

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 302**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 15/13</b>	(2006.01)	<b>C12P 21/08</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)	<b>G01N 33/53</b>	(2006.01)
<b>A61P 19/00</b>	(2006.01)	<b>G01N 33/543</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)	<b>G01N 33/566</b>	(2006.01)
<b>A61P 37/02</b>	(2006.01)		
<b>C07K 14/705</b>	(2006.01)		
<b>C07K 14/78</b>	(2006.01)		
<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)		
<b>C12N 15/63</b>	(2006.01)		
<b>C12N 5/10</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2006 E 06804739 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 1948798**

54 Título: **Anticuerpos anti-integrina alfa2 y sus usos**

30 Prioridad:

**18.11.2005 US 738303 P**

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

**17.07.2015**

73 Titular/es:

**GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A. (100.0%)  
CHEMIN DE LA COMBETA, 5  
2300 LA CHAUX-DE-FONDS, CH**

72 Inventor/es:

**LAZARIDES, ELIAS;  
WOODS, CATHERINE y  
BERNARD, MARK A.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 541 302 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-integrina alfa2 y sus usos.

## Campo técnico

5 La presente invención se refiere en general a anticuerpos dirigidos contra la integrina  $\alpha 2\beta 1$  y sus usos, que incluyen anticuerpos anti-integrina alfa2 ( $\alpha 2$ ) humanizados y métodos de tratamiento con anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$ .

## Antecedentes de la invención

10 La integrina  $\alpha 2\beta 1$  (antígeno muy tardío 2; VLA-2) se expresa sobre una diversidad de tipos celulares, que incluyen plaquetas, células endoteliales vasculares, macrófagos/monocitos activados, fibroblastos, leucocitos, linfocitos, neutrófilos activados y mastocitos (Hemler, *Annu. Rev. Immunol.*, 8:365:365-400 (1999); Wu y Santoro, *Dev. Dyn.*, 206:169-171 (1994); Edelson et al., *Blood*, 103(6):2214-2220 (2004); Dickeson et al., *Cell Adhesion and Communication*. 5:273-281 (1998)). Los ligandos más típicos para  $\alpha 2\beta 1$  incluyen el colágeno y la laminina, encontrándose ambos en la matriz extracelular. Generalmente, el dominio I de la integrina  $\alpha 2$  se une al colágeno de una manera dependiente de cationes divalentes, mientras que el mismo dominio se une a la laminina a través de mecanismos independientes y dependientes de cationes divalentes (Dickeson et al., *Cell Adhesion and Communication*. 5:273-281 (1998)). La especificidad de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  varía según el tipo celular y actúa como receptor del colágeno y/o la laminina para tipos celulares concretos, por ejemplo, la integrina  $\alpha 2\beta 1$  se conoce como receptor del colágeno en plaquetas y como receptor de la laminina en células endoteliales (Dickeson et al., *J. Biol. Chem.*, 272: 7661-7668 (1997)). La ecovirus-1, la decorina, la E-caderina, la metaloproteinasas de matriz I (MMP-I), la endorrepelina y múltiples colectinas y la proteína del complemento C1q también son ligandos para la integrina  $\alpha 2\beta 1$  (Edelson et al., *Blood*, 107(1):143-150 (2006)). Se ha implicado a la integrina  $\alpha 2\beta 1$  en varios procesos biológicos y patológicos, que incluyen la agregación de plaquetas inducida por colágeno, la migración celular sobre el colágeno, la reorganización dependiente de células de las fibras de colágeno, así como las respuestas celulares dependientes de colágeno que producen aumentos en la expresión de citoquinas y la proliferación (Gendron, *J. Biol. Chem.*, 278:48633-48643 (2003); Andreasen et al., *J. Immunol.*, 171:2804-2811 (2003); Rao et al., *J. Immunol.*, 165(9):4935-40 (2000)), aspectos de la función de células T, mastocitos, y neutrófilos (Chan et al., *J. Immunol.*, 147:398-404 (1991); Dustin y de Fougères, *Curr. Opin. Immunol.*, 13:286-290 (2001); Edelson et al., *Blood*, 103(6):2214-2220 (2004); Werr et al., *Blood*, 95:1804-1809 (2000)), aspectos de la hipersensibilidad por contacto de tipo retardado y la artritis inducida por colágeno (de Fougères et al., *J. Clin. Invest.*, 105:721-720 (2000); Kriegelstein et al., *J. Clin. Invest.*, 110(12):1773-1782 (2002)), la morfogénesis ductal de glándulas mamarias (Keely et al., *J. Cell Sci.*, 108:595-607 (1995); Zutter et al., *Am. J. Pathol.*, 155(3):927-940 (1995)), la curación de heridas epidérmicas (Pilcher et al., *J. Biol. Chem.*, 272:181457-54 (1997)), y procesos asociados con la angiogénesis inducida por VEGF (Senger et al., *Am. J. Pathol.*, 160(1):195-204 (2002)).

35 La integrinas son heterodímeros formados por una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ , y comprende una gran familia de proteínas que median en la adherencia celular a la matriz extracelular (ECM), así como proteínas plasmáticas, y son fundamentales para algunos tipos de interacciones entre células. Las integrinas interactúan con los componentes de la ECM, a través de sus dominios extracelulares (Pozzi y Zent, *Exp. Nephrol.*, 94:77-84 (2003)). Tras la unión a los ligandos, las integrinas transducen las señales intracelulares al citoesqueleto, que modifica la actividad celular en respuesta a estos acontecimientos de adherencia celular, denominados señalización extracelular ("outside-in signaling") (véase, p. ej., Hemler, *Annu. Rev. Immunol.*, 8:365:365-400 (1999); Hynes, *Cell*, 110(6):673-687 (2002)). Esta señalización también puede activar otros subtipos de integrinas expresados sobre la misma célula, conocidos como señalización intracelular ("inside-out signaling"). La señalización intracelular también se produce a través de señales reguladoras que se originan dentro del citoplasma celular, tales como la interrupción de la conexión entre la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$ , que después se transmiten al dominio de unión al ligando externo del receptor. 40 Las integrinas pueden desempeñar papeles importantes en los acontecimientos de adherencia celular que controlan el desarrollo, la morfogénesis de órganos, la fisiología y la patología, así como la homeostasis de tejidos normales y las respuestas inmunológicas y trombóticas y, además, actúan como detectores ambientales para la célula. Estas proteínas se caracterizan por tener conformación cerrada bajo condiciones normales que, tras la activación, sufren un cambio conformacional rápido que expone el sitio de unión al ligando. La estructura de cristales por rayos X es una herramienta reciente que se ha empleado en el estudio de la estructura de la integrina y los mecanismos de activación. La comprensión de las características estructurales de la integrina facilita un mejor entendimiento de los sitios de unión, los estados diferenciados y sus formaciones activas e inactivas. En general, el sitio de unión para el ligando/contrareceptor para todas las integrinas se encuentra dentro del dominio  $\alpha$  y está formado por un sitio de unión dependiente de iones metálicos, denominado dominio MIDAS (Dembo et al., *J. Biol. Chem.*, 274, 32108-32111 (1988); Feuston et al., *J. Med. Chem.*, 46:5316-5325 (2003); Gadek et al., *Science*, 295(5557):1086-1089 (2002); Gurrath et al., *Eur. J. Biochem.*, 210:911-921 (1992)). En las subunidades  $\alpha$  de las integrinas que se unen al colágeno, que incluyen las integrinas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 10$  y  $\alpha 11$ , el sitio MIDAS está localizado dentro de un dominio insertado extra en el N-terminal conocido como el dominio I, A o I/A, una característica que comparten con las 55

subunidades  $\alpha$  de la familia  $\beta 2$  de leucocitos de las integrinas (Randi y Hogg, J. Biol. Chem., 269: 12395-12398 (1994); Larson et al., J. Cell Biol., 108(2):703-712 (1989); Lee et al., J. Biol. Chem., 269: 12395-12398 (1995); Emsley et al., J. Biol. Chem., 272:28512-28517 (1997), y Cell. 100:47-56 (2000)). Los dominios I son estructuralmente homólogos con el dominio A1 del factor de von Willebrandt, con una topología de plegamiento de Rossmann de seis hebras en lámina  $\beta$ , rodeadas por siete  $\alpha$ -hélices (Colombatti y Bonaldo, Blood, 77(11):2305-2315 (1991); Larson et al., J. Cell Biol., 108(2):703-712 (1989); Emsley et al., J. Biol. Chem., 272:28512-28517 (1997); Nolte et al., FEBS Letters, 452(3):379-385 (1999)). Las integrinas que se unen al colágeno tienen una  $\alpha$ -hélice adicional conocida como hélice  $\alpha C$  (Emsley et al., J. Biol. Chem., 272:28512-28517 (1997), y Cell, 100:47-56 (2000); Nolte et al., FEBS Letters, 452(3):379-385 (1999)).

Las interacciones de integrina/ligando pueden facilitar la extravasación de leucocitos hacia tejidos inflamados (Jackson et al., J. Med. Chem., 40:3359-3368 (1997); Gadek et al., Science, 295(5557):1086-1089 (2002), Sircar et al., Bioorg. Med. Chem., 10:2051-2066 (2002)), y desempeñan un papel en acontecimientos corriente abajo después de la extravasación inicial de los leucocitos desde la circulación hacia tejidos en respuesta a estímulos inflamatorios, que incluyen la migración, el reclutamiento y la activación de células proinflamatorias en el sitio de la inflamación (Eble J.A., Curr. Phar. Des., 11(7):867-880 (2005)). Se ha indicado que algunos anticuerpos que bloquean la integrina  $\alpha 2\beta 1$  muestran un impacto sobre las respuestas de hipersensibilidad retardada y una eficacia en un modelo murino de artritis reumatoide y un modelo de la enfermedad del intestino inflamatoria (Kriegelstein et al., J. Clin. Invest., 110(12):1773-1782 (2002); de Fougères et al., J. Clin. Invest., 105:721-720 (2000)) y se ha indicado que atenúan la proliferación y la migración de células endoteliales *in vitro* (Senger et al., Am. J. Pathol., 160(1):195-204 (2002)), lo cual sugiere que el bloqueo de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  puede prevenir/inhibir la angiogénesis anómala o superior a la normal, según se observa en diversos cánceres.

Las plaquetas normalmente circulan en la sangre en un estado de reposo inactivo, aunque están cebadas para responder con rapidez en sitios de lesiones frente a una amplia variedad de agonistas. Después de la estimulación, sufren cambios en la forma y se convierten en muy reactivas con proteínas plasmáticas, tales como el fibrinógeno y el factor de von Willebrand (vWf), con otras plaquetas y con el revestimiento endotelial de la pared del vaso. Estas interacciones cooperan para facilitar la formación rápida de un tapón homeostático de plaquetas de fibrina (Cramer, 2002, en Hemostasis and Thrombosis, 4ª edición). Tras unirse al ligando, los receptores de las plaquetas transducen las vías de señalización extracelulares que, a su vez, activan la señalización intracelular que produce la activación de receptores secundarios, tales como el receptor de fibrinógeno de plaquetas, la integrina  $\alpha IIb\beta 3$ , lo cual conduce a la agregación de las plaquetas. Se prevé que los anticuerpos o los miméticos de ligandos peptídicos que se unan o interaccionen con los receptores de plaquetas induzcan una cascada de señalización similar que conduzca a la activación plaquetaria. Incluso una pequeña activación de las plaquetas puede producir respuestas trombóticas plaquetarias, trombocitopenia y complicaciones en el sangrado.

La integrina  $\alpha 2\beta 1$  es la única integrina que se une al colágeno que se expresa sobre las plaquetas, y se ha implicado en el desempeño de algún papel en la adherencia de las plaquetas al colágeno y la hemostasis (Gruner et al., Blood, 102:4021-4027 (2003); Nieswandt y Watson, Blood, 102(2):449-461 (2003); Santoro et al., Thromb. Haemost., 74:813-821 (1995); Siljander et al., Blood, 15:1333-1341 (2004); Vanhoorelbeke et al., Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord., 3(2):125-140 (2003)). Además, la  $\alpha 2\beta 1$  de plaquetas puede desempeñar un papel en la regulación del tamaño del agregado plaquetario (Siljander et al., Blood, 103(4):1333-1341 (2004)).

La integrina  $\alpha 2\beta 1$  también ha aparecido como una integrina de unión a laminina expresada sobre células endoteliales (Languino et al., J. Cell Bio., 109:2455-2462 (1989)). Se cree que las células endoteliales se unen a la laminina a través de un mecanismo mediado por integrinas, aunque se ha sugerido que el dominio I de  $\alpha 2$  puede actuar como una secuencia específica de ligando implicada en la mediación de las interacciones de células endoteliales (Bahou et al., Blood, 84(11):3734-3741(1994)).

Se prevé que un anticuerpo terapéutico que se una a la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , que incluyen la integrina  $\alpha 2\beta 1$  sobre las plaquetas, pueda producir complicaciones en el sangrado. Por ejemplo, los anticuerpos que se dirigen a otros receptores plaquetarios, tales como GPIb (Vanhoorelbeke et al., Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord., 3(2):125-140 (2003)) o GP IIb/IIIa (Schell et al., Ann. Hematol., 81:76-79 (2002); Nieswandt y Watson, Blood, 102(2):449-461 (2003); Merlini et al., Circulation, 109:2203-2206 (2004)) se han asociado con la trombocitopenia, aunque los mecanismos subyacentes a esto aún no se comprenden bien. Se ha establecido la hipótesis de que la unión de un anticuerpo a un receptor de plaquetas puede alterar su estructura tridimensional, y exponer epítopos que normalmente no están expuestos, lo cual conduce a la eliminación de las plaquetas (Merlini et al., Circulation, 109:2203-2206 (2004)). En efecto, las complicaciones en el sangrado asociadas con dosis orales de antagonistas de GP IIa/IIIb se han descrito como el "lado oscuro" de esta clase de compuestos (Bhatt y Topol, Nat. Rev. Drug Discov., 2(1): 15-28 (2003)). Si la integrina  $\alpha 2\beta 1$  desempeña un papel importante en el movimiento de los leucocitos a través del tejido inflamatorio, sería deseable desarrollar agentes terapéuticos que pudieran dirigirse a  $\alpha 2\beta 1$  para enfermedades y trastornos asociados con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  y/o procesos celulares asociados con los trastornos, que incluyen cáncer, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias, si estos agentes no activan las plaquetas. Por tanto, en la técnica es necesario el desarrollo de compuestos capaces de dirigirse a la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , tal como la integrina  $\alpha 2\beta 1$  sobre leucocitos, que no estén asociados con complicaciones de sangrado adversas.

El anticuerpo de bloqueo anti-integrina  $\alpha 2\beta 1$  humana BHA2.1 fue descrito por primera vez por Hangan et al., (Cancer Res., 56:3142-3149 (1996)). Se conocen otros anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2\beta 1$ , y se han empleado *in vitro*, tales como los anticuerpos disponibles en el mercado AK7 (Mazurov et al., Thromb. Haemost., 66(4):494-499 (1991)), P1E6 (Wayner et al., J. Cell Biol., 107(5):1881-1891 (1988)), 10G11 (Giltay et al., Blood, 73(5):1235-1241 (1989)) y A2-11E10 (Bergelson et al., Cell Adhes. Commun., 2(5):455-464 (1994)). Hangan et al. (Cancer Res., 56:3142-3149 (1996)) han empleado el anticuerpo BHA2.1 *in vivo* para estudiar los efectos de la función de bloqueo de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  sobre la extravasación de células tumorales humanas en el hígado, y la capacidad de estas células tumorales para desarrollar focos metastásicos tras un tratamiento con anticuerpos. El anticuerpo Ha1/29 (Mendrick y Kelly, Lab Invest., 69(6):690-702 (1993)), que es específico para la integrina  $\alpha 2\beta 1$  de rata y murina, se ha empleado *in vivo* para estudiar la regulación al alza de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  sobre células T después de una activación vírica con LCMV (Andreasen et al., J. Immunol., 171:2804-2811 (2003)), para estudiar las respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado inducidas por SRBC y de hipersensibilidad inducida por contacto inducida por FITC y la artritis inducida por colágeno (de Fougerolles et al., J. Clin. Invest., 105:721-720 (2000)), para estudiar el papel de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  en la angiogénesis inducida por VEGF (Senger et al., Am. J. Pathol., 160(1):195-204 (2002); Senger et al., PNAS, 94(25):13612-13617 (1997)), y para estudiar el papel de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  en la locomoción de PMN en respuesta al factor activador de plaquetas (PAF) (Werr et al., Blood, 95:1804-1809 (2000)).

El uso de anticuerpos monoclonales murinos, tales como los descritos anteriormente, como agentes terapéuticos humanos en pacientes no inmunocomprometidos, se ha visto limitado por las robustas respuestas inmunitarias dirigidas contra los anticuerpos murinos administrados, en particular en la administración repetida. Esta respuesta no solo puede reducir la semivida eficaz del anticuerpo murino en la circulación, sino que también puede conducir a unas respuestas profundas en el sitio de inyección y/o anafilácticas (Shawler et al., J. Immunol., 135(2):1530 (1985)). Además, las funciones efectoras en roedores asociadas con las regiones constantes (Fc) son mucho menos eficaces que sus homólogas humanas cuando se administran a seres humanos, lo cual da como resultado una pérdida de la activación del complemento, potencialmente deseable, y la actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

Así, es necesario el desarrollo de anticuerpos dirigidos contra la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , que incluye el tratamiento de trastornos, mecanismo y procesos celulares asociados con la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , que incluyen enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias. Además, sería deseable desarrollar anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2\beta 1$  que no estén asociados con el desarrollo de una respuesta anti-anticuerpos murinos en un paciente.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Resultados gráficos de estudios de los efectos de un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  sobre la enfermedad parálitica en un modelo EAE de ratón cuando se administra al primer signo de enfermedad (véase el ejemplo 7).

