidos de VH mostradas en SEQ ID N°: 11, 13 y 15 contienen las secuencias de bases mostradas en SEQ ID N°: 12, 14 y 16, respectivamente. Preferiblemente, los ADNs que codifican las secuencias de aminoácidos de VL mostradas en SEQ ID N°: 17 y 9 contienen las secuencias de bases mostradas en SEQ ID N°: 18 y 10, respectivamente.

La cadena pesada de anticuerpo humanizado preferible de la presente invención, que se obtiene uniendo la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID N°:11 y la región constante de IgY1 humana, es una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:19. La cadena ligera de anticuerpo humanizado preferible de la presente invención, que se obtiene uniendo la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID N°:17 y la región constante de Igk humana, es una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:25. Preferiblemente, un ADN que codifica la cadena pesada de anticuerpo humanizado que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:19 contiene la secuencia de bases mostrada en SEQ ID N°:20. Preferiblemente, un ADN que codifica la cadena ligera de anticuerpo humanizado que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:25 contiene la secuencia de bases mostrada en SEQ ID N°:26. Como anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ humanizado de la presente invención que contiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:19, y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:25, se puede mencionar un anticuerpo RY9A2v12(M34L)012 mostrado en los Ejemplos descritos más adelante.

La cadena pesada de anticuerpo humanizado preferible de la presente invención, que se obtiene uniendo la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID N°:13 y la región constante de IgY1 humana, es una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:21. La cadena ligera de anticuerpo humanizado preferible de la presente invención, que se obtiene uniendo la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID N°:17 y la región constante de Igk humana, es una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:25. Preferiblemente, un ADN que codifica la cadena pesada de anticuerpo humanizado que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:21 contiene la secuencia de bases mostrada en SEQ ID N°:22. Preferiblemente, un ADN que codifica la cadena ligera de anticuerpo humanizado que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:25 contiene la secuencia de bases mostrada en SEQ ID N°:26. Como anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ humanizado de la presente invención que contiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:21, y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:25, se puede mencionar un anticuerpo RY9A2v11(M34L)012 mostrado en los Ejemplos descritos más adelante.

La cadena pesada de anticuerpo humanizado preferible de la presente invención, que se obtiene uniendo la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID N°:15 y la región constante de IgY1 humana, es una cadena

pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:23. La cadena ligera de anticuerpo humanizado preferible de la presente invención, que se obtiene uniendo la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID N°:9 y la región constante de Igk humana, es una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:27. Preferiblemente, un ADN que codifica la cadena pesada de anticuerpo humanizado que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:23 contiene la secuencia de bases mostrada en SEQ ID N°:24. Preferiblemente, un ADN que codifica la cadena ligera de anticuerpo humanizado que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:27 contiene la secuencia de bases mostrada en SEQ ID N°:28. Como anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ humanizado de la presente invención que contiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:23, y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:27, se puede mencionar un anticuerpo RY9A2v05(IAW)01 mostrado en los Ejemplos descritos más adelante.

El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana de la presente invención así obtenido, después de purificarlo adicionalmente según sea necesario, se puede preparar en forma de una preparación farmacéutica según un método convencional, y usarlo para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide y similares, enfermedades inmunitarias tales como alergia, rechazo de trasplantes y similares, y enfermedades en las que la integrina $\alpha 9$ está implicada en la patogénesis, tales como osteoporosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cáncer y similares.

El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana de la presente invención se puede usar preferiblemente en forma de un agente terapéutico para la artritis reumatoide. Como ejemplo de formas farmacéuticas para estos agentes terapéuticos, se puede preparar una preparación parenteral tal como una inyección o infusión por goteo, y se administra preferiblemente mediante administración intravenosa, administración subcutánea y similares. Al preparar una preparación farmacéutica, se pueden usar vehículos y aditivos que se ajusten a estas formas farmacéuticas en un intervalo farmacéuticamente aceptable.

La cantidad de anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana de la presente invención añadido en la fabricación de la preparación anteriormente descrita varía dependiendo de la gravedad de los síntomas del paciente y la edad, la forma farmacéutica de la preparación usada o el título de unión del anticuerpo y similares; por ejemplo, se puede usar de alrededor de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg.

La presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica el anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana de la presente invención o las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera del mismo, y un vector de expresión que contiene el mismo. El vector de expresión de la presente invención no está sujeto a limitación, con tal de que sea capaz de expresar un gen que codifica el anticuerpo humanizado de la presente invención o una región variable de la cadena pesada y de la cadena ligera del mismo en diversas células hospedadoras de células procarióticas y/o células eucarióticas, y producir estos polipéptidos. Por ejemplo, se pueden mencionar vectores plasmídicos, vectores virales (p.ej., adenovirus, retrovirus) y similares.

El vector de expresión de la presente invención puede comprender un gen que codifica el anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana de la presente invención o una región variable de la cadena pesada y de la cadena ligera del mismo, y un promotor unido funcionalmente al gen. Como promotor para expresar el gen que codifica el anticuerpo humanizado de la presente invención o una región variable de la cadena pesada y/o de la cadena ligera del mismo en una bacteria, cuando el hospedador es una bacteria del género *Escherichia*, por ejemplo, se puede mencionar el promotor Trp, promotor lac, promotor recA, promotor λ PL, promotor lpp, promotor tac y similares. Como promotor para expresar el gen que codifica el anticuerpo humanizado o una región variable de la cadena pesada y/o de la cadena ligera del mismo en levaduras, por ejemplo, se puede mencionar el promotor PH05, promotor PGK, promotor GAP, y promotor ADH; cuando el hospedador es una bacteria del género *Bacillus*, se puede mencionar el promotor SL01, promotor SP02, promotor penP y similares. Cuando el hospedador es una célula eucariótica tal como una célula de mamífero, se puede mencionar el promotor β -actina, promotor CAG (Niwa H. et al., *Gene*, 108, 193-200, 1991), el promotor derivado de SV40, el promotor de retrovirus, el promotor de choque térmico y similares.

Cuando se usa una bacteria, en particular *Escherichia coli*, como célula hospedadora, el vector de expresión de la presente invención puede comprender adicionalmente un codón de inicio, un codón de parada, una región terminadora y una unidad replicable. Cuando se usa una levadura, célula animal o célula de insecto como hospedador, el vector de expresión de la presente invención puede comprender un codón de inicio y un codón de parada. En este caso, puede contener una secuencia potenciadora, regiones no codificantes en los lados 5' y 3' de un gen que codifica el anticuerpo humanizado de la presente invención o una región variable de la cadena pesada y/o de la cadena ligera del mismo, un sitio de corte y empalme, un sitio de poliadenilación, o una unidad replicable y similares. Además, también puede contener un marcador de selección (p.ej., gen de resistencia a tetraciclina, gen de resistencia a ampicilina, gen de resistencia a kanamicina, gen de resistencia a neomicina, gen de dihidrofolato reductasa) usado de manera convencional según el objetivo.

La presente invención también proporciona un transformante que incorpora un gen que codifica el anticuerpo humanizado de la presente invención o una región variable de la cadena pesada y de la cadena ligera del mismo. Tal transformante se puede preparar, por ejemplo, transformando una célula hospedadora con el vector de expresión de la presente invención. La célula hospedadora usada para preparar un transformante no está sujeta a limitación,

con tal de que se ajuste al vector de expresión anteriormente mencionado, y sea transformable; se pueden mencionar diversas células tales como células naturales o líneas celulares establecidas artificialmente de uso habitual en el campo técnico de la presente invención (p.ej., bacterias (bacterias del género *Escherichia*, bacterias del género *Bacillus*), levaduras (el género *Saccharomyces*, el género *Pichia* y similares), células animales o células de insecto (p.ej., Sf9) y similares) como ejemplos. La transformación se puede llevar a cabo mediante un método conocido por se.

La presente invención también proporciona un método de producción del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana de la presente invención que comprende expresar un gen que codifica el anticuerpo humanizado o las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de la presente invención en una célula hospedadora, concretamente, mediante el uso de tal transformante. Preferiblemente, la célula hospedadora usada para el método incorpora el vector de expresión de la presente invención, y el vector de expresión puede contener por separado o de manera simultánea los polinucleótidos que codifican las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana.