Figura 2: Resultados gráficos de estudios de los efectos de un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  sobre la enfermedad parálitica en un modelo EAE de ratón cuando se administra durante la fase de inducción (véase el ejemplo 7).

### Compendio de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos anti-integrina alfa 2 ( $\alpha 2$ ) y métodos para su uso, especialmente anticuerpos anti-integrina alfa 2 ( $\alpha 2$ ) humanizados y métodos para su uso.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  incluye una o más regiones constantes humanas (p. ej.,  $C_L$  y/o  $C_H$ ) y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 y/o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21, o sus variantes de secuencia de aminoácidos. En la presente memoria se contemplan diversas formas del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  puede ser un anticuerpo de longitud completa (p. ej., que comprende regiones constantes de inmunoglobulina humanas) o un fragmento de anticuerpo (p. ej., fragmentos Fab o  $F(ab')_2$  o Fab' o Fv o scFv). Además, el anticuerpo puede estar marcado con un marcador detectable, estar inmovilizado sobre una fase sólida y/o conjugado con un compuesto heterólogo (tal como un agente citotóxico).

Se contemplan los usos de diagnóstico y terapéuticos para los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$ , así como sus usos profilácticos o preventivos. Para unos usos de diagnóstico, se proporciona un método para determinar la presencia de una proteína integrina  $\alpha 2\beta 1$ , que comprende exponer una muestra sospechosa de contener la proteína integrina  $\alpha 2\beta 1$  a un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ , y determinar la unión del anticuerpo a la muestra. Para este uso, se proporciona un kit que comprende un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  e instrucciones para usar el anticuerpo para detectar la proteína integrina  $\alpha 2\beta 1$ . Los usos terapéuticos incluyen, pero no se limitan al tratamiento de trastornos, mecanismos y procesos celulares asociados con la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , que incluyen enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias, en particular la esclerosis múltiple.

Se contemplan aplicaciones de terapia génica para anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$ . Diversos vectores (p. ej.,

vectores retrovéricos, cromosomas) que codifican la secuencia genética de cadena pesada y ligera anti- $\alpha 2\beta 1$ , pueden trasladarse a células (p. ej., fibroblastos, mastocitos) para generar poblaciones de células que segregan MAb anti- $\alpha 2\beta 1$ . Estas células pueden poseer propiedades de "alojamiento" para diferentes tipos de células, tejidos y/u órganos. Estas células productoras de anticuerpos, a su vez, pueden introducirse en un paciente para la administración localizada del MAb anti- $\alpha 2\beta 1$ . Como ejemplo, células madre mesenquimáticas modificadas con un vector de MAb anti- $\alpha 2\beta 1$  pueden inyectarse en el cerebro de un paciente que padece esclerosis múltiple. Las células madre se diferencian a células neurales y segregan el MAb anti- $\alpha 2\beta 1$  para tratar la inflamación asociada con la esclerosis múltiple. Además, pueden introducirse por vía intravenosa a un paciente productos inmunoconjugados compuestos por complejos de liposoma-anticuerpo anti- $\alpha 2\beta 1$  que encapsulan ácidos nucleicos que codifican genes terapéuticos. El producto inmunoconjugado anti- $\alpha 2\beta 1$  puede unirse a las células que expresan la integrina  $\alpha 2\beta 1$  y facilitar la captación eficaz de los genes terapéuticos.

Además, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ ; un vector que comprende este ácido nucleico, opcionalmente unido operablemente a secuencias control reconocidas por una célula anfitriona transformada con el vector; una célula anfitriona que comprende este vector; un proceso para producir el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  que comprende cultivar la célula anfitriona de modo que se exprese el ácido nucleico y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo del cultivo de células anfitrionas (p. ej., a partir del medio de cultivo de la célula anfitriona). También se proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones para usos terapéuticos pueden ser estériles y pueden estar liofilizadas. También se proporciona un método para tratar un trastorno asociado con una integrina  $\alpha 2\beta 1$ , que comprende administrar a un sujeto una cantidad farmacéutica eficaz de un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ , tal como un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado, al mamífero. Para estos usos terapéuticos, pueden coadministrarse otros agentes (p. ej., otro antagonista de la integrina  $\alpha 2\beta 1$ ) al mamífero antes, después, o al mismo tiempo que el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ .

También se proporciona un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de (a) HCDR2 (VIWARGFTNYNSALMS, SEQ ID NO:2), (b) HCDR1 (GFSLTNYGIH, SEQ ID NO:1), HCDR2 (VIWARGFTNYNSALMS, SEQ ID NO:2) y HCDR3 (ANDGVYYAMDY, SEQ ID NO:3), o (c) SEQ ID NO:40.

En una realización, la región variable de cadena pesada mencionada anteriormente comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:185.

En otra realización, la región variable de cadena pesada mencionada anteriormente comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:185, en la que (a) la posición 71 es Lys, (b) la posición 73 es Asn, (c) la posición 78 es Val, o (d) cualquier combinación de (a)-(c).

En otra realización, la región variable de cadena pesada mencionada anteriormente comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:70-79 y SEQ ID NO:109-111.

En una realización, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  mencionado anteriormente comprende además una región FW4 que comprende la secuencia de aminoácidos WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:13).

En una realización, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  mencionado anteriormente comprende la secuencia de aminoácidos de HCDR1 (SEQ ID NO:1), HCDR2 (SEQ ID NO:2) y HCDR3 (SEQ ID NO:3).

En una realización, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  mencionado anteriormente comprende además una cadena ligera.

En una realización, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  mencionado anteriormente comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de (a) una LCDR1 seleccionada de SANSSVNYIH (SEQ ID NO:4) o SAQSSVNYIH (SEQ ID NO:112), (b) LCDR2 (DTSKLAS; SEQ ID NO:5) y, (c) LCDR3 (QQWTTNPLT, SEQ ID NO:6).

En una realización, la región variable de cadena ligera mencionada anteriormente comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:186.

En una realización, la región variable de cadena ligera mencionada anteriormente comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:186, en la que (a) la posición 2 es Phe, (b) la posición 45 es Lys, (c) la posición 48 es Tyr, o (d) cualquier combinación de (a)-(c).

En una realización, la región variable de cadena ligera mencionada anteriormente comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:80-91 y SEQ ID NO:108.

En una realización, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  mencionado anteriormente comprende además una región 'FW4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGKVEIK del SEQ ID NO:38.

En una realización, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  mencionado anteriormente comprende la secuencia de aminoácidos de LCDR1 (SEQ ID NO:4), LCDR2 (SEQ ID NO:5) y LCDR3 (SEQ ID NO:6)

En una realización, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  mencionado anteriormente comprende además una cadena pesada.

5 La invención proporciona también un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado que comprende también:

(i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de (a) HCDR2 (VIWARGFTNYNSALMS, SEQ ID NO:2), (b) HCDR1 (GFSLTNYGIH, SEQ ID NO:1), HCDR2 (VIWARGFTNYNSALMS, SEQ ID NO:2) y HCDR3 (ANDGVYYAMDY, SEQ ID NO:3), o (c) SEQ ID NO:40; y

10 (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de (a) una LCDR1 seleccionada de SANSSVNYIH (SEQ ID NO:4) o SAQSSVNYIH (SEQ ID NO:112), (b) LCDR2 (DTSKLAS; SEQ ID NO:5) y (c) LCDR3 (QQWTTNPLT, SEQ ID NO:6).

También se proporciona el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado mencionado anteriormente, en el que (a) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:185, (b) la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:186, o (c) ambos (a) y (b).

15 También se proporciona el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado mencionado anteriormente, en el que (i) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:185, en la que (a) la posición 71 es Lys, (b) la posición 73 es Asn, (c) la posición 78 es Val, o (d) cualquier combinación de (a)-(c); (ii) la región variable de cadena ligera pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:186, en la que (a) la posición 2 es Phe, (b) la posición 45 es Lys, (c) la posición 48 es Tyr, o (d) cualquier combinación de (a)-(c); o (iii) ambos (i) y (ii).

20

También se proporciona el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado mencionado anteriormente, en el que (a) la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:70-79 y SEQ ID NO: 109-111; (b) la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:80-92 y SEQ ID NO:108; o (c) ambos (a) y (b).

25 En una realización, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  mencionado anteriormente reconoce el dominio I de la integrina  $\alpha 2$  humana.

En una realización, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  mencionado anteriormente se une a la integrina  $\alpha 2\beta 1$ .

En una realización, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  mencionado anteriormente se une a un epítipo de la integrina  $\alpha 21$ , comprendiendo dicho epítipo:

30 (a) un residuo de Lys que se corresponde con la posición 192 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:8, o la posición 40 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:11;

35 (b) un residuo de Asn que se corresponde con la posición 225 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:8, o la posición 73 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:11;

(c) un residuo de Gln que se corresponde con la posición 241 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:8, o la posición 89 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:11;

40 (d) un residuo de Tyr que se corresponde con la posición 245 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:8, o la posición 93 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:11;

(e) un residuo de Arg que se corresponde con la posición 317 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:8, o la posición 165 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:11;

45 (f) un residuo de Asn que se corresponde con la posición 318 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:8, o la posición 166 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:11; o

(g) cualquier combinación de (a) a (f).

50 También se proporciona un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ , en el que el anticuerpo se une a un epítipo de integrina  $\alpha 2$ , comprendiendo dicho epítipo:

(a) un residuo de Lys que se corresponde con la posición 192 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:8, o la posición 40 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:11;

5 (b) un residuo de Asn que se corresponde con la posición 225 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:8, o la posición 73 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:11;

(c) un residuo de Gln que se corresponde con la posición 241 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:8, o la posición 89 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:11;

10 (d) un residuo de Tyr que se corresponde con la posición 245 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:8, o la posición 93 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:11;

15 (e) un residuo de Arg que se corresponde con la posición 317 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:8, o la posición 165 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:11;

(f) un residuo de Asn que se corresponde con la posición 318 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:8, o la posición 166 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de la integrina  $\alpha 2$  indicada en SEQ ID NO:11; o

(g) cualquier combinación de (a) a (f).

20 En una realización, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  umanizado mencionado anteriormente es un anticuerpo de longitud completa.

En una realización, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado mencionado anteriormente es un fragmento de anticuerpo.

25 En una realización, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado mencionado anteriormente está unido a un marcador detectable.

En una realización, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado mencionado anteriormente está inmovilizado sobre una fase sólida.

En una realización, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado mencionado anteriormente inhibe la unión de la integrina  $\alpha 2$  o  $\alpha 2\beta 1$  a un ligando de integrina  $\alpha 2\beta 1$ .

30 En una realización, el ligando de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  mencionado anteriormente se selecciona de colágeno, laminina, ecovirus-1, decorina, E-cadherina, metaloproteínasa de matriz I (MMP-I), endorrepelina, colectina y la proteína del complemento C1q.

35 La invención proporciona también un método para determinar si una muestra contiene la integrina  $\alpha 2$ , la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , o ambas, que comprende poner en contacto la muestra con el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado mencionado anteriormente, y determinar si el anticuerpo se une a la muestra, siendo dicha unión una indicación de que la muestra contiene la integrina  $\alpha 2$ , la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , o ambas.

La invención proporciona también un kit que comprende el anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado mencionado anteriormente, y opcionalmente contiene además instrucciones para su uso para detectar una proteína integrina  $\alpha 2$  o  $\alpha 2\beta 1$ .

40 La invención proporciona también un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado mencionado anteriormente.

La invención proporciona también un vector que comprende el ácido nucleico mencionado anteriormente.

La invención proporciona también una célula anfitriona que comprende el ácido nucleico o el vector mencionados anteriormente.

45 La invención proporciona también un proceso para producir un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado, que comprende cultivar la célula anfitriona mencionada anteriormente bajo condiciones que permiten la expresión del anticuerpo. En una realización, el método comprende además recuperar el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la célula anfitriona. En otra realización, el método comprende además recuperar el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado del medio de cultivo de la célula anfitriona.

La invención proporciona también un método de selección que comprende: detectar la unión de una integrina  $\alpha 2$  o  $\alpha 2\beta 1$  a un anticuerpo que comprende la región VL de SEQ ID NO:19 y la región VH de SEQ ID NO:21, en presencia, frente a la ausencia, de un anticuerpo de ensayo, y seleccionar el anticuerpo de ensayo si su presencia se correlaciona con una menor unión de la integrina  $\alpha 2$  o  $\alpha 2\beta 1$  al anticuerpo que comprende la región VL de SEQ ID NO:19 y la región VH de SEQ ID NO:21. En una realización la integrina  $\alpha 2$  o  $\alpha 2\beta 1$  se inmoviliza sobre un soporte sólido.

La invención proporciona también un método de selección que comprende: detectar la unión de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  al colágeno en presencia de un anticuerpo de ensayo, en el que el anticuerpo de ensayo es un anticuerpo que se une a un dominio I de  $\alpha 2$ ; detectar la unión del anticuerpo de ensayo al dominio I de  $\alpha 2$  en presencia de iones  $Mg^{++}$ ; detectar la unión del anticuerpo de ensayo al dominio I de  $\alpha 2$  en presencia de iones  $Ca^{++}$ ; detectar la unión del anticuerpo de ensayo al dominio I de  $\alpha 2$  en presencia de un medio sin cationes; y seleccionar el anticuerpo de ensayo si inhibe la unión de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  al colágeno y se une al dominio I de  $\alpha 2$  en presencia de iones  $Mg^{++}$  e iones  $Ca^{++}$  y medio sin cationes.

La invención proporciona también una composición que comprende el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado mencionado anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona también un método para tratar un trastorno asociado a la integrina  $\alpha 2\beta 1$  en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  o la composición mencionados anteriormente.

La invención proporciona también un método para inhibir la unión de leucocitos al colágeno, que comprende administrar a un sujeto una cantidad del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2\beta 1$  mencionado anteriormente eficaz para inhibir la unión de los leucocitos al colágeno.

La invención proporciona también el uso del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado mencionado anteriormente como medicamento.

La invención proporciona también el uso del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado o la composición mencionados anteriormente para el tratamiento de un trastorno asociado con la integrina  $\alpha 2\beta 1$ .

La invención proporciona también el uso del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado o la composición mencionados anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado con la integrina  $\alpha 2\beta 1$ .

La invención proporciona también una composición para el tratamiento de un trastorno asociado con la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , comprendiendo dicha composición el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado mencionado anteriormente, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona también un envase que comprende el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado o la composición mencionados anteriormente, junto con instrucciones para el tratamiento de un trastorno asociado con la integrina  $\alpha 2\beta 1$ .

En unas realizaciones, el trastorno asociado con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  se selecciona de una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria, y una enfermedad caracterizada por una angiogénesis anómala o aumentada.

En unas realizaciones, el trastorno asociado con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  se selecciona de enfermedad del intestino inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, reacciones a transplantes, neuritis óptica, traumatismo de la médula espinal, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), diabetes mellitus, esclerosis múltiple, síndrome de Reynaud, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, síndrome de Sjorgen, escleroderma, diabetes de inicio juvenil, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedades cardiovasculares, psoriasis, cáncer, así como infecciones que inducen una respuesta inflamatoria.

En unas realizaciones, el trastorno asociado con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  se selecciona de esclerosis múltiple (p. ej., caracterizada por recaídas, tratamiento agudo, tratamiento retrasado), artritis reumatoide, neuritis óptica y traumatismo de la médula espinal.

En unas realizaciones, el método mencionado anteriormente no está asociado con (a) la activación de plaquetas, (b) la agregación de plaquetas, (c) un disminución en el recuento de plaquetas en la circulación, (d) complicaciones en el sangrado, o (e) cualquier combinación de (a) a (d).

En una realización, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  mencionado anteriormente comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO:174 o SEQ ID NO:176, y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO:178.

En una realización, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  mencionado anteriormente inhibe competitivamente la

unión de un anticuerpo que comprende la región UL de SEQ ID NO:19 y la región VH de SEQ ID NO:21 con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  humana o su dominio I.

En una realización, el método mencionado anteriormente está asociado con el alivio de un brote o de secuelas neurológicas asociadas con la esclerosis múltiple.

5 En una realización, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  mencionado anteriormente inhibe la unión de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  al colágeno y no es un mimético de ligando.

También se proporciona un método dirigir un residuo, tal como una molécula, proteína, ácido nucleico, vector, composición, complejo, etc., a un sitio que se caracteriza por la presencia de un ligando de integrina  $\alpha 2\beta 1$ , comprendiendo dicho método unir o ligar el residuo al anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado mencionado anteriormente.

También se proporciona un epítipo de integrina  $\alpha 2$  que se une a un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ , en el que el epítipo no comprende el sitio de unión al ligando de la integrina  $\alpha 2$ . En unas realizaciones, la unión al epítipo no está asociada con (a) la activación de plaquetas, (b) la agregación de plaquetas, (c) una disminución en el recuento de plaquetas en la circulación, (d) complicaciones en el sangrado, (e) la activación de la integrina  $\alpha 2$ , o (f) cualquier combinación de (a) a (e).

Los anticuerpos preferidos se unen al dominio I de la integrina  $\alpha 2\beta 1$ . En particular, los anticuerpos preferidos son capaces de bloquear la adherencia dependiente de  $\alpha 2$  de células a la matriz extracelular (ECM), en particular al menos a uno o ambos de colágeno y laminina. Se proporcionan anticuerpos humanizados, que incluyen anticuerpos basados en un anticuerpo denominado en la presente TMC-2206. Se proporcionan anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  que son muy específicos para la integrina  $\alpha 2\beta 1$  humana, y cuya administración no está asociada con efectos indeseables, tales como complicaciones en el sangrado o complicaciones debidas a la activación celular. La especificidad de unión (p. ej., la especificidad de epítipo) de estos anticuerpos está asociada con su perfil no hemorrágico inesperado.

El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2\beta 1$  humanizado puede tener una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de HCDR1 (GFSLTNYGIH; SEQ ID NO:1) y/o HCDR2 (VIWARGFTNYSALMS; SEQ ID NO:2) y/o HCDR3 (ANDGVYYAMDY; SEQ ID NO:3). El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2\beta 1$  humanizado puede tener una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de LCDR1 (SANSSVNYIH; SEQ ID NO:4 o SAQSSVNYIH; SEQ ID NO:112) y/o LCDR2 (DTSKLAS; SEQ ID NO:5) y/o LCDR3 (QQWTTNPLT; SEQ ID NO:6). En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2\beta 1$  humanizados tienen una cadena pesada que comprende HCDR1 (GFSLTNYGIH; SEQ ID NO:1) y/o HCDR2 (VIWARGFTNYSALMS; SEQ ID NO:2) y/o HCDR3 (ANDGVYYAMDY; SEQ ID NO:3) y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de LCDR1 (SANSSVNYIH; SEQ ID NO:4) y/o LCDR2 (DTSKLAS; SEQ ID NO:5) y/o LCDR3 (QQWTTNPLT; SEQ ID NO:6). En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una variante de secuencia de aminoácidos de una o más de estas CDR, y dicha variante comprende una o más inserciones de aminoácidos dentro o adyacentes a un residuo de CDR y/o una o más deleciones dentro o adyacentes a un residuo de CDR y/o una o más sustituciones de residuos de CDR (siendo dicha una o más sustituciones el tipo preferido de alteración de aminoácidos para generar dichas variantes).

### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos específicamente reactivos con la integrina alfa 2 ( $\alpha 2$ ) humana, que incluyen anticuerpos humanizados, y métodos para su uso. Los anticuerpos humanizados pueden tener regiones de marco (RW) humanas y regiones determinantes de la complementariedad procedentes de un anticuerpo no humano, generalmente un ratón, que sean específicamente reactivas con la integrina  $\alpha 2$  humana. Se proporcionan secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos de cadena pesada y ligera y secuencias de aminoácidos que comprenden las comprenden. En realizaciones preferidas, una o más de las regiones CDR se obtienen o se basan en el anticuerpo murino segregado por el clon de hibridoma BHA2.1 (denominado en la presente memoria anticuerpo TMC-2206). También se proporcionan anticuerpos que tienen propiedades de unión similares y anticuerpos (u otros antagonistas) que tienen una funcionalidad similar a los anticuerpos descritos en la presente memoria. Los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  preferidos incluyen los que (a) se unen al dominio I de la integrina  $\alpha 2$ , (b) inhiben la función de la integrina  $\alpha 2$  (p. ej., la unión al colágeno o a la laminina), (c) se unen a la integrina  $\alpha 2$  sobre plaquetas en reposo sin inducir la activación de las plaquetas, y (d) reconocen el epítipo de unión de TMC-2206 (p. ej., compiten con el TMC-2206 por la unión a la integrina  $\alpha 2$ ). Estos anticuerpos pueden unirse preferentemente a la conformación inactiva o cerrada de la molécula de integrina  $\alpha 2$  diana sin competir por el sitio de unión al ligando. Las ventajas inesperadas de los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$ , según se describen en la presente, que se unen preferentemente a la conformación cerrada de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  y/o se unen a la integrina  $\alpha 2\beta 1$  sin competir por el sitio de unión al ligando (p. ej., no son un mimético de ligando) incluyen la prevención de la activación potencial de las plaquetas, la agregación plaquetaria, la disminución en el recuento de plaquetas en la circulación y/o complicaciones en el sangrado en un sujeto tratado.

Las “complicaciones en el sangrado”, según se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier efecto adverso sobre los niveles y la fisiología de la sangre, que incluyen las respuestas trombóticas de las plaquetas, trombocitopenia, mayor tiempo hasta la coagulación, mayor tiempo de sangrado y pérdida de sangre que limiten el uso terapéutico del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ .

5 La integrina  $\alpha 2\beta 1$  es una molécula formada por una subunidad de integrina  $\alpha 2$  (véase, p. ej., SEQ ID NO:7 para la secuencia de ADN, y SEQ ID NO:8 para la secuencia de proteína de la  $\alpha 2$  humana) de la familia de las integrinas alfa, y una subunidad de integrina  $\beta 1$  (véase, p. ej., SEQ ID NO:9 para la secuencia de ADN, y SEQ ID NO:10 para la secuencia de proteína de la  $\beta 1$  humana) de la familia de las integrinas beta, y pueden proceder de cualquier sujeto, que incluye un mamífero, pero preferiblemente proceden de un ser humano. La integrina  $\alpha 2\beta 1$  puede purificarse a partir de cualquier fuente natural, o puede producirse de modo sintético (p. ej., empleando la tecnología del ADN recombinante). Las secuencias codificantes de ácidos nucleicos para la integrina  $\alpha 2$  y la integrina  $\beta 1$  se describen en Takada y Hemler, J. Cell Biol., 109(1):397-407 (1989; GenBank Núm. de registro X17033; posteriormente actualizada para la entrada NM 002203), y Argraves, W.S, J. Cell. Biol., septiembre, 105(3):1183-1190 (1987; Genbank Núm. de registro X07979.1 y las secuencias relacionadas que representan los variantes de corte y empalme alternativo), respectivamente.

El dominio “I” de la molécula de integrina  $\alpha 2\beta 1$  se refiere a una región de la molécula de integrina  $\alpha 2\beta 1$  dentro de la subunidad  $\alpha 2$ , y se describe, por ejemplo, en Kamata et al., J Biol. Chem., 269:9659-9663(1994); Emsley et al., J. Biol. Chem., 272:28512 (1997) y Cell, 101:47 (2000). La secuencia de aminoácidos de un dominio I humano de integrina  $\alpha 2$  se muestra en SEQ ID NO:11 (véase también, por ejemplo, SEQ ID NO:107). El dominio I de la integrina  $\alpha 2$  contiene un sitio de unión al ligando de tipo MIDAS (Metal Ion Dependant Adhesion Site, sitio de adherencia dependiente de iones metálicos) que tiene un requisito y una especificidad para un catión divalente concreto para apoyar la unión al ligando. Las secuencias de aminoácidos para un dominio I de una integrina  $\alpha 2$  en rata se muestran en SEQ ID NO:93 (véase también, por ejemplo, SEQ ID NO:113) y en ratón se muestran en SEQ ID NO:94 (véase también, por ejemplo, SEQ ID NO:114) y aparecen en la tabla 28. Las secuencias del dominio I de mono cynomolgus y mono rhesus se clonaron a partir de la fracción leucocitaria derivada de sangre completa, y se indican en SEQ ID NO:103 (ADN), SEQ ID NO:171 (aminoácidos) para mono cynomolgus, y en SEQ ID NO:104 (ADN) y SEQ ID NO:172 (aminoácidos) para mono rhesus, respectivamente.

Un epítipo de TMC-2206 (BHA2.1) se refiere a una región del dominio I de la integrina  $\alpha 2$  humana a la cual se une el anticuerpo TMC-2206. Este epítipo abarca una región que incluye los residuos de aminoácidos K40, N73, Q89, Y93, R165, y N166 y, opcionalmente otros residuos de aminoácido del dominio I de integrina  $\alpha 2$ .

Un trastorno asociado a la integrina  $\alpha 2$  se refiere a un trastorno, enfermedad o afección que implica a una función/ procesos dependientes de integrina  $\alpha 2$  (p. ej., unión, actividad) que median reacciones celulares aberrantes dentro del tejido diana. Los ejemplos de procesos dependientes de integrina  $\alpha 2$  implicados en enfermedades incluyen respuestas celulares dependientes del colágeno, tales como las implicadas en aumentos en la expresión y la proliferación de citoquinas, aspectos de la función de células T, mastocitos y neutrófilos, trastornos inflamatorios, morfogénesis ductal de glándulas mamarias, curación de heridas epidérmicas y angiogénesis. Los ejemplos de trastornos asociados a la integrina  $\alpha 2$  incluyen, pero no se limitan a enfermedades o trastornos inflamatorios que incluyen, pero no se limitan a enfermedad inflamatoria intestinal (tal como enfermedad de Crohn, y colitis ulcerosa), reacciones a transplantes (que incluye rechazo a transplantes), neuritis óptica, traumatismo de la médula espinal, artritis reumatoide, esclerosis múltiple (que incluye el tratamiento de secuelas neurológicas asociadas con esta, así como la esclerosis múltiple caracterizada por recaídas), enfermedades o trastornos autoinmunológicos (que incluyen lupus eritematoso sistémico (SLE), diabetes mellitus, síndrome de Reynaud, encefalomielititis autoinmunitaria experimental, síndrome de Sjorgen, escleroderma), diabetes de inicio juvenil, y trastornos asociados con una angiogénesis anómala o mayor que la normal (tales como retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedades cardiovasculares, psoriasis, artritis reumatoide y cáncer), así como infecciones que inducen una respuesta inflamatoria.

El tratamiento de un trastorno asociado con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  se refiere al uso terapéutico y al uso profiláctico o preventivo de los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  descritos en la presente memoria. Aquellos que necesitan un tratamiento incluyen los que ya han sido diagnosticados con el trastorno, así como aquellos en los que la aparición del trastorno debe prevenirse o retrasarse.

Un mamífero, que incluye para el objetivo de un tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, que incluye seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales en zoológicos, deportivos o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

La dosificación intermitente o periódica des una dosificación que es continua durante un cierto periodo de tiempo y que se produce en intervalos regulares que están separados entre sí preferiblemente por más de un día.

Los términos anticuerpo o inmunoglobulina se utilizan en su sentido más amplio, y abarcan anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos, y fragmentos de anticuerpos con la condición de que muestren la actividad biológica deseada. Los

fragmentos de anticuerpos comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, en general una de sus regiones de unión al antígeno o variables. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios, anticuerpos de un solo dominio (p. ej., procedentes de camélidos), anticuerpos de un solo dominio de NAR de tiburón, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos también pueden referirse a residuos de unión que comprenden CDR o dominios de unión al antígeno que incluyen, pero no se limitan a regiones VH (V<sub>H</sub>, V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>), anticalinas, PepBodies™, fusiones de epítipo de células T-anticuerpo (troyacuerpos) o pepticuerpos.

Un anticuerpo monoclonal se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, por ejemplo, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que puedan estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico. Además, por constaste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (p. ej., policlonales), que generalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (p. ej., epítopos) sobre un antígeno, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra al menos un único determinante sobre el antígeno. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que ha sido obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe considerar que el anticuerpo deba producirse mediante un método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante el método del hibridoma, que fue descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o puede prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., la patente de los Estados Unidos Núm. 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse a partir de bancos de anticuerpos de fagos, por ejemplo, empleando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991), y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse empleando las técnicas descritas en las Patentes de EEUU Núms. 6.025.155 y 6.077.677, así como en las publicaciones de solicitudes de patente de los Estados Unidos Núm. 2002/0160970 y 2003/0083293 (véase también, por ejemplo, Lindenbaum, et al., *Nucleic Acids Research*, 32 (21):0177 (2004)).

Los anticuerpos monoclonales también incluyen anticuerpos quiméricos en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de una especie concreta o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo concreta, mientras que el resto de la cadena o cadenas son idénticas u homólogas a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, con la condición de que muestren la actividad biológica deseada (véase, p. ej., la patente de los Estados Unidos Núm. 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984) para anticuerpos quiméricos de ratón-humano).

Una región hipervariable se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende los residuos de aminoácido procedentes de una región determinante de la complementariedad o CDR (p. ej., los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera, y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o los residuos procedentes de un bucle hipervariable (p. ej., los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera, y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)). Los residuos de marco o FR son los residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable. Para los anticuerpos descritos en la presente memoria, las regiones CDR y de marco se identifican basándose en el sistema de numeración de Kabat, excepto que la CDR1 de la cadena pesada se define mediante la definición de AbM de Oxford Molecular y abarca los residuos 26 a 35. El soporte lógico de formación de modelos de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (<http://people.cryst.cck.ac.uk/~ubc07s/>) (Martin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9268-9272 (1989); Martin et al., *Methods Enzymol.*, 203, 121-153 (1991); Pedersen et al., *Immunomethods*, 1, 126 (1992); y Rees et al., en Sternberg M.J.E. (ed.), *Protein Structure Prediction*. Oxford University Press, Oxford, 141-172) (1996)) combina los sistemas de numeración de la región CDR de Kabat y de la región hipervariable de Chothia para definir las CDR.

Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) pueden ser anticuerpos quiméricos que contienen secuencias mínimas derivadas de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor o aceptor) en las que los residuos de la región hipervariable del receptor están reemplazados por los residuos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tengan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. Además, residuos individuales o grupos de residuos de la región de marco (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana pueden ser reemplazados por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más la actuación del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y generalmente dos, dominios o regiones variables, en las que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos

una porción de una región constante de inmunoglobulina (p. ej., Fc), generalmente de una inmunoglobulina humana (véase, p. ej., Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029 (1989), y Foote y Winter, J. Mol. Biol., 224:487 (1992)).

5 Los fragmentos de anticuerpos Fv monocatenarios o scFv pueden comprender las regiones o dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En general, el polipéptido Fv comprende también un conector polipeptídico entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno (para un análisis, véase, p. ej., Pluckthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994)).

10 Un diacuerpo se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, y estos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) en la misma cadena polipeptídica (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>). Empleando un conector que sea demasiado corto como para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a que los dominios se apareen con los dominios complementarios de otra cadena y se crean dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más a fondo, por ejemplo, en el documento EP 404,097; el documento WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

Los anticuerpos lineales se refieren a anticuerpos, tales como los descritos en Zapata et al., Protein Eng., 8(10):1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden una pareja de segmentos Fd en tándem (V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>) que forman una pareja de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

20 Un anticuerpo aislado se refiere a un anticuerpo que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podría interferir con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo estará purificado (1) hasta más del 95% en peso del anticuerpo, determinado mediante el método de Lowry, y más preferiblemente más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras empleando tinción con azul de Coomassie o, preferiblemente, de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, normalmente el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

30 Un anticuerpo marcado con epítipo se refiere a un anticuerpo en el que el anticuerpo de la invención está fusionado a una etiqueta epitópica. El polipéptido de la etiqueta epitópica tiene los residuos suficientes como para proporcionar un epítipo contra el cual puede fabricarse un anticuerpo, pero es lo suficientemente corto como para no interferir en la actividad del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2\beta 1$ . La etiqueta epitópica preferiblemente es suficientemente exclusiva para que el anticuerpo contra ella no presente sustancialmente reacción cruzada con otros epítopos. Los polipéptidos de las etiquetas adecuadas en general tienen al menos 6 residuos de aminoácido y habitualmente tienen entre aproximadamente 8-50 residuos de aminoácido (preferiblemente entre aproximadamente 9-30 residuos). Los ejemplos incluyen el polipéptido marcador HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field et al., Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)); la etiqueta c-myc y sus anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 (Evan et al., Mol. Cell. Biol., 5(12):3610-3616 (1985)); y la etiqueta de glicoproteína D del virus del herpes simple (gD) y su anticuerpo (Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6): 547-553 (1990)). En ciertas realizaciones, la etiqueta epitópica es un epítipo de unión al receptor de reciclaje, que es un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (p. ej., IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, o IgG<sub>4</sub>) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

45 Un agente citotóxico se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. Puede incluir isótopos radiactivos (p. ej., <sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>90</sup>Y y <sup>186</sup>Re), agentes quimioterapéuticos, y toxinas, tales como las toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o sus fragmentos. Un agente no citotóxico se refiere a una sustancia que no inhibe ni evita la función de las células y/o no provoca la destrucción de las células. Un agente no citotóxico puede incluir un agente que se activa para convertirse en citotóxicos. Un agente no citotóxico puede incluir una esfera, liposoma, matriz o partícula (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos 2003/0028071 y 2003/0032995). Estos agentes pueden estar conjugados, acoplados, unidos o asociados con un anticuerpo anti- $\alpha 2\beta 1$  integrina, según se describe en la presente memoria.

55 Un agente quimioterapéutico se refiere a un compuesto químico útil para el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a adriamicina, doxorubicina, 5-fluorouracilo, citosina arabinósido ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, taxótero (docetaxel), busufano, citoxina, taxol, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (véase la patente de los Estados Unidos Núm. 4.675.187), melfalán y otras mostazas nitrogenadas relacionadas.

Un profármaco se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxico para las células tumorales comparado con el fármaco de origen, y que es capaz de ser enzimáticamente activado o convertido en la forma de origen más activa (véase, p. ej., Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986); y Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos incluyen, pero no se limitan a profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen  $\beta$ -lactamas, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida, o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, t-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma de profármaco pueden ser los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Una marca se refiere a un compuesto o composición detectable que está conjugado o acoplado directa o indirectamente al anticuerpo. La marca en sí misma puede ser detectable (p. ej., marcas radioisotópicas o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que sea detectable.