Al producir el anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana de la presente invención, el transformante se puede cultivar en un medio nutritivo. El medio nutritivo 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 ejemplo de la fuente de carbono, se puede mencionar glucosa, dextrano, almidón soluble, sacarosa y similares; como ejemplo de la fuente de nitrógeno inorgánico o la fuente de nitrógeno orgánico, se pueden mencionar las sales de amonio, nitratos, aminoácidos, licor de maíz fermentado, peptona, caseína, extracto de carne, torta de soja, extracto de patata y similares. Si se desea, puede contener otros nutrientes (p.ej., sales inorgánicas (p.ej., cloruro cálcico, fosfato monosódico, cloruro magnésico), vitaminas, antibióticos (p.ej., tetraciclina, neomicina, ampicilina, kanamicina y similares) y similares).

El cultivo del transformante se puede llevar a cabo mediante un método conocido por se. Las condiciones de cultivo, por ejemplo, la temperatura, el pH del medio, y el tiempo de cultivo se seleccionan según sea adecuado. Por ejemplo, cuando el hospedador es una célula animal, se puede usar como medio un medio MEM (Science, Vol. 122, pág. 501, 1952), medio DMEM (Virology, Vol. 8, pág. 396, 1959), medio RPMI1640 (J. Am. Med. Assoc., Vol. 199, pág. 519, 1967), medio 199 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol. 73, pág. 1, 1950) que contiene alrededor del 5 al 20% de suero bovino fetal y similares. El pH del medio es preferiblemente de alrededor de 6 a 8, el cultivo se lleva a cabo normalmente a alrededor de 30 a 40 °C durante alrededor de 15 a 72 horas, y el cultivo se puede airear o agitar según sea necesario. Cuando el hospedador es una célula de insecto, por ejemplo, se puede mencionar el medio de Grace que comprende suero bovino fetal (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, pág. 8404, 1985) y similares, y el pH del mismo es preferiblemente de alrededor de 5 a 8. El cultivo se lleva a cabo normalmente de alrededor de 20 a 40 °C durante 15 a 100 horas, y se puede airear o agitar el cultivo según sea necesario. Cuando el hospedador es una bacteria, actinomyces, levadura, o un hongo filamentoso, por ejemplo, es adecuado un medio líquido que comprende las fuentes nutritivas anteriormente descritas. Es preferible un medio que tiene un pH de 5 a 8. Cuando el hospedador es *E. coli*, se puede mencionar el medio LB, medio M9 (Miller et al., Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory, pág. 431, 1972) y similares como medios preferibles. En este caso, el cultivo se puede llevar a cabo normalmente de 14 a 43 °C durante alrededor de 3 a 24 horas, mientras se airea o se agita el cultivo según sea necesario. Cuando el hospedador es una bacteria del género *Bacillus*, el cultivo se puede llevar a cabo normalmente de 30 a 40 °C durante alrededor de 16 a 96 horas, mientras se airea o se agita el cultivo según sea necesario. Cuando el hospedador es levadura, se puede mencionar el medio mínimo de Burkholder (Bostian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, pág. 4505, 1980) como ejemplo del medio, y el pH es de manera deseable de 5 a 8. El cultivo se lleva a cabo normalmente de alrededor de 20 a 35 °C durante alrededor de 14 a 144 horas, y se puede airear o agitar el cultivo según sea necesario.

El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana de la presente invención se puede recuperar, preferiblemente aislar y purificar, de un transformante cultivado como se describió anteriormente. Como ejemplos del método de aislamiento y purificación, se pueden mencionar los métodos basados en diferencias de solubilidad, tales como desalación y precipitación en disolventes; métodos basados en diferencias de pesos moleculares, tales como diálisis, ultrafiltración, filtración en gel, y electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico; métodos basados en diferencias de carga eléctrica, tales como cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de hidroxil apatita; métodos basados en afinidad específica, tales como cromatografía de afinidad; métodos basados en diferencias de hidrofobicidad, tales como cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa; métodos basados en diferencias de puntos isoelectrónicos, tales como isoelectroenfoque; y similares.

La presente invención se explica con detalle a continuación mediante referencia a los Ejemplos, que no se deben considerar limitantes.

Ejemplos

En cuanto a la parte en la que se usaron equipos o reactivos disponibles comercialmente, a menos que se especifique de otra manera, los experimentos se llevaron a cabo según el protocolo adjunto.

«Ejemplo 1: Determinación de la secuencia de la región variable del anticuerpo Y9A2 de ratón y producción de un anticuerpo Y9A2 quimérico»

Se determinaron los genes de la región variable de la cadena pesada (VH) y de la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo Y9A2 de ratón, y el gen de VH se ligó al gen de Igγ1 humano y el gen de VL se ligó al gen de Igκ humano para proporcionar un anticuerpo quimérico murino-humano (también denominado más adelante en la presente memoria anticuerpo Y9A2 quimérico). Los procedimientos son los siguientes.

Primero, se extrajo ARN de un hibridoma que producía el anticuerpo Y9A2 de ratón, que fue suministrado por la Universidad de California en San Francisco (UCSF), con un reactivo TRIzol (Invitrogen). Mediante el uso del ARN como molde, se sintetizó cADN con el uso de cebadores aleatorios y transcriptasa inversa SuperScript III (ambos de 10
Invitrogen). Después, mediante el uso de este cADN como molde, y un cebador para una región líder y un cebador para la región J diseñado tomando como referencia la clasificación de secuencias de la región V y la región J de Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest 4ª ed., Public Health Service, NIH, Washington DC, 1987), se amplificó un segmento génico VH con ADN polimerasa Ex Taq (TAKARA BIO INC.). Al cebador para la 15
región líder anteriormente mencionado y el cebador para la región J usado aquí se les añade una secuencia de reconocimiento de HindIII y una secuencia de reconocimiento de BamHI, respectivamente. En cuanto a VL, se obtuvo un segmento génico VL de la misma manera que con VH mediante el uso de un cebador que se adaptó a la secuencia líder y un cebador que se adaptó a la región J.

Los segmentos génicos VH y VL así obtenidos se digirieron con HindIII y BamHI (ambos de TAKARA BIO INC.), y se 20
ligaron con AG-γ1 y AG-κ (documento WO94/20632), respectivamente, que son vectores de expresión. AG-γ1 tiene un promotor β-actina, un gen de la cadena γ1 de la región constante de inmunoglobulina humana, y un gen de resistencia a neomicina (neo) como marcador de selección, y se convierte en un plásmido que expresa una cadena pesada del anticuerpo Y9A2 quimérico insertando un gen de VH del anticuerpo Y9A2 de ratón entre una secuencia de reconocimiento de HindIII y una secuencia de reconocimiento de BamHI localizadas en posición 5' del gen γ1. 25
AG-κ tiene un promotor β-actina, un gen de la cadena κ de la región constante de inmunoglobulina humana, y un gen de dihidrofolato reductasa (dhfr) como marcador de selección, y se convierte de forma similar en un plásmido que expresa una cadena ligera del anticuerpo Y9A2 quimérico insertando un gen de VL del anticuerpo Y9A2 de ratón entre una secuencia de reconocimiento de HindIII y una secuencia de reconocimiento de BamHI localizadas en posición 5' del gen κ.

Estos plásmidos de expresión se introdujeron en Escherichia coli según un método convencional para proporcionar 30
un clon transformado, a partir del cual se preparó el ADN plasmídico mediante el uso de un Equipo QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). Mediante el uso del ADN plasmídico obtenido como molde, y el Equipo GenomeLab DTCS-Quick Start y un secuenciador automático CEQ2000 (ambos de BECKMAN COULTER), se analizaron las secuencias de bases de VH y VL clonadas. Las secuencias de bases de VH y VL se muestran en SEQ ID N°: 2 y SEQ ID N°: 4, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de VH y VL, que se determinaron basándose en las 35
secuencias obtenidas, se muestran en la Fig. 1 y la Fig. 2, respectivamente. Además, se muestran en SEQ ID N°: 1 y SEQ ID N°: 3, respectivamente.

El clon de Escherichia coli anteriormente mencionado se cultivó en gran cantidad, y el plásmido de expresión de la cadena pesada y el plásmido de expresión de la cadena ligera del anticuerpo Y9A2 quimérico se purificaron 40
mediante el uso de un equipo EndoFree Plasmid Maxi (QIAGEN). Se mezclaron y se introdujeron en la célula mediante el uso del sistema de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen), por lo que se expresó de manera transitoria el anticuerpo Y9A2 quimérico. La concentración del anticuerpo Y9A2 quimérico contenido en el sobrenadante del cultivo obtenido se midió mediante ELISA de tipo sándwich con el uso de un anticuerpo anti-Fc de IgG humano derivado de cabra (CAPPEL) y proteína A-HRP (ZYMED). En este caso, se preparó una serie de diluciones del anticuerpo IgG1 humano disponible comercialmente (Biogenesis) y se usó como muestra patrón. Después, el 45
anticuerpo Y9A2 quimérico del sobrenadante de cultivo anteriormente mencionado se purificó mediante afinidad con el uso de una columna de proteína A (GE Healthcare) para proporcionar un anticuerpo Y9A2 quimérico purificado. Se calculó la concentración del anticuerpo Y9A2 quimérico purificado, en el que la concentración fue 1 mg/mL cuando la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm fue 1,4.