Una fase sólida se refiere a una matriz no acuosa a la cual el anticuerpo de la presente invención puede adherirse. Los ejemplos de fases sólidas incluidas en la presente memoria incluyen las formadas total o parcialmente de vidrio (p. ej., vidrio de tamaño de poro controlado), polisacáridos (p. ej., agarosa), poli(acrilamidas, poliestireno, poli(alcohol vinílico) y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (p. ej., una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tal como las descritas en la patente de los Estados Unidos Núm. 4.275.149.

Un liposoma se refiere a una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para el transporte de un fármaco (tal como los anticuerpos de la invención y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico) a un mamífero. Los componentes del liposoma normalmente están dispuestos en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas.

Una molécula de ácido nucleico aislada se refiere a una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está normalmente asociada en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta de la forma o del emplazamiento en que se encuentra en la naturaleza. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el anticuerpo en las que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente que las de las células naturales.

Un vector vírico se refiere a un vehículo para la transferencia de un ácido nucleico (p. ej., ADN o ARN) a las células mediante transducción o infección vírica. Los ejemplos de vectores víricos incluyen retrovirus, adenovirus, poxvirus y baculovirus.

Un vector no vírico se refiere a un vehículo de ácido nucleico tal como un CAN, plásmido o cromosomas que se transportan a las células mediante métodos no víricos, tales como electroporación, inyecciones y transfección mediada por reactivos catiónicos.

Las secuencias de control de la expresión se refieren a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operablemente en un organismo anfitriona concreto. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión a ribosomas. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y intensificadores.

Un ácido nucleico está unido operablemente cuando están colocado en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un ADN para una presecuencia o líder de la secreción está unido operablemente al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador está unido operablemente a una secuencia codificadora si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está unido operablemente a una secuencia codificadora si está colocado de modo que facilite la traducción. En general, las secuencias de ADN unidas operablemente son contiguas y, en el caso de un líder de la secreción, son contiguas y están en fase de lectura. Sin embargo, los intensificadores no deben ser necesariamente contiguos. La unión se logra mediante acoplamiento en sitios de restricción convenientes. Si estos sitios no existen, se emplean conectores o adaptadores oligonucleotídicos sintéticos según la práctica convencional.

Otro aspecto de la presente invención es el tratamiento de trastornos asociados a la  $\alpha 2\beta 1$  integrina mediante la administración a un sujeto de una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti- $\alpha 2$  integrina de la invención. Los métodos adecuados para la administración incluyen métodos de terapia génica (véase

a continuación).

Un ácido nucleico de la invención puede transportarse a las células *in vivo* utilizando métodos tales como la inyección directa de ADN, la captación de ADN mediada por receptores, la transfección medida por virus o la transfección no vírica y la transfección basada en lípidos, todas las cuales pueden implicar el uso de vectores de terapia génica. La inyección directa se ha empleado para introducir ADN desnudo en células *in vivo* (véase, p. ej., Acsadi et al. (1991), *Nature* 332:815-818; Wolff et al. (1990), *Science*, 247:1465-1468). Puede emplearse un aparato de transporte (p. ej., una "pistola de genes") para inyectar ADN en células *in vivo*. Este aparato puede adquirirse en el mercado (p. ej., en BioRad). También puede introducirse ADN desnudo en las células formando un complejo del ADN con un catión, tal como polilisina, que se acopla a un ligando para un receptor de la superficie celular (véase, p. ej., Wu, G. y Wu, C. H. (1988), *J. Biol. Chem.*, 263:14621; Wilson et al. (1992), *J. Biol. Chem.*, 267:963-967; y la patente de los Estados Unidos Núm. 5.166.320). La unión del complejo de ADN-ligando al receptor puede facilitar la captación del ADN mediante endocitosis mediada por receptores. Puede emplearse un complejo de ADN-ligando unido a cápsidas de adenovirus que alteran los endosomas, liberando con ello el material hacia el citoplasma, para evitar la degradación del complejo por los lisosomas intracelulares (véase, p. ej., Curiel et al. (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8850; Cristiano et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2122-2126).

Los retrovirus defectuosos están bien caracterizados para su uso como vectores de terapia génica (para un análisis véase Miller, A. D. (1990), *Blood* 76:271). Los protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células *in vitro* o *in vivo* con estos virus pueden encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F. M. et al. (eds.), Greene Publishing Associates, (1989), secciones 9.10-9.14 y otros manuales de laboratorio convencionales. Los ejemplos de estos retrovirus incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM, que son muy conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de líneas de virus encapsulantes incluyen .psi.Crip, .psi.Cre, .psi.2 and .psi.Am. Los retrovirus se han empleado para introducir una diversidad de genes en muchos tipos celulares diferentes, que incluyen células epiteliales, células endoteliales, linfocitos, mioblastos, hepatocitos, células de médula ósea, *in vitro* y/o *in vivo* (véase, p. ej., Eglitis, et al. (1985), *Science* 230:1395-1398; Danos y Mulligan (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:6460-6464; Wilson et al. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:3014-3018; Armentano et al. (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6141-6145; Huber et al. (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8039-8043; Ferry et al. (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991), *Science* 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:7640-7644; Kay et al. (1992), *Human Gene Therapy*, 3:641-647; Dai et al. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10892-10895; Hwu et al. (1993), *J. Immunol.*, 150:4104-4115; patente de los Estados Unidos Núm. 4.868.116; patente de los Estados Unidos Núm. 4.980.286; solicitud PCT WO 89/07136; solicitud PCT WO 89/02468; solicitud PCT WO 89/05345; y solicitud PCT WO 92/07573).

Para su uso como vector de terapia génica, el genoma de un adenovirus puede manipularse de modo que codifique y exprese un compuesto de ácido nucleico de la invención, pero que esté inactivado en términos de su capacidad para replicarse en un ciclo de vida vírico lítico normal. véase, p. ej., Berkner et al. (1988), *BioTechniques*, 6:616; Rosenfeld et al. (1991), *Science*, 252:431-434; y Rosenfeld et al. (1992), *Cell*, 68:143-155. Los vectores adenovíricos adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad de tipo 5 dl324 u otras cepas de adenovirus (p. ej., Ad2, Ad3, Ad7 etc.) son muy conocidos por los expertos en la técnica. Los adenovirus recombinantes son ventajosos porque no requieren de células en división para ser vehículos de transporte de genes eficaces y pueden emplearse para infectar una amplia variedad de tipos celulares, que incluyen el epitelio de las vías respiratorias (Rosenfeld et al. (1992), citado *supra*), las células endoteliales (Lemarchand et al. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:6482-6486)), los hepatocitos (Herz y Gerard (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2812-2816) y las células musculares (Quantin et al. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2581-2584).

Pueden emplearse los virus adenoasociados (AAV) como vector de terapia génica para el transporte de ADN para fines de terapia génica. El AAV es un virus defectuoso natural que requiere de otro virus, tal como un adenovirus o un herpes virus, como virus auxiliar para una replicación eficaz y un ciclo de vida productivo (Muzyczka et al., *Curr. Topics in Micro. and Immunol.* (1992), 158:97-129). El AAV puede emplearse para integrar ADN en células que no están en división (véase, p. ej., Flotte et al. (1992), *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 7:349-356; Samulski et al. (1989), *J. Virol.*, 63:3822-3828; y McLaughlin et al. (1989), *J. Virol.*, 62:1963-1973). Un vector de AAV, tal como el descrito en Tratschin et al. (1985), *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260, puede emplearse para introducir ADN en células (véase, p. ej., Hermonat et al. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470; Tratschin et al. (1985), *Mol. Cell. Biol.*, 4:2072-2081; Wondisford et al. (1988), *Mol. Endocrinol.*, 2:32-39; Tratschin et al. (1984), *J. Virol.*, 51:611-619; y Flotte et al. (1993), *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790). También pueden adaptarse vectores de terapia génica lentivíricos para su uso en la invención.

Los métodos generales para la terapia génica son conocidos en la técnica. véase, p. ej., la patente de los Estados Unidos Núm. 5.399.346 de Anderson et al. Una cápsula biocompatible para transportar material genético se describe en la publicación PCT WO 95/05452 de Baetge et al. También se han descrito previamente métodos de transferencia de genes hacia células hematopoyéticas (véase Clapp, D. W., et al., *Blood*, 78: 1132-1139 (1991); Anderson, *Science*, 288:627-629 (2000); y Cavazzana-Calvo et al., *Science*, 288:669-672 (2000)).

Célula, línea celular y cultivo celular a menudo se emplean de modo intercambiable y todas estas denominaciones incluyen su progenie. Los transformantes y células transformadas (p. ej., obtenidos mediante

transfección, transformación o transducción de ácidos nucleicos, vectores, virus, etc.) incluyen la célula primaria en cuestión y los cultivos derivados de ella independientemente del número de transferencias. También se entiende que toda la progenie no tiene por qué ser exactamente idéntica en su contenido en ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la progenie mutante que tenga la misma función o actividad biológica, según se seleccionó en la célula originariamente transformada. Cuando se pretenda una denominación diferenciada se indicará claramente en el contexto.

En la presente memoria se describen anticuerpos humanizados que incluyen anticuerpos que tienen marcos de región variable derivados de una molécula de anticuerpo aceptora humana, secuencias hipervariables o de CDR procedentes de un anticuerpo murino donante, y regiones constantes, si están presentes, derivadas de secuencias humanas.

Los anticuerpos de la presente invención se han construido comprendiendo CDR de las regiones variable de cadena pesada y variable de cadena ligera del clon de anticuerpo monoclonal murino BHA2.1 (Hangan et al., Cancer Res., 56:3142-3149 (1996)). Los materiales de partida preferidos para construir anticuerpos son anticuerpos anti- $\alpha$ 1 integrina, tales como los segregados por el hibridoma BHA2.1 (p. ej., TMC-2206), que son anticuerpos que bloquean la función dirigidos contra la  $\alpha$ 2 integrina humana, y dependen para su unión y actividad de la presencia de un dominio I intacto dentro de la  $\alpha$ 2 integrina diana. Se prefieren los anticuerpos con la especificidad de epítipo de TMC-2206 (o BHA2.1), que incluyen anticuerpos que se unen a la conformación inactiva de la molécula de  $\alpha$ 2 integrina y/o que no actúan como miméticos de ligando. Se prefieren los anticuerpos con la especificidad de epítipo de TMC-2206 (o BHA2.1) que, aunque interaccionan con la  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 integrina presente en leucocitos y plaquetas, no provocan la activación de las plaquetas, impiden la agregación de las plaquetas activadas sobre el colágeno, no tienen efecto o tienen efectos mínimos sobre el sangrado y/o no están asociados con complicaciones en el sangrado a las concentraciones administradas, que incluyen las dosis terapéuticas *in vivo*.

Pueden construirse anticuerpos en los que la molécula aceptora humana para la región variable de cadena ligera se selecciona basándose en consideraciones de homología entre las regiones variables de la molécula aceptora potencial y con la región cadena variable de la cadena del anticuerpo murino. Se prefieren moléculasceptoras humanas candidato de la línea germinal para reducir la antigenicidad potencial. Las bases de datos de la línea germinal se componen de secuencias de anticuerpos que leen hasta el extremo de la región FW3 de cadena pesada y parcialmente hasta la secuencia CDR3. Para la selección de una región FW4, se prefiere buscar bases de datos de secuencias de anticuerpos maduros que han sido obtenidos de la molécula de la línea germinal seleccionada, y también se prefiere seleccionar una región FW4 razonablemente homóloga para su uso en la molécula de anticuerpo recombinante. Las moléculasceptoras humanas se seleccionan preferiblemente de la misma clase de cadena ligera que la molécula donadora murina, y de la misma clase estructural canónica de la región variable de la molécula donadora murina. Las consideraciones secundarias para la selección de la molécula aceptora humana para la región variable de la cadena ligera incluyen la homología en longitud de CDR entre la molécula donadora murina y la molécula aceptora humana. Las moléculas de anticuerpo receptor humano se seleccionan preferiblemente mediante búsquedas de homología para la base de datos V-BASE, y otras bases de datos tales como las bases de datos de Kabat y también se pueden utilizar las bases de datos NCBI públicas. Para los anticuerpos anti-integrina  $\alpha$ 2 humanizados con la misma o similar especificidad de epítipo y/o propiedades funcionales que TMC-2206, una molécula aceptora de cadena ligera humana preferida es el SEQ ID NO: 37 con la secuencia de anticuerpo de la línea germinal A14 para la región FW 1-3 y la secuencia FGQGTKVEIK para FW4 (SEQ ID NO: 38), que representa un FW-4 de cadenas ligeras kappa 1 maduras común (p. ej., la secuencia de la cadena ligera AAB24132 (entrada NCBI, gi/259596/gb/AAB24132).

Se pueden construir anticuerpos en donde la molécula aceptora humana para la región variable de cadena pesada se selecciona basándose en consideraciones de homología entre las regiones variables de la molécula aceptora potencial y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo murino. Se prefieren moléculasceptoras humanas candidato de la línea germinal para reducir la antigenicidad potencial. Las bases de datos de la línea germinal se componen de secuencias de anticuerpos que leen hasta el extremo de la región FW3 de la cadena pesada y parcialmente hasta la secuencia CDR3. Para la selección de una región FW4, se prefiere buscar bases de datos de secuencias de anticuerpos maduros que han sido obtenidos de la molécula de la línea germinal seleccionada, y también se prefiere seleccionar una región FW4 razonablemente homóloga para su uso en la molécula de anticuerpo recombinante. Las moléculasceptoras humanas se seleccionan preferiblemente de la misma clase de cadena pesada que la molécula donadora murina, y de la misma clase estructural canónica de la región variable de la molécula donadora murina. Las consideraciones secundarias para la selección de la molécula aceptora humana para la región variable de la cadena pesada incluyen homología en la longitud de las CDR entre la molécula donadora murina y la molécula aceptora humana. Las moléculas de anticuerpo receptor humano se seleccionan preferiblemente mediante búsqueda de homología con la base de datos V-BASE, aunque también se pueden utilizar otras bases de datos tales como las bases de datos de Kabat y las bases de datos NCBI públicas. Para los anticuerpos anti-integrina  $\alpha$ 2 con la misma o similar especificidad de epítipo y/o propiedades funcionales que TMC-2206, una molécula aceptora de cadena pesada preferida es el SEQ ID NO: 39 con la secuencia del anticuerpo de la línea germinal 4-59 para la región FW 1-3 (SEQ ID NO: 12) y el anticuerpo, CAA48104.1 (entrada NCBI, gi/33583/emb/CAA48104.1) un anticuerpo maduro derivado de la secuencia de la línea germinal 4-59 para la región FW 4 (SEQ ID NO: 13) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Los métodos para humanizar un anticuerpo contra integrina  $\alpha 2$  no humana se describen en la presente memoria, incluyendo los Ejemplos siguientes. Con el fin de humanizar un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ , se obtiene el material de partida de anticuerpo no humano, incluyendo la preparación a partir de la inmunización o mediante la adquisición de anticuerpos disponibles comercialmente. Las técnicas ilustrativas para la generación de anticuerpos se describen en la presente memoria.

El antígeno integrina  $\alpha 2\beta 1$  que se va a utilizar para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, una forma soluble de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  u otro fragmento de integrina  $\alpha 2\beta 1$  (p. ej., un fragmento de integrina  $\alpha 2\beta 1$  que comprende un dominio 1 de integrina  $\alpha 2$  humana (SEQ ID NO: 11); véase también, p. ej., el SEQ ID NO: 107). Otras formas de integrina  $\alpha 2$  útiles para generar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica basándose en la secuencia de la integrina  $\alpha 2$  (p. ej., un integrina  $\alpha 2$  humana como en el SEQ ID NO: 8).

Los anticuerpos policlonales se originan preferiblemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc), intravenosas (iv) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante con o sin un coadyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que es inmunogénica en las especies que se van a inmunizar, p. ej., hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico,  $\text{SOCl}_2$ , o  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , en donde R y  $\text{R}^1$  son grupos alquilo diferentes.

Los animales pueden ser inmunizados contra el antígeno, productos conjugados inmunogénicos, o derivados mediante la combinación del antígeno o el producto conjugado (p. ej., 100  $\mu\text{g}$  para conejos o 5  $\mu\text{g}$  para ratones) con 3 volúmenes de coadyuvante completo de Freund e inyectando la disolución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes más tarde los animales se refuerzan con el antígeno o producto conjugado (p. ej., con 1/5 a 1/10 de la cantidad original utilizada para inmunizar a) en coadyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde los animales se toman muestras de sangre y se analiza el suero para determinar el título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta las mesetas de título. Preferiblemente, para las inmunizaciones con producto conjugado, el animal se refuerza con el producto conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de entrecruzamiento diferente. Los productos conjugados también se pueden elaborar en cultivo de células recombinantes como fusiones de proteínas. Asimismo, se utilizan adecuadamente agentes de agregación tales como alumbre para mejorar la respuesta inmunitaria.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975), o se pueden elaborar por métodos de ADN recombinante (p. ej., Patente de los Estados Unidos Núm. 6.204.023). Los anticuerpos monoclonales también se pueden elaborar utilizando las técnicas descritas en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.025.155 y 6.077.677 así como Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núms. 2002/0160970 y 2003/0083293 (véase también, p. ej., Lindenbaum, et al., Nucleic Acids Research 32 (21): 0177 (2004)).

En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal anfitrión apropiado, tal como una rata, hámster o mono, se inmuniza (p. ej., como se ha descrito anteriormente en este documento) para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al antígeno utilizado para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Los linfocitos se fusionan a continuación con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (véase, p. ej., Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se hacen crecer en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), sustancias que evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, apoyan una producción de alto nivel estable de anticuerpo por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre éstas, las líneas celulares de mieloma preferidas son las líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOP-21 y M.C.-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA, y las células SP-2 o X63-Ag8-653 asequibles de la Colección de Cultivos Tipo Americana, Rockville, Md. USA. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (p. ej., Kozbor, J. Immunol, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que células de hibridoma están creciendo se somete a ensayo para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de

los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un análisis de unión *in vitro*, tal como radioinmunoanálisis (RIA) o análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA).

5 La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, por medio del análisis de Scatchard de Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Después de identificar que las células de hibridoma producen anticuerpos de la especificidad, afinidad, y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y hacer crecer mediante procedimientos convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM 10 o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* en forma de tumores de ascitis en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas incluyendo, por ejemplo, cromatografía de proteína A, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y/o cromatografía de afinidad. 15

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (p. ej., mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de semejante ADN. Una vez aislado, el ADN podría colocarse en vectores de expresión, que luego son transfectados a células anfitrionas tales como células de *E. Coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma, incluyendo aquellas que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células anfitrionas recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos se describe con más detalle a continuación. 20

Los ejemplos de la presente memoria describen métodos para la humanización de un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  ilustrativo. En ciertas realizaciones, puede ser deseable generar variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humanizado, concretamente cuando éstas mejoran la afinidad de unión u otras propiedades biológicas del anticuerpo humanizado. 25

Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2\beta 1$  humanizado se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en un ADN de anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2\beta 1$  humanizado, o mediante síntesis de péptidos. Tales variantes incluyen, por ejemplo, deleciones, y/o inserciones y/o sustituciones, de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos mostradas para el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  TMC-2206 (p. ej., derivado de o basado en secuencias de la región variable como se muestra en los SEQ ID NO: 19 y 21). Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución se hace para llegar al constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos post-traduccionales del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado, por ejemplo cambiando el número o posición de los sitios de glicosilación. 30 35

Hay una serie de métodos utilizados para producir anticuerpos humanos o de tipo humano (p. ej., la "humanización"). Los enfoques para humanizar anticuerpos han variado a lo largo de los años. Un enfoque consistía en generar regiones variables murinas fusionadas a regiones constantes humanas, llamadas quimeras de Fc-murinas-humanas (véanse, p. ej., Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851 - 6.855 (1984); Patente de los Estados Unidos Núm., 5.807.715). Otro enfoque explotaba el hecho de que las CDR podrían ser fácilmente identificadas en función de su naturaleza hipervariable (Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252: 6609-6616 (1977)), Kabat, *Adv. Protein Chem.* 32:1-75 (1978)) y de la estructura canónica (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196 (4):901-17 (1987); Lazakani et al., *J. Mol. Biol.* 272: 929 (1997) y humanizadas injertando sólo regiones CDR no humanas (referidas como CDR donantes) sobre un marco humano (referido como marcos aceptores) como muestran, por ejemplo, Jones et al., *Nature* 321 (6069):522-5 (1986); (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.225.539; la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.548.640). Los seis bucles de CDR se presentan en un racimo, y se basan en el análisis cristalográfico, residuos del marco críticos dentro de la llamada zona "Vernier" que flanquea las CDR o en la interfaz de la cadena pesada-ligera se pueden identificar fácilmente (véase, p. ej., Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196 (4):901-17 (1987); Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 186 (3):651-63 (1985); Chothia et al., *Nature* 342 (6252): 877-83 (1989)). Estos residuos se pueden volver a mutar al residuo murino para restaurar la orientación relativa correcta de las seis CDR (véanse p. ej., Verhoyen et al., *Science* 239 (4847):1534-6 (1988); Reichman et al., *Nature* 332 (6162):323-7 (1988); Tempest et al., *Biotechnology (NY)* 9(3):266-71 (1991)). Puesto que las regiones variables pueden clasificarse en familias que tienen una homología relativamente alta entre ratón y ser humano (revisado p. ej., por Pascual y Capra *Adv. Immunol.* 49: 1-74 (1991)), estos primeros estudios también indicaron que el potencial de pérdida de afinidad podría ser minimizado en el anticuerpo injertado mediante la selección de la secuencia de la línea germinal humana con la mayor homología con el anticuerpo murino de interés para uso como molécula aceptora humana (véanse, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.225.539; Verhoyen et al., *Science* 239 (4847):1534-6 (1988)). 40 45 50 55

Se han referido homologías en las familias y relaciones estructurales entre los marcos que tienen impacto en la correcta presentación de un determinado tipo de estructura canónica de CDR (véase, p. ej., Al-Lazakani et al., J. Mol. Biol. 273 (4):927-48 (1997) y las referencias de la misma). Preferiblemente, se elige una secuencia humana o de la línea germinal que mejor se ajuste. Las bases de datos disponibles de las secuencias de la línea germinal de anticuerpos pueden ser utilizadas para determinar el subtipo de la familia de una cadena pesada y ligera murina dada y para identificar las secuencias que mejor se ajustan útiles como marcos aceptores humanos dentro de esa subfamilia humana. Preferiblemente se tienen en cuenta la homología lineal de los aminoácidos de los marcos tanto donador como aceptor, así como la estructura canónica de las CDR.

Residuos de la cadena pesada ilustrativos que pueden ser sustituidos en un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado incluyen uno cualquiera o más de los siguientes números de residuos del marco: H37, H48, H67, H71, H73, H78 y H91 (sistema de numeración de Kabat). Preferiblemente, al menos cuatro de estos residuos del marco están sustituidos. Un conjunto particularmente preferible de sustituciones para la cadena pesada de anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  humanizados como se ilustra en la presente memoria es H37, H71, H73 y H78. Del mismo modo, los residuos de la cadena ligera también pueden ser sustituidos. Los residuos de la cadena ligera ilustrativos para la sustitución incluyen uno o más de los siguientes números de residuos: L1, L2, L4, L6, L46, L47, L49 y L71. Preferiblemente, al menos tres de estos residuos estructurales están sustituidos. Un conjunto particularmente preferible de sustituciones de la cadena ligera de anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  humanizados como se ilustra en la presente memoria es L2, L46 y L49.

Un método útil para la identificación de algunos residuos o regiones de un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina" (véase, p. ej., Cunningham y Wells Science, 244: 1081-1085 (1989)). Aquí, se identifican un residuo o grupo de residuos diana (p. ej., residuos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (preferiblemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno integrina  $\alpha 2\beta 1$ . Aquellas ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo más u variantes u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, mientras que el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación per se no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar el funcionamiento de una mutación en un sitio dado, se realiza el barrido con ala o la mutagénesis al azar en el codón o la región diana y se escrutan las variantes de anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  humanizados expresadas para determinar la actividad deseada.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo- terminales que varían en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado con un residuo metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a una etiqueta epitópica. Otras variantes de inserción de una molécula de anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizada incluyen la fusión a los extremos N- o C-terminales de un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de un enzima o un polipéptido que aumenta la vida media en suero del anticuerpo (véase más abajo).

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un residuo aminoácido en una molécula de anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado eliminado y un residuo diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen los bucles hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones del marco. Los residuos de la región hipervariable o residuos del marco implicados en la unión al antígeno están generalmente sustituidos de una manera relativamente conservadora. Tales sustituciones conservadoras se muestran a continuación bajo el título de "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, en ese caso se introducen cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ilustrativas" o como más se describen a continuación en referencia a las clases de aminoácidos, y se escrutan los productos.

Residuo original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	ser	Ser

Residuo original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
Gln (Q)	asn	Asn
Glu (E)	asp	Asp
Gly (G)	pro; ala	Ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	Leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	Arg
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	Leu
Pro (P)	ala	Ala
Ser (S)	thr	Thr
Thr (T)	ser	Ser
Trp (W)	tyr; phe	Tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; Ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	Leu

5 Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se realizan seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos basados en propiedades comunes de la cadena lateral: (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile; (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr; (3) ácidos: asp, glu; (4) alcalinos: asn, gin, his, lys, arg; (5) residuos que influyen orientación de la cadena: gly, pro; y (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

10 Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la confirmación apropiada de un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado también puede ser sustituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el entrecruzamiento aberrante. Por el contrario, se pueden añadir uno o varios enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (concretamente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

15 Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Por alteración se entiende la eliminación de uno o más radicales carbohidrato que se encuentran en el anticuerpo y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

20 La glicosilación de anticuerpos está típicamente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del radical carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparragina. La secuencias tripeptídicas de asparragina-X-serina y asparragina-X-treonina, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del radical carbohidrato a la cadena lateral de asparragina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiamino ácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se pueden utilizar 5-hidroxiprolina o 5-

hidroxilisina.

La adición o delección de sitios de glicosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga o carezca de una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración también puede hacerse mediante la adición, sustitución, o delección de, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O). Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR, o mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado.

Habitualmente, las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado tendrán una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 75% con las secuencias de aminoácidos del anticuerpo humanizado original de cualquiera de la cadena pesada o ligera (p. ej., secuencias de la región variable como en el SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 19, respectivamente), más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, y más preferiblemente al menos 95%, incluyendo, por ejemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98%, 99%, y 100%. La identidad u homología con respecto a esta secuencia se define en la presente memoria como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidato que son idénticos a los residuos del anticuerpo anti-integrina anti- $\alpha 2$  humanizado, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa (como se ha descrito anteriormente) como parte de la identidad de secuencia. No se deberá interpretar que ninguna de las extensiones, delecciones o inserciones N-terminales, C-terminales, o internas en la secuencia del anticuerpo afecta a la identidad u homología de la secuencia. Así, la identidad de secuencia puede ser determinada por métodos convencionales que se utilizan comúnmente para comparar la similitud en la posición de los aminoácidos de dos polipéptidos. Utilizando un programa de ordenador como BLAST o FASTA, dos polipéptidos son alineados para un emparejamiento óptimo de sus respectivos aminoácidos (ya sea a lo largo de la longitud completa de una o ambas secuencias, o a lo largo de una porción predeterminada de una o ambas secuencias). Los programas proporcionan una penalización de apertura por defecto y una penalización por hueco por defecto, y se puede utilizar una matriz de puntuación tal como PAM250 (una matriz de puntuación convencional, véase Dayhoff et al., en Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supl. 3 (1978)) junto con el programa de ordenador. Por ejemplo, el porcentaje de identidad se puede calcular como: el número total de coincidencias idénticas multiplicado por 100 y luego dividido por la suma de la longitud de la secuencia más larga en el tramo emparejado y el número de huecos introducidos en las secuencias más largas con el fin de alinear las dos secuencias.

Los anticuerpos que tienen las características identificadas en la presente memoria como deseables en un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado son escrutados mediante métodos como los descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se proporcionan métodos para el escrutinio de anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  candidato para determinar las características preferidas y las funcionalidades que incluyen el escrutinio de anticuerpos que se unen al epítipo sobre la integrina  $\alpha 2\beta 1$  unida por un anticuerpo de interés (p. ej., aquellos que compiten con, inhiben o bloquean la unión del anticuerpo TMC-2206 a la integrina  $\alpha 2\beta 1$ ). Los métodos y materiales ilustrativos se describen en el Ejemplo 13. Se pueden realizar análisis de entrecruzamiento y se describen, por ejemplo, en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Además, o alternativamente, se puede realizar el mapeo de epítopos, por ejemplo, como se describe en Champe et al., J. Biol. Chem. 270: 1388-1394 (1995) para determinar si el anticuerpo se une a un epítipo de interés (véase, p. ej., el Ejemplo 12 para estudios de mapeo de epítopos de TMC-2206).

De un modo similar se puede utilizar integrina  $\alpha 2\beta 1$  inmovilizada para determinar las potencias de unión relativa mediante la medición de los valores de  $K_i$  en ensayos de competición (véase, p. ej., el Ejemplo 2). Por ejemplo, se utiliza Eu-TMC-226 marcado con fluorescencia en presencia de concentraciones variables de anticuerpo candidato no marcado, por ejemplo, utilizando un sistema de análisis similar al descrito anteriormente. Después de un tiempo de incubación especificado, se determina la cantidad de Eu-TMC-2206 unido. Las curvas de inhibición se ajustan con el modelo de "competición por un sitio" utilizando el soporte lógico Prism (GraphPad, Inc. CA) para obtener valores de  $CI_{50}$  y para calcular la  $K_i$  utilizando la ecuación de Cheng y Prusoff (Biochem, Pharmacol. 22 (23):3099-108 (1973)).

Es deseable preparar, identificar y/o seleccionar anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  humanizados que tienen propiedades de unión beneficiosas, por ejemplo, bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 2, en donde los anticuerpos candidato se someten a ensayo para determinar su capacidad para bloquear la adherencia celular mediada por integrina  $\alpha 2\beta 1$  en comparación con TMC-2206 y el anticuerpo quimérico de ratón-humano derivado de TMC-2206 descrito en el Ejemplo 2. Por ejemplo, las células CHO que expresan la integrina  $\alpha 2$  humana y  $\beta 1$  de hámster endógeno (Symington et al., J. Cell Biol. 120(2):523-35 (1993)) se preparan y se marcan con CFSE (Molécula Probes, OR). Las células marcadas se preparan y se ajusta la concentración celular; células se mantienen en la oscuridad hasta su uso. Se prepara una placa recubierta con colágeno (colágeno de cola de rata de Tipo I; BD

Biosciences) y cada disolución de anticuerpo diluido en serie se añade a la placa de colágeno. Las células marcadas se añaden a continuación al pocillo y la placa se incuba. Después del lavado, las células se lisan y se lee la intensidad de fluorescencia (excitación, 485 nm; emisión, 535 nm). Se calcula la actividad inhibidora de cada anticuerpo.

5 Además, se pueden calcular las constantes de unión de los anticuerpos candidato para el ligando integrina  $\alpha 2\beta 1$  inmovilizado como se describe en el Ejemplo 2. Los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos se recubren con  $\alpha 2\beta 1$ -integrina de plaquetas (recubiertos a medida con  $\alpha 2\beta 1$  de plaquetas humanas por GTI Inc., WI) y después se bloquean. Por ejemplo, para determinar la afinidad de TMC-2206 por su antígeno integrina  $\alpha 2$ , se utilizan TMC-2206 marcado fluorescentemente o anticuerpo IgG de control de isotipo (véanse los Ejemplos de más abajo). El anticuerpo marcado con fluorescencia, incluyendo Eu-TMC-2206 o Eu-IgG de control de isotipo, se aplica a las placas de microtitulación de integrina  $\alpha 2\beta 1$  bloqueadas. Después de incubar las placas selladas para permitir que la interacción anticuerpo-antígeno alcance el equilibrio, las muestras se transfieren desde cada pocillo a un pocillo nuevo que contiene una disolución de mejora para la medición de la marca libre (no unida). La disolución de mejora también se añade a los pocillos vacíos para la medición de la marca unida. Los valores  $K_d$  del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  se calculan mediante análisis de Scatchard. La afinidad relativa de los derivados de TMC-2206 (incluyendo los anticuerpos humanizados derivados de o basados en TMC-2206) se puede determinar mediante la determinación del valor de  $K_i$  en un análisis de competición. Por ejemplo, para el análisis de competición, se añade TMC-2206 marcado con Eu a los pocillos recubiertos con  $\alpha 2\beta 1$  en presencia de anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  no marcados, incluyendo anticuerpos TMC-2206 o quiméricos (incluyendo humanizados) derivados de o basados en TMC-2206, o anticuerpo IgG de control de isotipo a diversas concentraciones. Después de un período de incubación para alcanzar el equilibrio, los pocillos se lavan y se miden los niveles de anticuerpos marcados unidos marca Eu retenido en cada pocillo. El valor de  $K_i$  se puede obtener de los valores de CE50 utilizando el valor de  $K_d$  obtenido para el anticuerpo Eu-TMC-2206 por los estudios de unión directa como se ha descrito anteriormente.

25 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado es un fragmento de anticuerpo. Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, p. ej., Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992) y Brennan et al., Science 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ser producidos directamente por medio de células anfitrionas recombinantes, tales como bacterias (véanse, p. ej., Better et al., Science 240 (4855):1041-1043 (1988); Patente de los Estados Unidos Núm. 6.204.023. Por ejemplo, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y se pueden acoplar químicamente para formar fragmentos  $F(ab' )_2$  (Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos  $F(ab' )_2$  se pueden aislar directamente del cultivo de células anfitrionas recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto en la materia.

35 En algunas realizaciones, puede ser deseable generar anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  humanizados multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) que tienen especificidades de unión para al menos dos epítomos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos (p. ej., con dos brazos de unión diferentes) se pueden unir a dos epítomos diferentes de la proteína integrina  $\alpha 2\beta 1$ . Alternativamente, se puede combinar un brazo anti-integrina  $\alpha 2$  con un brazo que se une a una molécula desencadenante sobre un leucocito tal como una molécula receptora de células T (p. ej., CD2 o CD3), o receptores de Fc para IgG (Fc $\gamma$ R), tales como Fc $\gamma$ R1 (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) y Fc $\gamma$ RIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular en una célula que tiene integrina  $\alpha 2\beta 1$  unida a su superficie. Los anticuerpos biespecíficos se pueden utilizar para agentes citotóxicos localizados en las células con integrina  $\alpha 2\beta 1$  unida a su superficie. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a integrina  $\alpha 2\beta 1$  y un brazo que se une al agente citotóxico (p. ej., gelonina, saporina, anti-interferón alfa, alcaloide de vinca, cadena A de ricina, o hapteno radioisotópico). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar en forma de anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., anticuerpos biespecíficos  $F(ab' )_2$ ).