«Ejemplo 2: Ensayo de inhibición de la adhesión celular del anticuerpo Y9A2 quimérico»

Para comparar la actividad del anticuerpo Y9A2 quimérico purificado, que se preparó mediante el método descrito en 50
la sección anteriormente mencionada, con la de un anticuerpo Y9A2 de ratón (CHEMICON INTERNATIONAL), se llevó a cabo el ensayo de inhibición de la adhesión celular descrito en J. Biol. Chem., 274: 36328-36334, 1999. Concretamente, se inmovilizó primero y se bloqueó una variante (nOPN-RAA) en la que la secuencia RGD contenida en el fragmento N-terminal (nOPN) resultante de la escisión de osteopontina con trombina se sustituyó por RAA, y se 55
añadió un anticuerpo Y9A2 de ratón o un anticuerpo Y9A2 quimérico purificado. Sucesivamente, se añadieron células SW480 que expresaban una molécula de integrina α9 humana (a veces indicadas más adelante en la presente memoria como células SW480/hα9), y la mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hr. Después, las células se fijaron y se tiñeron con violeta cristal y metanol, y se lavaron. El colorante de las células adheridas se extrajo con Triton X-100, y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

Como resultado, tal como se muestra en la Tabla 1, se ha descubierto que la CI50 del anticuerpo Y9A2 de ratón y la del anticuerpo Y9A2 quimérico purificado son casi iguales, y tienen una actividad inhibidora de la adhesión de las células SW480/hq9 a nOPN-RAA. La CI50 se define como la concentración del anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ necesaria para inhibir el 50% del nivel de adhesión celular que se da sin la adición del anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$.

5 Tabla 1

Resultado del ensayo de inhibición de la adhesión celular del anticuerpo Y9A2 de ratón y del anticuerpo Y9A2 quimérico

	anticuerpo Y9A2 de ratón	anticuerpo Y9A2 quimérico
CI50 ($\mu\text{g/mL}$)	0,039	0,038

«Ejemplo 3: Producción del gen del anticuerpo Y9A2 humanizado»

- 10 El anticuerpo humano molde en el que injertar los aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (CDR) en VH y VL del anticuerpo Y9A2 de ratón se seleccionó de las líneas germinales de anticuerpos humanos que tienen una secuencia de aminoácidos con una homología elevada con la secuencia de aminoácidos de la región estructural (FR) de VH, VL del anticuerpo Y9A2 de ratón. Concretamente, el VH humano molde seleccionado fue una combinación de DP-88 y JH6 y el VL humano molde seleccionado fue una combinación de DPK-1 y Jk4.
- 15 A las FRs de los VH y VL de anticuerpos humanos molde anteriormente mencionados se les injertaron las secuencias de aminoácidos necesarias de VH y VL del anticuerpo Y9A2 de ratón para proporcionar un anticuerpo humanizado. Concretamente, en cuanto a VH, la secuencia de aminoácidos de CDR y varios sitios de aminoácidos de FR de VH del anticuerpo humano molde anteriormente mencionado se sustituyeron primero por las secuencias de aminoácidos correspondientes de VH del anticuerpo Y9A2 de ratón. Se diseñaron las secuencias de aminoácidos
- 20 de VH de dos tipos de anticuerpos Y9A2 humanizados, es decir, RY9A2VHv5 y RY9A2VHv8, (SEQ ID N°: 5 y SEQ ID N°: 7, respectivamente), y, además, se diseñaron las secuencias de bases de los ADNs que codifican las secuencias de aminoácidos (SEQ ID N°: 6 y SEQ ID N°: 8), respectivamente. En RY9A2VHv8, 4 de los residuos de aminoácidos de FR derivaron del anticuerpo Y9A2 de ratón y en RY9A2VHv5 se sustituyen por los del anticuerpo humano molde.
- 25 En cuanto a VL, la secuencia de aminoácidos de CDR de VL del anticuerpo humano molde anteriormente mencionado se substituyó por la secuencia de aminoácidos de CDR de VL del anticuerpo Y9A2 de ratón, se diseñó la secuencia de aminoácidos de RY9A2VLv01, que es VL del anticuerpo Y9A2 humanizado (SEQ ID N°: 9), y, además, se diseñó la secuencia de bases del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°: 10).
- 30 Para producir fragmentos de ADN que codifican los RY9A2VHv5, RY9A2VHv8 y RY9A2VLv01 anteriormente mencionados, se llevó a cabo la síntesis completa mediante PCR con el uso de oligo ADN como material. Concretamente, RY9A2VHv5 se sintetizó dividiéndolo en 6 tipos de oligo ADNs (descritos en SEQ ID N°: 29 - 34) para cubrir la longitud completa de VH, como se muestra respectivamente en la Fig. 3 y, mediante su uso, se llevó a cabo la PCR mediante el procedimiento siguiente. Es decir, se mezclaron cantidades equivalentes de 6 tipos de oligo ADNs. Mediante el uso de la mezcla como molde y la ADN polimerasa Pyrobest (TAKARA BIO), se repitió una etapa
- 35 de 96 °C, 30 segundos, 50 °C, 30 segundos y 72 °C, 3 min, durante 15 ciclos. Después, mediante el uso de este producto de PCR (1 μL) como molde, oligo ADN que tenía la secuencia indicada en negrita en la Fig. 3 (mostrada en SEQ ID N°s: 35 y 36) como cebador, y ADN polimerasa Pyrobest, se repitió una etapa de 96 °C, 20 segundos y 72 °C, 2 min, durante 25 ciclos para amplificar un VH de longitud completa. RY9A2VHv8 también se produjo en general de la misma manera.
- 40 Para la producción de RY9A2VLv01, se llevaron a cabo 15 ciclos de PCR de la misma manera que antes mediante el uso de seis oligo ADNs (mostrados en SEQ ID N°s: 37 - 42) mostrados en la Fig. 4, y se llevaron a cabo 25 ciclos de PCR de la misma manera que antes mediante el uso del producto de amplificación como molde, y oligo ADN que tenía la secuencia indicada en negrita en la Fig. 4 (mostrado en SEQ ID N°s: 43 y 44) como cebador, por lo que se amplificó un VL de longitud completa.
- 45 En ambos VH y VL anteriormente mencionados, como secuencia líder del anticuerpo, se usó una secuencia igual que la del anticuerpo monoclonal anti-osteopontina humanizado descrito en el documento WO2007/139164. Además, a ambos extremos del fragmento de ADN obtenido se le añadió una secuencia de reconocimiento de HindIII y una secuencia de reconocimiento de BamHI para la clonación.
- 50 Los fragmentos de ADN así obtenidos de VH y VL se digirieron con las enzimas de restricción HindIII y BamHI, se ligaron con los vectores de expresión anteriormente mencionados AG- $\gamma 1$ y AG- κ , respectivamente, y se introdujeron en Escherichia coli según un método convencional de clonación. Se preparó el ADN plasmídico a partir del clon de Escherichia coli obtenido mediante el uso de un equipo QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). Mediante el uso del ADN plasmídico obtenido como molde, se analizaron las secuencias de bases de VH y VL clonados mediante el uso de

un equipo GenomeLab DTCS-Quick Start y un secuenciador automático CEQ2000 (ambos de BECKMAN COULTER), por lo que se obtuvieron los clones que tenían las secuencias de bases diseñadas. Estos clones se cultivaron, y se purificaron los plásmidos de expresión de la cadena pesada y de la cadena ligera mediante el uso de un equipo EndoFree Plasmid Maxi (QIAGEN).