45 De acuerdo con otro enfoque para la elaboración de anticuerpos biespecíficos, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, se reemplazan una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos por cadenas laterales más grandes (p. ej., tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensatorias de tamaño idéntico o menor a la cadena o las cadenas laterales grandes en la interfaz del segundo anticuerpo mediante remplazo de las cadenas laterales grandes de aminoácidos por otras más pequeñas (p. ej., alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento de los heterodímeros sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros (véase, p. ej., el documento WO96/27011).

55 Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o heteroconjugados. Por ejemplo, uno de los anticuerpos del producto heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Los anticuerpos heteroconjugados se pueden elaborar utilizando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los agentes de entrecruzamiento adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.676.980 junto con una serie de técnicas de entrecruzamiento.

60 Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar utilizando conexiones químicas. Por

ejemplo, Brennan et al., (Science 229:81 (1985)) describen un procedimiento en donde anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditio arsenito sódico para estabilizar los ditioles de vinca y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los fragmentos Fab'-SH, recuperados de *E. Coli*, se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, Shalaby et al., (J. Exp. Med.175:217-225 (1992)) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')<sub>2</sub>. Donde cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. Coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unirse a células que expresaban el receptor HER2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

También se han descrito diversas técnicas para elaborar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina (véase, p. ej., Kostgely et al., J. Immunol.148 (5):1547-1553 (1992)). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se reoxidaron para formar heterodímeros de anticuerpo. Este método también se puede utilizar para la producción de heterodímeros de anticuerpo. La tecnología de diacuerpos (véase, p. ej., Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)) ha proporcionado un mecanismo alternativo para hacer elaborar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden una región variable de cadena pesada (VH) conectada a una región variable de la cadena ligera (VL) mediante un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios del otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado sobre otra estrategia para elaborar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv o scFv) (véase, p. ej., Gruber et al., J. Immunol.152: 5368 (1994)). Alternativamente, el anticuerpo biespecífico, puede ser un anticuerpo lineal, por ejemplo, producido como describen Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos (véase, p. ej., Tutt et al., J. Immunol.147:60 (1991)).

Se contemplan otras modificaciones de los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  humanizados. Por ejemplo, puede ser deseable modificar el anticuerpo con respecto a la función efectora, a fin de aumentar o disminuir la eficacia del anticuerpo, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer. Se pueden introducir uno o varios residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en la región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una mayor capacidad de internalización y/o aumento de la muerte celular mediada por complemento (CMC) y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (véanse, p. ej., Caron et al., J. Exp. Med.176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol.148:2918-2922 (1992)). Los anticuerpos homodiméricos con actividad anti-tumoral también se pueden preparar utilizando entrecruzadores heterobifuncionales (véanse, p. ej., los descritos por Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993)). Alternativamente, se puede modificar por ingeniería genética un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y de ese modo puede tener mejores capacidades CMC y/o ADCC (véanse, p. ej., Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)).

Los productos inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado conjugado con un radical, por ejemplo, una molécula, una composición, un complejo, o un agente, por ejemplo, un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, una toxina (p. ej., una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (p. ej., un producto radioconjugado), para el redireccionamiento del agente a una célula, tejido u órgano que expresa anti-integrina  $\alpha 2$ . Semejante producto inmunoconjugado se puede utilizar en un método de redireccionamiento del radical o agente a un sitio particular de acción caracterizado por la presencia de integrina  $\alpha 2$  o  $\alpha 2\beta 1$ .

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos productos inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos sin unión de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina o los tricotecenos. Se encuentra disponible una variedad de radionúclidos para la producción de anticuerpos anti-integrina alfa 2 radioconjugados. Los ejemplos incluyen <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y o <sup>186</sup>Re.

Los productos conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se elaboran utilizando una variedad de

agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3- (2-piridilditioil) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil) etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), o compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como describen Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen-triaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionúclidos al anticuerpo (véase, p. ej., el documento WO94/11026).

10 En otra realización, el anticuerpo se puede conjugar con un receptor (tal como estreptavidina) para la utilización en el predireccionamiento de células, tejidos u órganos que expresan integrina  $\alpha 2$  cuando el producto conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del producto conjugado no unido de la circulación utilizando un agente de limpieza y después de la administración de un ligando (p. ej., avidina) que está conjugado a un agente, por ejemplo, un agente citotóxico (p. ej., un radionúclido).

15 Los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  descritos en la presente memoria también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos por Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); y las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.485.045 y 4.544.545. Se describen liposomas con tiempo de circulación mejorado en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.013.556.

20 Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extraen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' de un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  se pueden conjugar con liposomas como describen Martin et al., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico (p. ej., doxorubicina) está opcionalmente contenido dentro del liposoma (véase, p. ej., Gabizon et al., J. National Cancer Inst 81(19): 1484 (1989)).

25 Los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  humanizados también pueden ser utilizados en la Terapia Profármaco-Enzima Dirigida por Anticuerpos (ADEPT) mediante la conjugación del anticuerpo a una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (p. ej., un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase, p. ej., el documento WO81/01145) en un fármaco activo. (véanse, p. ej., el documento WO88/07378 y la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.975.278). El componente enzimático del producto inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal forma que lo convierta en su forma más activa. Las enzimas que son útiles incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anti-canceroso, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de Serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas que cortan carbohidratos, tales como  $\beta$ -galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres;  $\beta$ -lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con  $\beta$ -lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasas, como la penicilina amidasa V o la penicilina amidasa G, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos como abzimas, se pueden utilizar para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, p. ej., Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Los productos conjugados de anticuerpo-abzima se pueden prepararse como se describe en la presente memoria, incluyendo para la liberación de la abzima en una célula, tejido u órgano que expresa integrina  $\alpha 2$ .

30 Las enzimas se pueden unir covalentemente a los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  por medio de mecanismos bien conocidos en la técnica, incluyendo el uso de los reactivos de entrecruzamiento heterobifuncionales comentados anteriormente. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión al antígeno de un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  ligada a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima se pueden construir utilizando mecanismos de ADN recombinante bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Neuberger et al., Nature 312: 604-608 (1984)).

35 En ciertas realizaciones de la invención, puede ser deseable utilizar un fragmento de anticuerpo, en lugar de un anticuerpo intacto, por ejemplo, para aumentar la penetración en el tejido o tumor. También puede ser deseable modificar el fragmento de anticuerpo con el fin de aumentar su vida media en suero. Esto se puede conseguir mediante la incorporación de un epítopo de unión a receptor de rescate en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo, por mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o mediante la incorporación del epítopo en una etiqueta peptídica que a continuación se fusiona al fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en el medio, por ejemplo, mediante síntesis de ADN o péptido (véase, p. ej., el documento WO96/32478).

40 Las modificaciones covalentes de los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  humanizados se pueden realizar, por

ejemplo, por síntesis química o por escisión enzimática o química del anticuerpo. Otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se introducen en la molécula haciendo reaccionar los residuos de aminoácido diana del anticuerpo con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales. Los residuos cisteinilo, por ejemplo, muy comúnmente se hacen reaccionar con  $\alpha$ -haloacetatos (y las correspondientes aminas), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos cisteinilo también se derivatizan mediante reacción con bromotrifluoroacetona, ácido  $\alpha$ -bromo- $\beta$ -(5-imidozilo)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidadas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil-2-piridilo, p-benzoato de cloromercurio, 2-cloromercurio-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol. Los residuos de histidilo, por ejemplo, se derivatizan por reacción con pirocarbonato de dietilo a pH 5,5-7,0 debido a que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. También es útil el bromuro de para-bromofenacilo; la reacción se realiza preferiblemente en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0. El lisinilo y los residuos amino terminales, por ejemplo, se hacen reaccionar con anhídridos de ácido succínico u otros ácidos carboxílicos. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar residuos que contienen  $\alpha$ -amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobenzenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona, y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato. Los residuos de arginilo, por ejemplo, se modifican mediante reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, y ninhidrina. La derivatización de los residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al alto  $pK_a$  del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como con el grupo épsilon-amino de la arginina. Los residuos de tirosilo, por ejemplo, se modifican específicamente con particular interés en la introducción de marcas espectrales en los residuos de tirosilo por reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Más comúnmente, se utilizan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente. Los residuos de tirosilo se yodan utilizando  $^{125}\text{I}$  o  $^{131}\text{I}$  para preparar proteínas marcadas para su uso en radioinmunoanálisis. Los grupos laterales carboxilo, por ejemplo, aspartilo o glutamilo, se modifican selectivamente mediante reacción con carbodiimidadas ( $\text{RN}=\text{C}=\text{N}-\text{R}'$ ), donde R y R' son grupos alquilo diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Además, se convierten residuos de aspartilo y glutamilo en residuos de asparginilo y glutaminilo por reacción con iones amonio. Los residuos de glutaminilo y asparginilo se desamidán frecuentemente a los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo, respectivamente. Estos residuos se desamidán en condiciones neutras o alcalinas. La forma desamidada de esos residuos cae dentro del alcance de esta invención. Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de lisina, arginina, y cadenas laterales de histidina (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, págs. 79-86 (1983)), la acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente implica el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos ya que no requieren la producción del anticuerpo en una célula anfitriona que tiene capacidades de glicosilación para la N- u O-glicosilación. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar o los azúcares pueden estar unidos a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de la fenilalanina, tirosina, o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina (véanse, p. ej., el documento WO87/05330; Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, págs. 259-306 (1981)).

La eliminación de cualquier radical carbohidrato presente en el anticuerpo se puede lograr, por ejemplo, química o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o de todos los azúcares excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que deja el anticuerpo intacto (véanse, p. ej., Hakimuddin, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 52 (1987); Edge et al., *Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981)). La escisión enzimática de grupos carbohidrato en los anticuerpos se puede conseguir mediante el uso de una variedad de endo- y exo-glicosidasas, (véase, p. ej., Thotakura et al., *Meth. Enzymol.* 138: 350 (1987)).

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende la unión del anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteicos, tales como polietilenglicol, polipropilenglicol, o polioxialquilenos (véanse, p. ej., las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337).

Los ácidos nucleicos aislados que codifican un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado, así como los vectores y células anfitrionas que comprenden el ácido nucleico, y las técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo se describen en la presente memoria. Para la producción recombinante del anticuerpo, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo se aíslan y se insertan en un vector replicable para su posterior clonación (amplificación del ADN) o para su expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencía utilizando procedimientos convencionales (p. ej., mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Se encuentran disponibles muchos vectores. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento

intensificador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

Un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  se puede producir de forma recombinante, incluyendo como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína madura o polipéptido. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferiblemente es una que es reconocida y procesada (p. ej., (p. ej., escindida por una peptidasa señal) por la célula anfitriona. Para células anfitrionas procariotas que no reconocen ni procesan la secuencia señal eucariota (p. ej., una secuencia de señal de inmunoglobulina), la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota incluyendo, por ejemplo, los líderes de peptato lisasa (tal como pelB), fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o enterotoxina II estable al calor. Para la secreción de levadura, se puede utilizar una secuencia señal de levadura, incluyendo, por ejemplo, el líder de la invertasa de levadura, líder del factor  $\alpha$  (incluyendo líderes de factor  $\alpha$  de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO90/13646. En la expresión de células de mamíferos, se encuentran disponibles secuencias señal de mamífero, así como líderes secretores virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simplex, y pueden ser utilizadas. El ADN para tal región precursora (p. ej., la secuencia señal) se liga en el marco de lectura al ADN que codifica un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ .

Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicar en una o más células anfitrionas seleccionadas. Generalmente, en vectores de clonación, esta secuencia es una que permite al vector replicar independientemente del ADN cromosómico del anfitrión, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Tales secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias gram-negativas, el origen del plásmido 2  $\mu$  es adecuado para levaduras, y varios orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. En general, no se necesita el componente origen de replicación para los vectores de expresión de mamífero (p. ej., el origen de SV40 puede utilizarse típicamente sólo porque contiene el promotor temprano).

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p. ej., ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en el medio complejo, (p. ej., el gen que codifica D-alanina racemasa para Bacilos).

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula anfitriona. Aquellas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y por tanto sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante utilizan los fármacos metotrexato, neomicina, histidinol, puromicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ , tales como los genes de DHFR, timidina quinasa, metalotioneína-I y -II, preferiblemente de metalotioneína de primates, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula anfitriona apropiada cuando se emplea DHFR de tipo salvaje es la de la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad DHFR.

Alternativamente, las células anfitrionas (particularmente anfitriones de tipo salvaje que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ , proteína DHFR de tipo salvaje, y otro marcador seleccionable tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden ser seleccionadas por un crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, incluyendo un antibiótico aminoglicosídico, tal como kanamicina, neomicina, o G418 (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.965.199).

Un gen de selección adecuado para el uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb et al., *Nature*, 282: 39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC Núm. 44076 o PEP4-1 (véase, p. ej., Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977)). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula anfitriona de levadura proporciona en ese caso un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan mediante plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

Además, los vectores derivados del plásmido circular de 1,6  $\mu$  pKD1 se pueden utilizar para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990) informó de un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternera recombinante para *K. lactis*. También se han descrito vectores de expresión de múltiples copias estables para la secreción de albúmina de suero

humano recombinante maduro por cepas industriales de *Kluyveromyces* (véase, p. ej., Fler et al., *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991)).

Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor que es reconocido por el organismo anfitrión y está unido operativamente al ácido nucleico del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ . Los promotores adecuados para uso con anfitriones procariontas incluyen el promotor de arabinosa (p. ej., *araB*), el promotor *phoA*, los sistemas promotores de  $\beta$ -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*), y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para el uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ .

Las secuencias promotoras para eucariotas son conocidas. La mayoría de los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases aguas arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia hallada 70 a 80 bases aguas arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT (SEQ ID NO: 115) donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas hay una secuencia AATAAA (SEQ ID NO: 116) que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Tales secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con anfitriones de levadura incluyen pero no se limitan a los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucoasa isomerasa y glucoquinasa. Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para el uso en la expresión de levaduras se describen adicionalmente en el documento EP 73.657. Los intensificadores de levadura también se utilizan ventajosamente con promotores de levadura.

La transcripción de anticuerpo anti- $\alpha 2$  integrina a partir de vectores en células anfitrionas de mamífero se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B o Virus de Simios 40 (SV40), a partir de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, a partir de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de las células anfitrionas. Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen viral de replicación de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción *HindIII* E. Un sistema para expresar ADN en anfitriones de mamífero utilizando el virus del papiloma bovino como vector se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.419.446, y una modificación de este sistema se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.601.978 (véase también Reyes et al., *Nature* 297: 598-601 (1982) acerca de la expresión del ADNc de  $\beta$ -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple). Alternativamente se puede utilizar la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor.

La transcripción de ADN que codifica un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  por eucariotas superiores se incrementa frecuentemente mediante la inserción de una secuencia intensificadora en el vector. Se conocen ahora muchas secuencias intensificadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). A menudo, sin embargo, se utiliza un intensificador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el intensificador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el intensificador del promotor temprano de citomegalovirus, el intensificador de poliovirus en el lado tardío del origen de replicación, e intensificadores de adenovirus (véase, también, p. ej., Yaniv, *Nature* 297: 17-18 (1982) sobre elementos intensificadores para la activación de promotores eucariotas). El intensificador se puede empalmar en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia codificante del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ , pero se encuentra preferiblemente en un sitio 5' del promotor. Otros sistemas de regulación de genes bien conocidos en la técnica (p. ej., sistemas inducibles, tales como sistemas inducibles tetraciclina y GeneSwitch™) se pueden utilizar para controlar la transcripción de ADN que codifica anti-integrina  $\alpha 2$ .

Los vectores de expresión utilizados en las células anfitrionas eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles a partir de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ . Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (véase, p. ej., el documento

WO94/11026 y el vector de expresión descrito en él).

Las células anfitrionas adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente memoria son las células procariotas, de levaduras, o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen las eubacterias, incluyendo organismos gram-negativos o gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, p. ej., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, p. ej., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, p. ej., *Serratia marcescens*, y *Shigella*, así como Bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Los anfitriones de clonación de *E. Coli* adecuados incluyen *E. Coli* 294 (ATCC 31.446), *E. Coli* B, *E. Coli* X1776 (ATCC 31.537), y *E. Coli* W3110 (ATCC 27.325).

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son anfitriones de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos anti-integrina alfa 2. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es el más comúnmente utilizado entre los microorganismos anfitriones eucariotas inferiores. Sin embargo, se encuentran disponibles y son útiles otros numerosos géneros, especies y cepas, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; anfitriones de *Kluyveromyces* incluyendo *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. Thermotolerans*, o *K. Marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma freesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos incluyendo *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, o anfitriones de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* o *A. niger*.