- 5 El plásmido de expresión de la cadena pesada y el plásmido de expresión de la cadena ligera purificados se mezclaron, y la mezcla se introdujo en la célula para expresar de manera transitoria el anticuerpo mediante el uso del sistema de expresión FreeStyle 293. En este caso, un anticuerpo Y9A2 humanizado expresado mediante la combinación de un plásmido de expresión de la cadena pesada con inserción de RY9A2VHv5 y un plásmido de expresión de la cadena ligera con inserción de RY9A2VLv01 se denominó anticuerpo RY9A2v501, y un anticuerpo Y9A2 humanizado expresado mediante la combinación de un plásmido de expresión de la cadena pesada con inserción de RY9A2VHv8 y un plásmido de expresión de la cadena ligera con inserción de RY9A2VLv01 se denominó anticuerpo RY9A2v801.

10 La medida de la concentración de cada anticuerpo Y9A2 humanizado acumulado en el sobrenadante de cultivo y la obtención de un anticuerpo purificado a partir del sobrenadante de cultivo se llevaron a cabo mediante el mismo método usado para el anticuerpo Y9A2 quimérico anteriormente mencionado.

15 «Ejemplo 4: Confirmación de la actividad de unión del anticuerpo Y9A2 humanizado a integrina $\alpha 9$ humana»

El anticuerpo RY9A2v501 y el anticuerpo RY9A2v801 expresados mediante el método anteriormente mencionado se compararon con un anticuerpo Y9A2 quimérico (a veces indicado más adelante en la presente memoria como anticuerpo cY9A2) en cuanto a la actividad de unión a la molécula de integrina $\alpha 9$ humana según un método de ELISA celular. Concretamente, las células SW480 que expresaban la molécula de integrina $\alpha 9$ humana se inmovilizan en una placa de ELISA, se hacen reaccionar con el anticuerpo cY9A2 o el anticuerpo RY9A2v501 o el anticuerpo RY9A2v801 anteriormente mencionados, y se hacen reaccionar con un anticuerpo anti-IgG(Fc) humano de cabra marcado con HRP (American Qualex) como anticuerpo secundario. Se añadió TMB para permitir el desarrollo de color, se añadió ácido sulfúrico diluido para detener la reacción y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm. Como resultado, como se muestra en la Fig. 5 y la Fig. 6, se ha confirmado que el anticuerpo RY9A2v501 y el anticuerpo RY9A2v801 tienen una actividad de unión a la molécula de integrina $\alpha 9$ humana equivalente a la del anticuerpo cY9A2.

«Ejemplo 5: Ensayo de inhibición de la adhesión celular del anticuerpo Y9A2 humanizado»

El anticuerpo RY9A2v501 purificado anteriormente mencionado, el anticuerpo RY9A2v801 purificado y el anticuerpo Y9A2 de ratón se sometieron a un ensayo de inhibición de la adhesión celular de la misma manera que en el Ejemplo 2.

Los resultados se muestran en la Tabla 2. La CI50 ($\mu\text{g/mL}$) se define como la concentración del anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ necesaria para inhibir el 50% del nivel de adhesión celular que se da sin la adición del anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$. La media del valor de CI50 del anticuerpo Y9A2 de ratón fue 0,070 $\mu\text{g/mL}$. La Tabla 2 muestra la actividad específica del anticuerpo humanizado cuando el valor de CI50 de Y9A2 de ratón es 1. La Tabla 2 muestra un valor medio de dos rondas de ensayos. Como se muestra en la Tabla 2, se ha confirmado que los dos tipos anteriormente mencionados de anticuerpos humanizados tienen una actividad inhibitoria de la adhesión celular equivalente a la de un anticuerpo Y9A2 de ratón.

Tabla 2

Resultados de los ensayos de inhibición de la adhesión celular del anticuerpo Y9A2 de ratón, anticuerpo RY9A2v501 y anticuerpo RY9A2v801

anticuerpo	actividad específica
Y9A2	1,0
RY9A2v501	0,77
RY9A2v801	0,82

«Ejemplo 6: Producción de un anticuerpo Y9A2 humanizado mejorado»

Como se mencionó anteriormente, debido a que se pudieron obtener dos tipos de anticuerpos Y9A2 humanizados (anticuerpo RY9A2v501 y anticuerpo RY9A2v801) que tenían una actividad inhibitoria de la adhesión celular del mismo nivel que el anticuerpo Y9A2 de ratón original, los presentes inventores han intentado mejorar adicionalmente el anticuerpo Y9A2 humanizado mediante la introducción de mutaciones basándose en estos anticuerpos humanizados.

Como resultado de un ingenio y consideración considerables por parte de los presentes inventores, han tenido éxito

en la producción, como anticuerpo Y9A2 humanizado que tiene una actividad significativamente superior a la de un anticuerpo Y9A2 de ratón, los tres tipos siguientes de anticuerpos: anticuerpo RY9A2v12(M34L)012, anticuerpo RY9A2v11(M34L)012 y anticuerpo RY9A2v5(IAW)01.

1. Anticuerpo RY9A2v12(M34L)012

La región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo RY9A2v12(M34L)012 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°: 11, y la región variable de la cadena ligera (VL) tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°: 17. Las secuencias de bases de VH y VL del anticuerpo RY9A2v12(M34L)012 se muestran en SEQ ID N°s: 12 y 18, respectivamente. El VH del anticuerpo RY9A2v12(M34L)012 es el RY9A2VHv8 anteriormente mencionado (SEQ ID N°: 7) en el que un residuo de metionina (residuo de aminoácido 34° de la secuencia de aminoácidos de VH) de CDR1 se sustituye por leucina, así como un residuo de lisina y un residuo de ácido aspártico (residuos de aminoácidos 65° y 66° de la secuencia de aminoácidos de VH) de CDR2 se sustituyen por glutamina y glicina, respectivamente. El VL del anticuerpo RY9A2v12(M34L)012 es el RY9A2VLv01 anteriormente mencionado (SEQ ID N°: 9) en el que un residuo de lisina (residuo de aminoácidos 24° de la secuencia de aminoácidos de VL) de CDR1 se sustituye por arginina.

2. Anticuerpo RY9A2v11(M34L)012

El VH del anticuerpo RY9A2v11(M34L)012 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°: 13, y VL tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°: 17. Las secuencias de bases de VH y VL del anticuerpo RY9A2v11(M34L)012 se muestran en SEQ ID N°s: 14 y 18, respectivamente. El VH del anticuerpo RY9A2v11(M34L)012 es el RY9A2VHv5 anteriormente mencionado (SEQ ID N°: 5) en el que un residuo de metionina (residuo de aminoácido 34° de la secuencia de aminoácidos de VH) de CDR1 se sustituye por isoleucina, así como un residuo de lisina y un residuo de ácido aspártico (residuos de aminoácidos 65° y 66° de la secuencia de aminoácidos de VH) de CDR2 se sustituyen por glutamina y glicina, respectivamente. El VL del anticuerpo RY9A2v11(M34L)012 es el RY9A2VLv01 anteriormente mencionado (SEQ ID N°: 9) en el que un residuo de lisina (residuo de aminoácido 24° de la secuencia de aminoácidos de VL) de CDR1 se sustituye por arginina.

3. Anticuerpo RY9A2v5(IAW)01

El VH del anticuerpo RY9A2v5(IAW)01 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°: 15, y VL tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°: 9. Las secuencias de bases de VH y VL de RY9A2v5(IAW)01 se muestran en SEQ ID N°s: 16 y 10, respectivamente. El VH del anticuerpo RY9A2v5(IAW)01 es el RY9A2VHv5 anteriormente mencionado (SEQ ID N°: 5) en el que un residuo de metionina (residuo de aminoácido 34° de la secuencia de aminoácidos de VH) de CDR1 se sustituye por isoleucina, así como un residuo de ácido aspártico y un residuo de fenilalanina (residuos de aminoácidos 104° y 105° de la secuencia de aminoácidos de VH) de CDR3 se sustituyen por alanina y triptófano, respectivamente. El VL del anticuerpo RY9A2v5(IAW)01 es igual que el RY9A2VLv01 anteriormente mencionado (SEQ ID N°: 9).

Los fragmentos de ADN de VH y VL de los 3 tipos anteriormente mencionados de anticuerpos Y9A2 humanizados mejorados se ligaron con los vectores de expresión AG-γ1 y AG-κ para proporcionar un plásmido de expresión de la misma manera que antes. El plásmido se expresó mediante el uso de un sistema de expresión FreeStyle 293, y se obtuvieron diversos anticuerpos purificados a partir del sobrenadante de cultivo mediante el uso de una columna de proteína A como se mencionó anteriormente.