Las células anfitrionas adecuadas para la expresión de anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  glicosilado derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células anfitrionas de insectos permisivas de anfitriones tales como *Spodoptera frugiperda* (Oruga), *Aedes aegypti* (Mosquito), *Aedes albopictus* (Mosquito), *Drosophila melanogaster* (Mosca de la fruta), y *Bombyx mori* han sido identificados. Se encuentran disponibles públicamente una variedad de cepas virales para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden utilizar, en particular para la transfección de células *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco como anfitriones.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados, incluyendo una variedad de células de mamífero, se ha convertido en un procedimiento de rutina. Los ejemplos de células anfitrionas de mamíferos útiles incluyen: una línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (p. ej., COS-7, ATCC CRL 1651); una línea de riñón embrionario humano 293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión (véase, p. ej., Graham et al., J. Gen Virol.36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (p. ej., BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo las células CHO que carecen de DHFR (véase, p. ej., DHFR Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón ((p. ej., TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (p. ej., CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (p. ej., VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (p. ej., HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (p. ej., MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (p. ej., BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (p. ej., W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (p. ej., Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (p. ej., MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (véase, p. ej., Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; o una línea de hepatoma humano (p. ej., Hep G2).

Las células anfitrionas se transforman con vectores de expresión o clonación anteriormente descritos o para la producción de anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes y/o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las células anfitrionas utilizadas para producir un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son apropiados para cultivar las células anfitrionas. Además, cualquiera de los medios descritos por Ham et al., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO90103430; WO 87/00195; o Patente de los Estados Unidos Re. Núm. 30.985 se pueden utilizar como medios de cultivo para las células anfitrionas. Cualquiera de estos medios se puede suplementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMICINA™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario también se puede incluir a concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos

en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH, y similares, son seleccionados por los expertos en la técnica, incluyendo aquellas condiciones de cultivo utilizadas previamente con la célula anfitriona seleccionada para la expresión.

5 Los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  se pueden purificar a partir de células, incluyendo células microbianas o de mamífero utilizando, por ejemplo, cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, electroforesis en gel, diálisis y/o cromatografía de afinidad. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ , o  $\gamma 4$  humanas (véase, p. ej., Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G es útil para los isotipos de ratón y para  $\gamma 3$  humana (véase, p. ej., Guss et al., EMBO J. 5: 1516-1517 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es muy a menudo agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como el vidrio de poro controlado o el poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se puede lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, es útil para la purificación Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Purificación de proteínas puede incluir una o más de las siguientes técnicas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación con etanol, la HPLC de fase inversa, la cromatografía sobre sílice, la cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, la cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (p. ej., una columna de ácido poliaspártico), el cromatofoco, la SDS-PAGE, la precipitación con sulfato de amonio y/o cromatografía de interacción hidrófoba. Por ejemplo, puede ser útil después de cualquier etapa de purificación, someter una mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes a una cromatografía de interacción hidrofóbica de pH bajo utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferiblemente realizado a bajas concentraciones de sal (p. ej., aproximadamente sal 0-0,25 M).

25 Las formulaciones de un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ , incluyendo aquellas para la administración terapéutica, se preparan para su almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, diluyentes, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones o disoluciones acuosas liofilizadas. Los portadores, diluyentes, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propil parabenos; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparragina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, u otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

40 La formulación de anticuerpo también puede contener más de un compuesto activo para la indicación particular que esté siendo tratada, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Puede ser deseable utilizar anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  además de uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. Además, puede ser deseable proporcionar un agente inmunosupresor. Tales moléculas están presentes adecuadamente combinadas en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

45 Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (p. ej., liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas o nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones que se van a utilizar para la administración *in vivo* son preferiblemente estériles. Esto se logra fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

55 Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, p. ej., películas, o microcápsulas. Los ejemplos de las matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de los Estados Unidos Núm. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$ -etil-L-glutamato, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como Lupron Depot™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras los polímeros tales como el etilenoacetato de vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días,

ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el organismo durante un tiempo prolongado, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden diseñar estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces SS intermoleculares a través del intercambio de tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Los anticuerpos anti- $\alpha 2$  se pueden utilizar como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan sobre una fase sólida tal como una resina Sephadex o papel de filtro, utilizando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene la proteína integrina  $\alpha 2\beta 1$  (o un fragmento de la misma) que se va a purificar, y, posteriormente, el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material de la muestra excepto la proteína integrina  $\alpha 2\beta 1$ , que se une al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón de glicina a pH 5,0, que liberará la proteína integrina  $\alpha 2\beta 1$  del anticuerpo.

Los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  también pueden ser útiles en análisis de diagnóstico para la proteína integrina  $\alpha 2\beta 1$ , p. ej., detectando su expresión en células, tejidos, o suero específicos. Para aplicaciones diagnósticas, el anticuerpo típicamente se marca con un radical detectable. Se encuentran disponibles numerosas marcas que pueden ser agrupadas generalmente en las siguientes categorías de radioisótopos, marcadores fluorescentes y marcas de enzima-sustrato. Los radioisótopos, tales como  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ , e  $^{131}\text{I}$ , son marcas útiles. El anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo, por ejemplo, utilizando las técnicas descritas en Current Protocols in Immunology, Volúmenes 1 y 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, N.Y., Pubs.(1991) y la radiactividad se puede medir, por ejemplo, utilizando el recuento de centelleo. Las marcas fluorescentes, tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, Lisamina, ficoeritrina y Rojo Texas también son útiles. Las marcas fluorescentes se pueden conjugar con el anticuerpo, por ejemplo, utilizando las técnicas descritas en Current Protocols in Immunology, más arriba. La fluorescencia se puede cuantificar, por ejemplo, utilizando un fluorímetro. También son útiles varias marcas de enzima-sustrato (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.275.149 para una revisión). La enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que se puede medir utilizando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que se puede medir espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se han descrito anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente por una reacción química y puede entonces emitir luz que se puede medir (p. ej., utilizando un quimioluminómetro) o dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcas enzimáticas incluyen luciferasas (p. ej., luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de los Estados Unidos Núm. 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos (p. ej., glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Las técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos han sido descritas, por ejemplo, por O'Sullivan et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates para su uso en inmunoanálisis enzimático, en Methods in Enzym. (ed J. Langone y H. Van Vunakis), Academic Press, N.Y., 73: 147-166 (1981). Los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo: (i) Peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrogenoperoxidasa como sustrato, en donde la hidrogenoperoxidasa oxida un precursor colorante (p. ej., ortofeniléndiamina (OPD) o hidrocloreuro de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)); (ii) fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromogénico; y (iii)  $\beta$ -D-galactosidasa ( $\beta$ -D-Gal) con un sustrato cromogénico (p. ej., p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosidasa. Otras numerosas combinaciones enzima-sustrato se encuentran disponibles para los expertos en la técnica (véanse, p. ej., las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.275.149 y 4.318.980 para una revisión general).

A veces, una marca se conjuga indirectamente con el anticuerpo. El experto en la materia será consciente de diversas técnicas para lograr esto. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de marcas mencionadas anteriormente se puede conjugar con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a la avidina y por lo tanto, la marca se puede conjugar con el anticuerpo de esta manera indirecta. Alternativamente, para conseguir la conjugación indirecta de la marca con el anticuerpo, el anticuerpo se puede conjugar con un pequeño hapteno (p. ej., digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcas mencionados anteriormente se pueden conjugar con un anticuerpo anti-hapteno (p. ej., anticuerpo anti-digoxina). Por lo tanto, se puede lograr la conjugación indirecta de la marca con el anticuerpo.

No es necesario que el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  esté marcado, y la presencia del mismo se puede detectar utilizando un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ . Se pueden emplear anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  en cualquier procedimiento de análisis conocido, tales como análisis de unión competitiva, análisis sándwich directos e indirectos, y análisis de inmunoprecipitación (véase, p. ej., Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, págs.147-158 (CRC Press, Inc. 1987)). Los análisis de unión competitiva dependen de la capacidad de un patrón marcado para competir con el analito de la muestra de ensayo por la unión

con una cantidad limitada de anticuerpo. Por ejemplo, la cantidad de proteína integrina  $\alpha 2\beta 1$  en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos generalmente se insolubilizan antes o después de la competición, de modo que el patrón y el analito que se unen a los anticuerpos se pueden separar convenientemente del patrón y el analito que permanecen sin unir. Los análisis sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una porción inmunogénica diferente, o epítopo, de la proteína a detectar. En un análisis sándwich, el analito de la muestra de ensayo se une a un primer anticuerpo que está inmovilizado sobre un soporte sólido, y después un segundo anticuerpo se une al analito, formando así un complejo de tres partes insoluble (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.376.110). El segundo anticuerpo puede estar marcado a su vez con un radical detectable (p. ej., análisis sándwich directos) o pueden medirse utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con un residuo detectable (p. ej., análisis sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de análisis sándwich es un análisis ELISA, en cuyo caso el radical detectable es una enzima.

Para la inmunohistoquímica, una muestra de tejido, incluyendo una muestra de tumor, puede ser fresca o congelada o puede estar incluida en parafina y fijada con un conservante tal como formalina.

Los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  también se pueden usar para análisis de diagnóstico *in vivo*. Generalmente, el anticuerpo se marca con un radionúclido ( $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  o  $^{35}\text{S}$ ) de modo que el tejido, por ejemplo, un tumor, puede ser localizado utilizando la inmunoescintigrafía.

Por razones de conveniencia, un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  se puede proporcionar en un kit, tal como una combinación empaquetada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones, incluidas para realizar un análisis de diagnóstico. Cuando el anticuerpo está marcado con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (p. ej., un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Se pueden incluir otros aditivos en el kit, tales como estabilizantes, tampones (p. ej., un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos suministrados en el kit pueden variar ampliamente, por ejemplo, para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del análisis. Los reactivos se pueden proporcionar en forma de polvos secos, generalmente liofilizados, incluyendo excipientes, por ejemplo, que en disolución proporcionarán una disolución de reactivo que tenga la concentración apropiada.

Se puede utilizar un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  para tratar diversos trastornos asociados con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  como se describe en la presente memoria. El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  se administra por cualquier medio adecuado, incluyendo parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar, o intranasal. Si se desea para el tratamiento inmunosupresor local, se realiza la administración intralesional del anticuerpo (incluyendo la perfusión o contactando el injerto con el anticuerpo antes del trasplante de otra manera). La administración parenteral incluye intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Además, el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  se administra convenientemente mediante infusión por pulsos, por ejemplo, con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferiblemente, la dosificación se administra mediante inyecciones, más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas. Esto puede depender en parte de si la administración es breve o crónica.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se define anteriormente, de la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia anterior, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y de la discreción del médico que atiende. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad [desde aproximadamente 1 g/kg a aproximadamente 15 mg/kg o de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg] de anticuerpo es una dosis candidata inicial para la administración al sujeto, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría oscilar [desde aproximadamente 1 g/kg a aproximadamente 100 mg/kg] o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que ocurre una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia es fácilmente controlada por los expertos en la técnica.

Una composición de anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  se formulará, dosificará y administrará de una manera consistente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se vaya a tratar, el mamífero particular que se vaya a tratar, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, la programación de la administración, los resultados de los estudios farmacológicos y de toxicidad y otros factores conocidos por los médicos. La cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo que se va a administrar se determina por la consideración de los mismos, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar, o tratar un trastorno asociado con integrina  $\alpha 2\beta 1$ . Tal cantidad es preferiblemente inferior a la cantidad que es tóxica para el anfitrión o hace que el anfitrión sea significativamente más susceptible de infecciones.

No es necesario que el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  sea, pero puede ser formulado, co-administrado o

utilizado opcionalmente como una terapia coadyuvante con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. Por ejemplo, en la artritis reumatoide, el anticuerpo se puede administrar junto con un glucocorticosteroide, Remicade® o cualquier tratamiento aprobado para la artritis reumatoide. Para la esclerosis múltiple, el anticuerpo se puede administrar junto con un interferón  $\beta$ , Avonex, Copaxon, u otras terapias aprobadas para el tratamiento de los signos y síntomas de la esclerosis múltiple. Para los trasplantes, el anticuerpo se puede administrar simultáneamente o por separado con un agente inmunosupresor tal como se define anteriormente, tal como ciclosporina A, para modular el efecto inmunosupresor. Alternativamente, o además, los antagonistas de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  se pueden administrar al mamífero que padece un trastorno asociado a integrina  $\alpha 2\beta 1$ . La cantidad eficaz de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento, y de otros factores discutidos anteriormente. Estos se utilizan generalmente en las mismas dosis y con vías de administración como las utilizadas anteriormente en esta memoria o aproximadamente de 1 a 99% de las dosis empleadas hasta ahora.

Se proporciona un artículo de manufactura que contiene materiales, incluyendo un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$ , útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de manufactura comprende un recipiente y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, tubos, botellas, viales, jeringas, y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es un anticuerpo anti-integrina alfa 2. La etiqueta sobre, o asociada con, el recipiente indica que la composición se utiliza para tratar la afección de elección. El artículo de manufactura puede comprender además un segundo contenedor que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como disolución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer o disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

Los principios descritos anteriormente se han aplicado, por ejemplo, al anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  secretado por el hibridoma BHA2.1 (Hangan et al., Cancer Res, 56(13): 3142-9 (1996)). Este anticuerpo se une a la integrina  $\alpha 2\beta 1$  humana y de rata, pero no se une al homólogo murino. El anticuerpo así producido por el hibridoma BHA2.1 se denomina en la presente memoria TMC-2206 y está comercialmente disponible de Chemicon (ahora parte de Millipore, número de catálogo MAB1998). Se produjeron variantes de TMC-2206 quiméricas, incluyendo humanizadas, y se sometieron a un análisis *in vitro*. Los estudios también se llevaron a cabo *in vivo*, utilizando el anticuerpo TMC-2206 o un anticuerpo similar, incluyendo uno capaz de reconocer la integrina  $\alpha 2\beta 1$  murina. Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

#### Ejemplo 1

Se diseñaron y prepararon anticuerpos con especificidad para integrina  $\alpha 2\beta 1$ . Las secuencias previamente desconocidas de las regiones variables de un anticuerpo murino designado TMC-2206 secretado por el hibridoma BHA2.1 se determinaron como se describe en la presente memoria. Los ADNc de VH y VL se clonaron a partir de ARNm de células de hibridoma BHA2.1 por RT-PCR utilizando un conjunto de cebadores que correspondían a los aminoácidos del extremo N-terminal de la región variable murina de la cadena pesada (VH) o ligera (VL) y un segundo conjunto de cebadores correspondientes a la respectivas regiones constantes de la cadena pesada  $\gamma 1$  y ligera  $\kappa$ . La secuencia se determinó a partir de ADNc que se había sintetizado a partir de ARNm aislado de acuerdo con métodos convencionales descritos en la presente memoria.

Se aisló ARNm citoplásmico a partir de aproximadamente 1 millón ( $1 \times 10^6$ ) células de hibridoma BHA2.1 que expresaba TMC-2206 utilizando mecanismos moleculares convencionales para los expertos en la técnica. Para aislar el ARNm de poli A, las células se lisaron en tiocianato de guanidinio 5M, mezclado con oligo (dT) celulosa (Ambion, TX) y se incubaron a temperatura ambiente con agitación suave durante 60 minutos. El poli A unido a oligo (dT) celulosa se sedimentó, se lavó, después se aplicó a una columna de centrifugación de lavado (Ambion, TX). La columna se centrifugó a 3000 xg durante 1 minuto, a continuación, el ARN se hizo eluir con 200  $\mu$ L de Tris 10 mM, tampón EDTA (TE) 1 mM, pH 8,0 y se precipitó con 0,1 volúmenes de acetato de amonio 5 M ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ ) y 2,5 volúmenes de etanol del 100% a  $-20^\circ\text{C}$ . El ARN se sedimentó por centrifugación, se secó y se disolvió en agua tratada con DEPC.

Los ADNc fueron sintetizados a partir de ARNm de BHA2.1 aislado a través de la transcripción inversa iniciada con cebadores basados en el extremo N de la región variable murina de la cadena pesada (VH) o ligera (VL), y un segundo conjunto de cebadores correspondientes a regiones constantes murinas de la cadena pesada  $\gamma 1$  o ligera  $\kappa$ . La secuencia del anticuerpo de BHA2.1 era desconocida, por lo tanto, se utilizaron cebadores degenerados de anticuerpos comerciales para el extremo N de las regiones variables murinas de las cadenas ligeras y pesadas (mezcla de cebador Ligero, núm. 27-1583-01 y mezcla de cebador Pesado, núm. 27-1586-01, de Amersham Biosciences) como se muestra en la Tabla 1. Se informa que estos cebadores abarcan la composición heterogénea de aminoácidos en el extremo N de las cadenas ligeras y pesadas murinas, respectivamente. Las reacciones de RT-PCR (kit Qiagen RT) se establecieron de la siguiente manera: 0,5  $\mu$ g de ARNm, 10  $\mu$ L de tampón RT 5x, 2  $\mu$ L de 10 mM de mezcla de dNTP, 5  $\mu$ L de cada disolución de cebador 10 mM y 2  $\mu$ L de mezcla de enzimas en 50  $\mu$ L de volumen total. La reacción se inició con la transcripción inversa a  $50^\circ\text{C}$  durante 30 minutos seguido por

## ES 2 541 302 T3

5 una etapa de activación de PCR a 95°C durante 15 minutos y terminó con un programa de PCR adecuado para las mezclas de cebadores degenerados utilizadas para amplificar las regiones variables de las cadenas tanto pesadas como ligeras: 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto durante 28 ciclos con una ronda de extensión final de 10 minutos a 72°C. Las posteriores reacciones de PCR utilizaron los pares de cebadores enumerados en la Tabla 2, que fueron sintetizados por Retrogen (San Diego, CA). Todos los cebadores se enumeran 5' a 3'.