«Ejemplo 7: Confirmación de la actividad de unión del anticuerpo Y9A2 humanizado mejorado a integrina α9 humana»

Los 3 tipos de anticuerpos Y9A2 humanizados y anticuerpos cY9A2 producidos como se mencionó anteriormente se confirmaron en cuanto a la actividad de unión a integrina α9 humana mediante ELISA celular de la misma manera que en el Ejemplo 4. Como resultado, se pudo confirmar que todos los anticuerpos Y9A2 humanizados mejorados tenían una actividad de unión a integrina α9 humana, como el anticuerpo Y9A2 quimérico.

«Ejemplo 8: Ensayo de inhibición de la adhesión celular del anticuerpo Y9A2 humanizado mejorado con nOPN humana»

Para comparar la actividad de los 3 tipos de anticuerpos Y9A2 humanizados mejorados con la de un anticuerpo Y9A2 de ratón, se llevó a cabo el ensayo de inhibición de la adhesión celular de la misma manera que en el Ejemplo 2.

Los resultados se muestran en la Tabla 3. La CI50 (μg/mL) se define como la concentración del anticuerpo anti-integrina α9 necesaria para inhibir el 50% del nivel de adhesión celular que se da sin la adición del anticuerpo anti-integrina α9. La media de los valores de CI50 del anticuerpo Y9A2 de ratón fue 0,039 μg/mL. La Tabla 3 muestra la actividad específica del anticuerpo Y9A2 humanizado cuando el valor de CI50 de Y9A2 de ratón es 1. Se muestran los valores medios de 2 ó 3 rondas de los ensayos en la Tabla 3. Se ha descubierto que los 3 tipos de anticuerpos Y9A2 humanizados mejorados muestran como mínimo una actividad inhibitoria de la adhesión celular mejorada de 4 veces en comparación con el anticuerpo Y9A2 de ratón.

Tabla 3

Resultados del ensayo de inhibición de la adhesión celular del anticuerpo Y9A2 humanizado mejorado

anticuerpo	actividad específica
Y9A2	1,0
RY9A2v5(IAW)01	0,29
RY9A2v11(M34L)012	0,23
RY9A2v12(M34L)012	0,23

«Ejemplo 9: Ensayo de inhibición de la adhesión celular del anticuerpo Y9A2 humanizado mejorado con VCAM-1 humano y Tenascina C humana»

Se examinaron los 3 tipos de anticuerpos Y9A2 humanizados mejorados mediante el uso de un ligando diferente de nOPN-RAA usado para el ensayo de inhibición de la adhesión celular anteriormente mencionado. Concretamente, se examinó de la misma manera la acción inhibitoria de la adhesión celular con VCAM-1/Ig humana (R&D) y una variante de Tenascina C-RAA humana, en la que la secuencia RGD de la Tenascina C humana se sustituyó por RAA.

Los valores medios de dos rondas de ensayos se muestran en la Tabla 4. Los valores medios de los valores de CI50 de la actividad inhibitoria de la adhesión celular del anticuerpo Y9A2 de ratón con VCAM-1 humano y Tenascina C-RAA humana fueron 0,077 µg/mL y 0,041 µg/mL, respectivamente. La Tabla 4 muestra la actividad específica del anticuerpo Y9A2 humanizado cuando el valor de CI50 del anticuerpo Y9A2 de ratón es 1. Se ha descubierto que los 3 tipos de anticuerpos Y9A2 humanizados mejorados muestran una actividad inhibitoria al menos equivalente a la del anticuerpo Y9A2 de ratón, aunque sujeta a variación dependiendo del ligando usado.

Tabla 4

Resultados del ensayo de inhibición de la adhesión celular del anticuerpo Y9A2 humanizado mejorado con VCAM-1 y Tenascina C

anticuerpo	actividad específica de VCAM-1 humano	actividad específica de Tenascina C-RAA humana
Y9A2	1,0	1,0
RY9A2v5(IAW)01	1,0	0,44
RY9A2v11(M34L)012	0,44	0,35
RY9A2v12(M34Z)012	0,95	0,26

«Ejemplo 10: Ensayo de inhibición de la migración celular del anticuerpo Y9A2 humanizado mejorado»

Se examinaron los 3 tipos de anticuerpos Y9A2 humanizados mejorados en cuanto a la acción inhibitoria de la actividad de migración de células SW480/hq9 con nOPN-RAA. El experimento se basó en el ensayo de inhibición de la migración celular descrito en Molecular Biology of the Cell, 12: 3214-3225, 2001, con algunos cambios. Para ser precisos, se inmovilizó nOPN-RAA en la cámara superior de una cámara Transwell (Millipore), se colocó sobre una placa, y después se añadió medio F15 que contenía un 10% de FCS en la cámara inferior. Se añadió el anticuerpo Y9A2 de ratón o el anticuerpo Y9A2 humanizado junto con células SW480/hq9 a la cámara superior, y la mezcla se incubó a 37 °C durante 16 hr. Después, se cuantificaron las células que migraron a la cámara inferior de la cámara Transwell mediante el uso de un equipo de ensayo de 24 pocillos de migración celular por quimiotaxis QCM (Millipore). La actividad de migración inhibida por la adición de una cantidad en exceso (100 µg/mL) del anticuerpo Y9A2 de ratón se define como una actividad de migración dependiente de α9 (100% de inhibición), y la tasa de inhibición de cada anticuerpo se muestra en la Tabla 5.

Se halló una acción inhibitoria de la migración significativa solamente cuando se añadió el anticuerpo Y9A2 de ratón a 50 µg/mL; sin embargo, el anticuerpo Y9A2 humanizado mejorado producido por los presentes inventores mostró una acción inhibitoria significativa a una concentración de 5 µg/mL, que es 1/10 la del anticuerpo Y9A2 de ratón. La prueba de diferencia significativa se llevó a cabo mediante la prueba t de Student respecto de un pocillo sin anticuerpo. *: P<0,05, **: P<0,01.

Tabla 5

Resultados del ensayo de inhibición de la migración celular del anticuerpo Y9A2 humanizado mejorado

anticuerpo	concentración de anticuerpo ($\mu\text{g/mL}$)	tasa de inhibición (%)
Y9A2	5	28
	20	24
	50	99 *
RY9A2v5(IAW)01	5	109 **
RY9A2v11(M34L)012	5	84 *
RY9A2v12(M34Z)012	5	86 *

La acción inhibitoria de la migración celular significativa está asociada directamente a una concentración clínicamente eficaz, en la que una concentración clínicamente eficaz que se transforma en 1/10 conduce a intervalos de administración ampliados (p.ej., la administración de una vez cada dos semanas se transforma en una vez cada varios meses, etc.) en la práctica clínica, y una concentración sanguínea mantenida en alrededor de 5 $\mu\text{g/mL}$ permite el desarrollo de una preparación inyectable subcutánea. Debido a que la auto-inyección de las preparaciones inyectables subcutáneas está permitida actualmente en todo el mundo, se mejora extraordinariamente la comodidad en las enfermedades crónicas, especialmente para pacientes e instituciones médicas. Por lo tanto, la mejora de la actividad biológica mediante la presente invención contribuye enormemente no solamente a la eficacia terapéutica de la misma, sino también a la mejora del cumplimiento por parte del paciente.

«Ejemplo 11: Ensayo de estabilidad térmica del anticuerpo Y9A2 humanizado mejorado»

Los 3 tipos de anticuerpos Y9A2 humanizados mejorados y el anticuerpo Y9A2 de ratón se incubaron a 70 °C durante 2 hr o 10 hr, y se determinó la estabilidad térmica mediante el uso del ensayo de inhibición de la adhesión celular descrito en el Ejemplo 8.

Se muestran los valores medios de 4 experimentos en la Tabla 6. Con la actividad inhibitoria de la adhesión celular sin tratamiento térmico como el 100%, se muestra la tasa residual de actividad de cada anticuerpo después del tratamiento térmico. Aunque el anticuerpo Y9A2 de ratón mostró una disminución de la actividad en 2 horas, los 3 tipos de anticuerpos Y9A2 humanizados mejorados conservaron un 85% o más de la actividad incluso después de una incubación de 10 hr. Por lo tanto, la propiedad de ser extremadamente estable térmicamente del anticuerpo Y9A2 humanizado mejorado conduce al desarrollo de una preparación muy adecuada que permite la conservación a temperatura ambiente de las preparaciones para el desarrollo clínico.

Tabla 6

Resultados del ensayo de estabilidad térmica del anticuerpo Y9A2 humanizado mejorado

anticuerpo	tasa residual de actividad (%) en 2 hr	tasa residual de actividad (%) en 10 hr
Y9A2	27	33
RY9A2v5(IAW)01	89	86
RY9A2v11(M34L)012	92	87
RY9A2v12(M34L)012	91	89

Aplicabilidad industrial

El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana mejorado de la presente invención tiene una actividad y/o propiedades mejoradas en comparación con un anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ humana de ratón donante, y una acción anti-inflamatoria intensa y una acción supresora de la destrucción ósea intensa mediante el bloqueo de las interacciones entre integrina $\alpha 9$ humana y diversos ligandos de la misma, y es útil para la profilaxis o el tratamiento de diversas enfermedades que implican a la integrina $\alpha 9$ humana en la patogénesis.

Esta solicitud se basa en las solicitudes de patentes N°s 2008-004975 presentadas en Japón (fecha de presentación: 11 de enero, 2008) y 2008-282496 (fecha de presentación: 31 de octubre de 2008).

Listado de secuencias

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

5 <120> Anticuerpo humanizado anti-integrina- α 9 humana

<130> 091325

<150> JP 2008-004975A@

10 <151> 2008-01-11

<150> JP 2008-282496A@

<151> 2008-10-31A@A@A@

15 <160> 44

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

20 <211> 120

<212> PRT

<213> ratón

<400> 1

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Ile Tyr Gly Asp Tyr Gly Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 360

30 <212> DNA

<213> ratón

<400> 2

ES 2 519 047 T3

cagggtccagc ttcagcagtc tggggctgaa ctgggcaaato ctggggcctc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggcta cacattaact acctactgga tgcactgggt aaaacagagg 120
 cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gctctgggta tactgaatac 180
 aatcagaagt tcaaggacaa ggccacgttg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcaactga ccagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aatctatggg 300
 gactatgggg atttctactt tgactactgg ggccagggca ccactctcac agtctctca 360

<210> 3
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> ratón

<400> 3

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asn Thr Asp
 20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Asn His Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Phe Cys Arg Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 4
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> ratón

<400> 4

agtattgtga tgaccagac tcccaaattc ctgcttgat cagcaggaga cagggttacc 60
 atgacctgca aggccagtca gagtgtgaat actgatgttg cttggttcca acagaagcca 120
 gggcagtctc ctaaaactgct gatatacttt gcatccaatc actacactgg agtccttgat 180
 cgcttactg gcagtggata tgggacggat ttcactttca ccatcagcac tgtgcaggct 240
 gaagacctgg caatttatct ctgtcggcag gattacagct ctccgttcac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaataaa acgg 324

<210> 5
 <211> 120
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena VH de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

5

<400> 5

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ile Tyr Gly Asp Tyr Gly Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

<210> 6

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial

15

<220>

<223> Gen VH de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

<400> 6

20

cagggtgcagc	tggtgcagtc	tggtgctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	cgtgaagatg	60
tcttgcaagg	cttctggata	caccctcacc	acctactgga	tgactgggt	gaaacagaga	120
cctggacaag	ggcttgagt	gattggatac	attaatccta	gctctgggta	tactgaatac	180
aatcagaagt	tcaaggacag	agtcacgatt	accgcggaca	aatccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gatttatggt	300
gactatgggg	atttctactt	tgactactgg	gggcaaggga	ccacgggtcac	cgtctcctca	360

25

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Cadena VH de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

ES 2 519 047 T3

<400> 7

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

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

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ile Tyr Gly Asp Tyr Gly Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 8
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial

10 <220>
<223> Gen VH de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

<400> 8

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc cgtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggata caccctcacc acctactgga tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatac attaatccta gctctgggta tactgaatac 180

aatcagaagt tcaaggacag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gatttatggt 300

15 gactatgggg atttctactt tgactactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 9
<211> 108
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> Cadena VL de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

25 <400> 9

ES 2 519 047 T3

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Asn His Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Arg Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 10

<211> 324

5 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Gen VL de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

10

<400> 10

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aggccagtca gagtgtgaat actgatgttg cttggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctacttt gcatccaatc actacactgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat ttacttttca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagatattg caacatatta ctgtcggcag gattacagct ctccgttcac gttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa acgt 324

15 <210> 11

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Cadena VH de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

<400> 11

ES 2 519 047 T3

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

<210> 12
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Gen VH de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

<400> 12
 cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc cgtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccctcacc acctactggt tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatac attaatccta gctctgggta tactgaatac 180
 aatcagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gatttatggt 300
 gactatgggg atttctactt tgactactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 13
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena VH de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

<400> 13

ES 2 519 047 T3

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ile Tyr Gly Asp Tyr Gly Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Gen VH de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

<400> 14

cagggtgcagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	cgtgaagatg	60
tcctgcaagg	cttctggata	caccctcacc	acctactggg	tgactgggt	gaaacagaga	120
cctggacaag	ggcttgagt	gattggatac	attaatccta	gctctgggta	tactgaatac	180
aatcagaagt	tccagggcag	agtcacgatt	accgcggaca	aatccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gatttatggt	300
gactatgggg	atttctactt	tgactactgg	gggcaaggga	ccacgggtcac	cgtctcctca	360

<210> 15
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena VH de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

<400> 15

ES 2 519 047 T3

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ile Tyr Gly Asp Tyr Gly Ala Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Gen VH de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

<400> 16
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc cgtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggata caccctcacc acctactgga ttcactgggt gaaacagaga 120
cctggacaag ggcttgagtg gattggatac attaatocta gctctgggta tactgaatac 180
aatcagaagt tcaaggacag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gatttatggt 300
gactatgggg cttggtactt tgactactgg gggcaaggga ccacgggtcac cgtctcctca 360

<210> 17
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena VL de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

<400> 17

ES 2 519 047 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Thr Asp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Asn His Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Arg Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 18

<211> 324

5 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Gen VL de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

10

<400> 18

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgca gggccagtc gagtgtgaat actgatgttg cttggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctacttt gcatccaatc actacactgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat tttactttca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagatattg caacatatta ctgtcggcag gattacagct ctccggttcac gttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa acgt 324

15 <210> 19

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Cadena H de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

<400> 19

ES 2 519 047 T3

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

ES 2 519 047 T3

115		120		125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala				
130		135		140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser				
145		150		155
				160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val				
		165		170
				175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro				
		180		185
				190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys				
		195		200
				205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp				
		210		215
				220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly				
225		230		235
				240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile				
		245		250
				255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu				
		260		265
				270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His				
		275		280
				285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg				
		290		295
				300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys				
305		310		315
				320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu				
		325		330
				335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr				
		340		345
				350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu				
		355		360
				365

ES 2 519 047 T3

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 20
<211> 1350
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Gen H de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

<400> 20

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	cgtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttctggata	caccctcacc	acctactggt	tgcaactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggatac	attaatccta	gctctgggta	tactgaatac	180
aatcagaagt	tccagggcag	agtcacgatt	accgcggaca	aatccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gatttatggt	300
gactatgggg	atttctactt	tgactactgg	gggcaaggga	ccacgggtcac	cgtctcctca	360
gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcaccct	cctccaagag	cacctctggg	420
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacggtgtcg	480
tggaactcag	gcgccctgac	cagcggcgtg	cacaccttcc	cggtgtcctc	acagtctctca	540
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	cacccagacc	600
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggaacaaga	agttgagccc	660
aaatcttggtg	acaaaactca	cacatgccca	ccgtgcccag	cacctgaact	cctgggggga	720
ccgtcagttc	tcctcttccc	cccaaaaccc	aaggacaccc	tcatgatctc	ccggaccctc	780

ES 2 519 047 T3

gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
 agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
 aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccata ccgggatgag 1080
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 1200
 ctggactccg acggtctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 21

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena H de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

<400> 21

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

ES 2 519 047 T3

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

ES 2 519 047 T3

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 22
<211> 1350
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Gen H de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

<400> 22

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	cgtgaagatg	60
tcctgcaagg	cttctggata	cacctcacc	acctactggt	tgcactgggt	gaaacagaga	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gattggatac	attaatccta	gctctgggta	tactgaatac	180
aatcagaagt	tccagggcag	agtcacgatt	accgcggaca	aatccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gatttatggt	300
gactatgggg	atttctactt	tgactactgg	gggcaaggga	ccacggtcac	cgtctcctca	360
gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcaccct	cctccaagag	cacctctggg	420
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacggtgtcg	480
tggaactcag	gcgcctgag	cagcggcgtg	cacaccttcc	cggctgtcct	acagtcctca	540
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	caccagacc	600
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggaacaaga	agttgagccc	660
aaatcttgtg	acaaaactca	cacatgccca	ccgtgccag	cacctgaact	cctgggggga	720
ccgtcagtct	tcctcttccc	cccaaaaccc	aaggacaccc	tcatgatctc	ccggaccct	780
gaggtcacat	gcgtgggtgt	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	840

ES 2 519 047 T3

```
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350
```

<210> 23
<211> 450
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Cadena H de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

<400> 23

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
          50          55          60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

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

Ala Ile Tyr Gly Asp Tyr Gly Ala Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
          100          105          110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
          115          120          125
```

ES 2 519 047 T3

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

ES 2 519 047 T3

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 24
<211> 1350
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Gen H de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

<400> 24

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	cgatgaagatg	60
tcctgcaagg	cttctggata	caccctcacc	acctactgga	ttcactgggt	gaaacagaga	120
cctggacaag	ggcttgagt	gattggatac	attaatccta	gctctgggta	tactgaatac	180
aatcagaagt	tcaaggacag	agtcacgatt	accgcggaca	aatccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gatttatggt	300
gactatgggg	cttggactct	tgactactgg	gggcaaggga	ccacgggtcac	cgtctcctca	360
gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcaccct	cctccaagag	cacctctggg	420
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggg	gacgggtgtcg	480
tggaactcag	gcgccctgac	cagcggcggt	cacaccttcc	cggtgtcctc	acagtcctca	540
ggactctact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgcctccca	gcagcttggg	caccagacc	600
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggaacaaga	agttgagccc	660
aaatcttggt	acaaaactca	cacatgccca	ccgtgcccag	cacctgaact	cctgggggga	720
ccgtcagtct	tcctcttccc	cccaaaaccc	aaggacaccc	tcatgatctc	ccggaccctc	780
gaggtcacat	gcgtgggtgt	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	840

ES 2 519 047 T3

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
 agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
 aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
 ctggactccg acggtctctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 25

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena L de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

<400> 25

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Thr Asp
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Asn His Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Arg Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

ES 2 519 047 T3

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 26
<211> 642
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Gen L de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

<400> 26

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgca gggccagtc gagtgtgaat actgatgttg cttggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctacttt gcatccaatc actacactgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat ttacttttca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagatattg caacatatta ctgtcggcag gattacagct ctccgttcac gttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acgtactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcga 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 27
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena L de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

<400> 27

ES 2 519 047 T3

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Asn His Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Arg Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 28

<211> 642

5 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Gen L de anticuerpo humanizado anti-integrina alfa9 humana

10

<400> 28

ES 2 519 047 T3

	gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
	atcacttgca aggccagtca gagtgtgaat actgatgttg cttggtatca gcagaaacca	120
	gggaaagccc ctaagctcct gatctacttt gcatccaatc actacactgg ggtcccatca	180
	aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat tttactttca ccatcagcag cctgcagcct	240
	gaagatattg caacatatta ctgtcggcag gattacagct ctccgttcac gttcggcgga	300
	gggaccaagg tggagatcaa acgtactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcga	360
	tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	420
	cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag	480
	gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
	ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	600
	ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt	642
5	<210> 29 <211> 92 <212> DNA <213> Artificial	
10	<220> <223> oligo DNA representado en Fig.3 <400> 29	
	cagcaagctt gccgccacca tggaatggag ctggatcttt ctcttcctcc tgtcagtaac	60
	tgcaggtgtc caatcccagg tgcagctggt gc	92
15	<210> 30 <211> 96 <212> DNA <213> Artificial	
20	<220> <223> oligo DNA representado en Fig.3 <400> 30	
	aggcttctgg atacaccctc accacctact ggatgcactg ggtgaaacag agacctggac	60
25	aagggttga gtggattgga tacattaatc ctagct	96
30	<210> 31 <211> 93 <212> DNA <213> Artificial	
	<220> <223> oligo DNA representado en Fig.3	
35	<400> 31	
	ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc ctgagatctg aggacacggc	60
	cgtgtattac tgtgcgattt atggtgacta tgg	93
40	<210> 32 <211> 93 <212> DNA	

<213> Artificial
 <220>
 <223> oligo DNA representado en Fig.3
 5 <400> 32
 tcgcggatcc actcacctga ggagacgggtg accgtgggtcc cttgccccca gtagtcaaag 60
 tagaaatccc catagtcacc ataaatcgca cag 93
 10 <210> 33
 <211> 95
 <212> DNA
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> oligo DNA representado en Fig.3
 <400> 33
 ggtgaggggtg tatccagaag ccttgcagga catcttcacg gaggaccag gcttcttcac 60
 20 ctcagcccca gactgcacca gctgcacctg ggatt 95
 <210> 34
 <211> 97
 <212> DNA
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligo DNA representado en Fig.3
 30 <400> 34
 gctgtgctcg tggatttgtc cgcggtaatc gtgactctgt ccttgaactt ctgattgtat 60
 tcagtataac cagagctagg attaattgtat ccaatcc 97
 <210> 35
 35 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> oligo DNA representado en Fig.3
 <400> 35
 cagcaagctt gccgccacca tggaatggag ctggatcttt 40
 45 <210> 36
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> oligo DNA representado en Fig. 3
 <400> 36
 55 tcgcggatcc actcacctga ggagacgggtg accgtgggtcc 40
 <210> 37
 <211> 93
 60 <212> DNA

<213> Artificial
 <220>
 <223> oligo DNA representado en Fig.4

5 <400> 37

cagcaagctt gccgccacca tgaagttgcc tgtaggctg ttggtgctga tgttctggat 60
 tcctgcttcc agcagtgaca tccagatgac cca 93

10 <210> 38
 <211> 95
 <212> DNA
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> oligo DNA representado en Fig.4

<400> 38
 tattcacact ctgactggcc ttgcaagtga tggtagctct gtctcctaca gatgcagaca 60
 gggaggatgg agactgggtc atctggatgt cactg 95

20 <210> 39
 <211> 92
 <212> DNA
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> oligo DNA representado en Fig.4

<400> 39
 30 aggccagtca gagtgtgaat actgatgttg cttggtatca gcagaaacca gggaaagccc 60
 ctaagctcct gatctacttt gcatccaatc ac 92

35 <210> 40
 <211> 91
 <212> DNA
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> oligo DNA representado en Fig.4

<400> 40
 tgctgatggg gaaagtaaaa tctgtcccag atccacttcc actgaacctt gatgggaccc 60
 cagtgtagtg attggatgca aagtagatca g 91

45 <210> 41
 <211> 88
 <212> DNA
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> oligo DNA representado en Fig.4

<400> 41
 cagattttac tttcaccatc agcagcctgc agcctgaaga tattgcaaca tattactgtc 60
 55 ggcaggatta cagctctccg ttcacgtt 88

<210> 42
 <211> 92
 <212> DNA
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> oligo DNA representado en Fig.4
 <400> 42
 10 tcgcggatcc aactgaggaa gcaaagtta aattctactc acgtttgatc tccaccttgg 60
 tccctccgcc gaacgtgaac ggagagctgt aa 92
 15 <210> 43
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> oligo DNA representado en Fig.4
 <400> 43
 cagcaagctt gccgccacca tgaagtgcc tgtaggctg 40
 25 <210> 44
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> oligo DNA representado en Fig.4
 <400> 44
 35 tcgcggatcc aactgaggaa gcaaagtta aattctactc 40

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana, que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera seleccionadas de lo siguiente:
 - (a) una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:11 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:17
 - (b) una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:13 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:17, y
 - (c) una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:15 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:9.
2. El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según la reivindicación 1, en el que la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es IgY1 humano.
3. El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según la reivindicación 1, en el que la región constante de la cadena ligera del anticuerpo es Igk humano.
4. El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según la reivindicación 1, en el que la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es IgY1 humano y la región constante de la cadena ligera del anticuerpo es Igk humano.
5. El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según la reivindicación 1, en el que la cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:19 y la cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:25.
6. El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según la reivindicación 1, en el que la cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:21 y la cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:25.
7. El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según la reivindicación 1, en el que la cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:23 y la cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:27.
8. Un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según la reivindicación 1 y una secuencia que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según la reivindicación 1.
9. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según la reivindicación 1 y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según la reivindicación 1.
10. Una célula hospedadora que se selecciona del grupo que consiste en los siguientes (a) y (b),
 - (a) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según la reivindicación 1 y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según la reivindicación 1; y
 - (b) una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según la reivindicación 1 y con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según la reivindicación 1.
11. Un método para producir un anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana, que comprende una etapa de cultivo de la célula hospedadora según la reivindicación 10 para permitir la expresión del anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana.
12. Un anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana producido mediante el método según la reivindicación 11.
13. Una preparación farmacéutica para la artritis reumatoide, que comprende el anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 12.

14. Un anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 12 para el uso como un medicamento.

15. El anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha 9$ humana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 12 para el uso en un método para prevenir o tratar la artritis reumatoide.

FIG. 1

Y9A2VH FR1 CDR1 FR2 CDR2
QVQLQQSGAELANPGASVKMSCKASGYTLT TYWMH WVKQRPQGQGLEWIG YINPSSGYTEYNQKFKD

 FR3 CDR3 FR4
KATLTADKSSSTAYMQLTSLTSEDSAVYYCAI YGDYGDYFDY WGQQTTLTVSS

FIG. 2

Y9A2VL FR1 CDR1 FR2 CDR2
SIVMTQTPKFLVLSAGDRVMTMC KASQSVNTDVA WFQQKPGQSPKLLIY FASNHYT

 FR3 CDR3 FR4
GVPDRFTGSGYGTDFTFITSTVQAEDLAIYFC RQDYSSPFT FGGGTKLEIKR

FIG. 3

#RY9A2VH-01
 10 ↓ 20 30 40 50 60
 5'-CAGCAAGCTTGGCCGACCATGGAATGGAGCTGGATCTTTCTGTTGCTCCTGTCAATTAAC
 N E W S W I F L F L L S V T
 70 80 90 100 110 120
 TGCAGGTGTCCAATCCGAGGTGCAGCTGATGC-3'
 3'-TTAGGCTCCACGTGACCCACGTCAAGCCGCACTCCACTTCTTGGGACC
 A G V Q S Q V Q L V Q S G A E V K K P G
 #RY9A2VH-03
 130 140 150 ↓ 160 170 180
 5'-AGGCTTCTGATACACCGTCACGACCTACTGATGCA
 GAGGAGGCAGCTTCTACAGGACGTTCCGAAAGAGCTATGTGGGATGG-5'
 S S V K N S C K A S G Y T L T T Y W M H
 #RY9A2VH-07
 190 200 210 220 230 240
 CTGGGTGAAACAGAGACCTGGACAAAGGCTTGAGTGGATTGGATACATTAACTAGCT-3'
 3'-CCTAAGCTATGTAATTAGGATCGAG
 W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S S
 #RY9A2VH-05
 250 260 270 280 290 ↓ 300
 5'-GGACAAATC
 ACCAATATGACTTATGTAGTCTTCAAGTTCCTGTCTCAATGCTAATGGCGCTGTTTAA
 G Y T E Y N Q K F K D R V T I T A D K S
 310 320 330 340 350 360
 CACGAGCAGACGCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGCGCTGTATT
 GTGCTCAGTGTG-5'
 T S T T A Y H E L S S L R S E D T A V Y Y
 #RY9A2VH-08
 370 380 390 400 410 420
 CTGTGCGATTATGCTGACTATGG-3'
 3'-GACAGCTAAATACCACTGATACCCCTAAAGATGAAAGTGAATGACCCCGTTCCCTGGTG
 C A I Y G D Y G D F Y F D Y W G Q G T T
 430 440 450 460
 CCAGTGGCAAGGAGTCCAGTCACCTAGCCGCT-5'
 V T V S S
 ↑
 #RY9A2VH-08

FIG. 4

#RY9A2VL-01
 10 ↓ 20 30 40 50 60
 5'-CAGCAAGCTTCCCCCACCATGAAGTTCCTGTAGGCTGTTGGTGTGATGTTCTGGAT
 M K L P V R L L V L M F W I
 70 80 90 100 110 120
 TCCTGCTTCCAGCATTACATCCAGATGACCA-3'
 3'-GTCACTGTAGGTCTACTGGTCAAGGTAGGAGGACAGAGCTAGACA
 P A S S S D I Q M T Q S P S S L S A S V
 #RY9A2VL-03
 130 140 150 160 ↓ 170 180
 5'-AGGCGATCAGAGTGTGAATAGTATGTTGCTTG
 TCCTGCTGTCTCAGTGGTATGTAACCTTCCGGTCAGTCTCAGACTTAT-5'
 Q D R V T I T C K A S Q S I V N T D V A W
 #RY9A2VL-02
 190 200 210 220 230 240
 GTATCAGCAGAAACAGGHAAGCCCTAAGCTCTGTATCTAGTTTGCATCCAATCAC-3'
 3'-GACTAGATGAAACGTAGGTTAGTAT
 Y Q Q K P Q K A P K L L I Y F A S N H Y
 #RY9A2VL-05
 250 260 270 280 290 ↓ 300
 5'-CAGATTTTACITTCACCAT
 GTACCCGCAAGGTATTCGAAGTCAGCTTCAGCTAGAGCCTGTGTAAATGAAAGTGGTA
 T G V P S R F S Q S Q S Q T D F T F T I
 #RY9A2VL-04
 310 320 330 340 350 360
 CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTGCGCAGGATTACAGCTCTCC
 GTCT-5' 3'-AATGTCAGAGAG
 S S L Q P E D I A T Y Y C R Q D Y S S P
 370 380 390 400 410 420
 GTTCAGTTI-3'
 CAAGTGAAGCCGCTCCCTGGTTCCAGCTCTAGTTTGCAGTCATCTTAAATTGAAACG
 F T F Q Q G T K V E I K R
 430 440
 AAGGATCAAGCTAGGCTI-5'
 ↑
 #RY9A2VL-06

FIG. 5

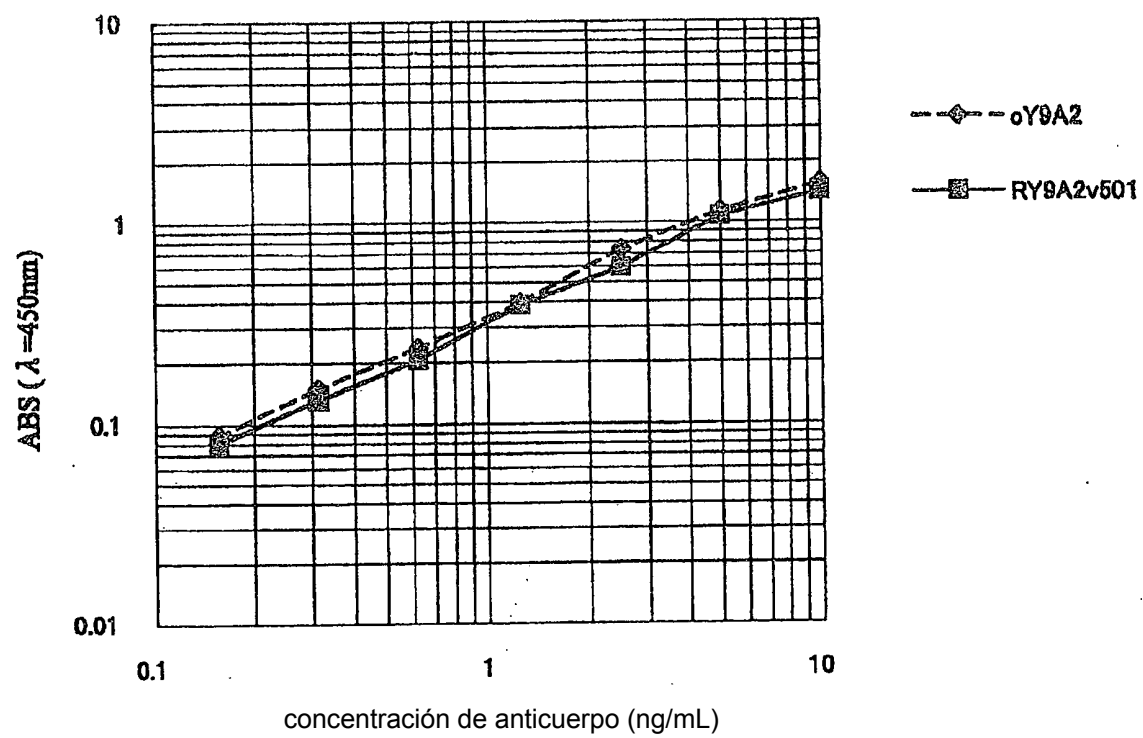


FIG. 6