Tabla 1

Nombre del cebador	Secuencias de nucleótidos (5' - 3')
VHL-for (SEQ ID NO: 14)	CCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT
HC-rev (SEQ ID NO: 15)	GGGGCCAGTGGATAGAC
VLL-for (SEQ ID NO: 16)	CCATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAG
LCk-rev (SEQ ID NO: 17)	GTTGGTGCAGCATCAGC

Tabla 2

Nombre del cebador	Secuencias de nucleótidos (5' - 3')
Igk-S (SEQ ID NO:27)	<b>TCGAGCCACCATGGAGACAGACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGG TTCCAGGTCCACTGGAGACGCG</b>
Igk-AS (SEQ ID NO: 28)	<b>AATTTCGCGTCTCCAGTGGAACTGGAACCCAGAGCAGCAGTACCCATAGCAGG AGTGTGTCTGCTCCATGGTGGC</b>
TMC-2206-r5' (SEQ ID NO:22)	CCCGAATTCACAGGTGCAGTTGAAGGAGTCA
TMC-2206-r3' (SEQ ID NO: 23)	CGGGATCCTTAGGATCATTACCAGGAGAGTGGGA
TMC-2206-k5' (SEQ ID NO: 24)	CCCGAATTCACAATTTGTTCTCACCCAGTCT
TMC-2206-k3' (SEQ ID NO: 25)	CGGGATCCTTATCTCTAACACTCATTCTGTTGAA
TMC-2206VH-hIgL/4Fc-SaII	CTTGGTCGACGCTGAGGAGACGGTGAAGT

ES 2 541 302 T3

Nombre del cebador	Secuencias de nucleótidos (5' - 3')
(SEQ ID NO: 29)	
TMC2206VL-hKc-Sall	TCGTTTGATGTGCGACCTTGGTCCCAGCACCGAACGTGAG
(SEQ ID NO: 32)	
hlgG1/4Fc-Sall-F	TCAGCGTGCACCAAGGGCCCATCSGTCTTC
(SEQ ID NO:30)	
hlgG1/4Fc-NotI-R	AAGGGAAGCGGCCGCTTATCATTTACCCYGAGACAGGGAGAGGCTCTT
SEQ ID NO: 31)	
hKc-Sall-F	ACCAAGGTCGACATCAAACGAACTGTGGCTGCACC
(SEQ ID NO: 33)	
Kappa-F	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTT
(SEQ ID NO: 95)	
Kappa-BamHI-R	AATTCGGATCCTTACTAACAACCTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT
(SEQ ID NO: 96)	
hKc-NotI-R	AAGGGAAGCGGCCGCTTATCARCACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT
SEQ ID NO: 34)	
TliC-2206VLwt-hKc-F	AGGGTGGAGCTGAAACGAACTGTGGCTGC
(SEQ ID NO: 35)	
TMC-2206VLwt-hKc-R	TCGTTTCAGCTCCACCCTGGTCCC
(SEQ ID NO: 36)	

Se obtuvieron productos de PCR de aproximadamente 350 pb de longitud tanto para VH como para VL. Estos productos de PCR se recuperaron de un gel de agarosa al 1%, se clonaron en el vector de clonación pCR2.1-TOPO (Invitrogen, CA) y se secuenciaron.

5 La secuenciación se realizó en un secuenciador de ADN CEQ utilizando cebadores M13 directo e inverso (Invitrogen, CA). El ADN del plásmido se elaboró a partir de 1,5 ml de cultivos bacterianos utilizando kits Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Aproximadamente se utilizaron 300 ng de ADN para cada reacción de secuenciación por PCR, típicamente en un volumen de 10 µL. El ADN se desnaturalizó a 96°C durante 2 minutos y luego se mezcló con cebador de secuenciación a una concentración final de 0,3 mM. Se añadieron 4 µL de DTCS Quick Star Master Mix (Beckman Coulter, Fullerton, CA) a la mezcla y la secuenciación continuó durante 30 ciclos: 10 96°C durante 20 segundos, 50°C durante 20 segundos y 60°C durante 2 minutos. Las reacciones de secuenciación se precipitaron con etanol en presencia de acetato de sodio (NaAc), EDTA y glucógeno. El sedimento se lavó dos veces con etanol del 70%, se secó al aire y se resuspendió en 20 µL de la Disolución de Carga de Muestras (proporcionada en el kit). Se secuenciaron ocho clones de VH y VL individuales mediante técnicas convencionales, y 15 las secuencias de aminoácidos deducidas de VH (SEQ ID NO: 21) y VL (SEQ ID NO: 19) se muestran en las Tablas 3 y 4, respectivamente. Las secuencias obtenidas a partir de los ocho clones fueron idénticas excepto para los primeros uno o dos aminoácidos. En los clones de VL, Glu-Asn o Gln-Phe aparecían con la misma frecuencia. En los clones de VH, Gin o Glu aparecían con la misma frecuencia. Las secuencias se cotejaron con la base de datos BLAST de proteínas de NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>, Ye et al., Nucleic Acids Res, Jul. 1: 34 (Web Server Issue): W6-9). Todas las secuencias junto con la consulta (p. ej., VH o VL de TMC-2206) se alinearon por 20 CLUSTALW (Alineamiento de Secuencias Múltiples) en <http://clustalw.genome.jp/> (Aiyar, Methods Mol Biol, 132:

221-41 (2000)). Los insertos clonados mostraron el mejor emparejamiento con las cadenas murinas pesada (IgG1) y ligera (κ), que era del isotipo esperado. Las secuencias de las regiones VH y VL clonadas sugirieron un líder probable y secuencias de la región constante limítrofe, que se utilizaron para diseñar cebadores más exactos para clonar toda la región variable pesada y ligera de TMC-2206 a partir del ARNm del hibridoma. Todos los cebadores fueron sintetizados por Retrogen (San Diego, CA). El par de cebadores, VHL-for CCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT (SEQ ID NO: 14) y HC-rev GGGGCCAGTGGATAGAC (SEQ ID NO: 15; a partir de Fcy CH1 de ratón), se utilizó para volver a clonar la región variable de la cadena pesada y el par de cebadores, VLL -for CCATGGATTTCAAGTGCAGATTTTCAG (SEQ ID NO: 16) y LCk-rev GTTGGTGCAGCATCAGC (SEQ ID NO: 17), se utilizó para volver a clonar la región variable de la cadena ligera a partir del ARNm del hibridoma utilizando las mismas condiciones de PCR descritas anteriormente. La secuenciación de los productos confirmó que la identidad de los dos primeros residuos en VL de TMC-2206 era L1-Q y L2-F y la identidad de los dos primeros residuos en la cadena pesada era H1-Q y H2-V. Las secuencias de nucleótidos restantes fueron idénticas a las clonadas utilizando las mezclas de cebadores degenerados.

TABLA 3

Nombre	FW1	HCDR1	FW2	HCDR2
	-----1-----2-----	-----3-----	-----4-----	5-----6-----
Num. Kabat	1234567890123456789012345	6789012345	67890123456789	0123456789012345
TMC-2206 VH (SEQ ID NO:21)	QVQLKESGPGLVAPSSQSLITCTVS	GFSLTNYGIH	WVRQPPGKGLVWLG	VIWARGFTNYSALMS

Nombre	FW3	HCDR3	FW4
	-----7-----8-----9-----	-----10-----	-----11--

Nombre	FW3	HCDR3	FW4
Num. Kabat	67890123456789012ABC345678901234	567890ABC12	34567890123
TMC-2206 VH (SEQ ID NO:21)	RLIITKDNSQSQVFLKMNLSLQPDSDATYFCAR	ANDGVVYAMDY	WGGQTSVTVSS

15

TABLA 4

Nombre	FW1	LCDR1	FW2	LCDR2
	-----1-----2---	-----3-----	-----4-----	5-----
Num. Kabat	12345678901234567890123	45678901234	567890123456789	0123456
TMC-2206 VL (SEQ ID NO:19)	QFVLTQSPAPFLSASPGKVTMTC	SANS-SVNYIH	WYQQKSGTSPKKWIY	DYTKLAS

Nombre	FW3	LCDR3	FW4
	-----6-----7-----8-----	-----9-----	-----10-----
Num. Kabat	78901234567890123456789012345678	901234567	8901234567
TMC-2206 VL (SEQ ID NO:19)	GVPVRFSGSGGTSYSLTISSMETEDAATYYC	QQWTFNPLT	FGAGTRVELK

La región VL clonada fue de 106 aminoácidos y la VH fue de 119 aminoácidos de longitud. Como se muestra en las Tablas 3 y 4, hay tres CDR (CDR1-3) y cuatro marcos (FW1-4) en las regiones variables de las cadenas tanto pesada (VH) como ligera (VL) clonadas. Los marcos y la CDR se identificaron basándose en el sistema de numeración de Kabat (Kabat *et al.*, 1983), excepto que la CDR1 de la cadena pesada se definió por medio de la definición de AbM de Oxford Molecular como la que abarca los residuos 26 a 35. El soporte lógico de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (<http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/>, Martin *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 86, 9268-9272 (1.989); Martin *et al.*, Methods Enzymol., 203, 121-153 (1991); Pedersen *et al.*, Immunomethods, 1, 126 (1992); y Rees *et al.*, En Sternberg M.J.E. (Ed.), Protein Structure Prediction. Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996)) combina los sistemas de numeración de la CDR de Kabat y la región hipervariable de Chothia para definir las CDR. Para una concordancia de la numeración, las inserciones tanto en las regiones marco como en las CDR con respecto a los patrones se nombran como la posición del residuo seguida por una secuencia alfabética (p. ej., los residuos 82A, 82B, 82C se insertan entre los residuos 82 y 83 en la cadena pesada como se muestra en Tabla 3). Las secuencias tanto de VH como de VL tienen CDR3 relativamente cortas. Hay un sitio de glicosilación potencial (Asp-Ser-Ser, NSS) dentro de la CDR1 de la cadena ligera clonada. Esto es coherente con la observación de que la cadena ligera de TMC-2206 tiene un peso molecular de 29 kD por medio de SDS-PAGE que puede ser desplazado por el tratamiento endoglicosidasa a 25 kD (peso molecular típico de cadenas ligeras de anticuerpos).

Para confirmar que las secuencias clonadas representaban la VH y la VL bioactivas del anticuerpo TMC-2206, el anticuerpo purificado a partir del medio de hibridoma se sometió a secuenciación péptido N-terminal por

degradación de Edman. La secuencia de aminoácidos deducida de ambos los clones VH y VL indicó la presencia probable de una glutamina N-terminal en cada uno, que planteó la posibilidad de bloqueo N-terminal derivado de la ciclación del residuo de glutamina N-terminal para producir piroglutamato (pGlu). Por lo tanto, para eliminar cualquier glutamina terminal ciclada potencialmente, la proteína se sometió a digestión con piroglutamato aminopeptidasa utilizando una enzima tolerante calor de *Pyrococcus furiosus* termófilo antes de someter las cadenas pesada y ligera a secuenciación peptídica N-terminal. La piroglutamato aminopeptidasa purificada (0,01 U) de *Pyrococcus furiosus* (Sigma, St. Louis, MO) se reconstituyó en 50  $\mu$ L de Tampón de Digestión (fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM y ditioneitol (DTT) 10 mM). Una preparación de TMC-2206 se digirió utilizando una razón molar 1:100 de piroglutamato aminopeptidasa:proteína a 95°C durante 1 hora. Las proteínas digeridas se resolvieron utilizando un gel de SDS-PAGE al 10% patrón (Tris-glicina, BioRad Laboratories, Hercules, CA) con mercaptoacetato de sodio (0,1 g en 150 ml de Tampón de Migración) en el depósito superior. El gel se transfirió a una membrana Immobilon P PVDF (Millipore, Billerica, MA) en Tampón de Transferencia (CAPS 10 mM, pH 10,5, 0,5 g/L de DTT y 15% de metanol) a 250 mA durante 1 hora. La transferencia se tiñó utilizando una disolución fresca de Ponceau S al 0,1% en ácido acético al 1% durante 1 minuto seguido por decoloración en ácido acético al 1%. La transferencia se sometió a secuenciación de péptidos, donde se encontró que 20 de los primeros 21 aminoácidos N-terminales de la cadena ligera se secuenciaron con éxito y mostró una identidad exacta con la secuencia peptídica deducida obtenida por clonación. Esto confirmó que la identidad del primer aminoácido en el VL clonado era Glu. La VH digerida con piroglutamato aminopeptidasa no pudo proporcionar datos de la secuencia peptídica.

#### Ejemplo 2

Los anticuerpos quiméricos con especificidad para integrina  $\alpha 2\beta 1$  fueron diseñados y preparados, incluyendo anticuerpos quiméricos ratón-humano. Las regiones VH y VL del TMC-2206 clonado como se describe en el Ejemplo 1 se utilizaron para diseñar y preparar cadenas pesadas y ligeras quiméricas, respectivamente, utilizando técnicas de clonación molecular convencionales (véase, p. ej., Molecular Biology Manual por Sambrook y Russell, 2001).

Las cadenas pesadas y ligeras fueron clonadas con la introducción de sitios de restricción como sigue. Los cebadores, TMC-2206-r5' CCCGAATTCACAGGTGCAGTTGAAGGAGTCA SEQ ID NO: 22) y TMC-2206-r3' CGGGATCCTTAGGATCATTACCAGGAGAG TGGGA (SEQ ID NO: 23), se utilizaron para clonar la cadena pesada de TMC-2206 por medio de RT-PCR a partir de ARNm de hibridoma BHA2 y se utilizaron los cebadores TMC-2206-k5' CGGGATCCTTAGGATCATTACCAGGAGAG TGGGA (SEC ID NO: 24) y TMC-2206-k3' CGGGATCCTTATCTCTAACACTCATTCTGTTGAA (SEQ ID NO: 25) para clonar la cadena ligera de TMC-2206. Estos cebadores introdujeron sitios *EcoRI* y *BamHI* en los extremos 5' y 3', respectivamente, para permitir la clonación de las cadenas pesada y ligera clonadas en los vectores de expresión de mamífero pIRES2-GFP y pIRES2-Ds Red (Clontech, núms. catálogo. 632306 y 632420), respectivamente. Ambos vectores fueron diseñados para llevar una secuencia líder de Ig $\kappa$  METDTLLLWVLLLVPGGSTGD (SEQ ID NO: 26).

Para aislar el ARNm, se sedimentaron aproximadamente 1 millón de células de hibridoma que expresaban TMC-2206 a baja velocidad (10 minutos a 800 rpm), se lavaron con PBS, y se lisaron con 1 mL de Trizol (Invitrogen, CA). Después de someter a vórtice vigorosamente, la suspensión celular se extrajo con 0,2 ml de cloroformo y después de la centrifugación (14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C), el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo donde el ARN se precipitó mediante la mezcla con 0,5 mL de isopropanol seguido de centrifugación (14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C). El sedimento de ARN se lavó con 1 ml de etanol del 75% y se disolvió en 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC.

Se llevó a cabo la reacción de RT-PCR (kit Qiagen RT) como se ha descrito anteriormente utilizando 0,5  $\mu$ g de ARN, 10  $\mu$ L de tampón de RT 5x, 2  $\mu$ L de 10 mM de mezcla de dNTP, 5  $\mu$ L de cada disolución de cebador 10 mM y 2  $\mu$ L de mezcla de enzima en un volumen total de 50  $\mu$ L. Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* y los fragmentos purificados a partir de gel de agarosa al 1% se ligaron a continuación en los sitios *EcoRI/BamHI* de los vectores pIRES2-GFP (cadena pesada) y pIRES2-Ds Red (cadena ligera). La posterior secuenciación de las regiones variables confirmó que no se habían introducido mutaciones por la RT-PCR.

Se eligió pCI-neo (Promega, núm. catálogo E1841) como vector de expresión para la clonación de moléculas de anticuerpo quiméricas, incluyendo humanizadas, basándose en o derivadas de TMC-2206 como se describe a continuación. Para reducir la posibilidad de introducir mutaciones en las regiones constantes a través de PCR, se prepararon casetes de clonación tanto para VH como para VL. En primer lugar, el ADN que codifica un líder de Ig $\kappa$  (SEQ ID NO: 26) se clonó en los sitios de clonación *XhoI* y *EcoRI* de pCI-neo utilizando los oligonucleótidos Ig $\kappa$ -S (SEQ ID NO: 27) e Ig $\kappa$ -AS (SEQ ID NO: 28) enumerados en la Tabla 2, que se hibridaron entre sí y luego se ligaron directamente en pCI-neo digerido con *XhoI-EcoRI* utilizando la ligasa de T4. Esto proporcionó el vector parental para todas las etapas de clonación posteriores. A partir de esto, se elaboraron dos casetes de expresión: una para la clonación en las regiones VH adyacentes a un Fc de IgG1 humana (hFc) y la segunda para la clonación en las regiones VL aguas arriba de la región constante de la cadena kappa humana (hKc).

No se encuentran sitios *EcoRI*, *XbaI*, *HindIII* o *SaII* en las secuencias de Fc de IgG1 humana (hFc) o la región constante de la cadena kappa (hKc), por lo tanto, cualquiera de estos sitios de restricción podría ser introducido en el extremo 5' de las regiones constantes para facilitar la clonación. Se eligió *SaII* elegido como sitio de

clonación ya que esto reduciría al mínimo el número de cambios de aminoácidos en la unión variable-constante. Para la quimera de la cadena pesada, la introducción de un sitio *Sall* en la unión de VH de ratón-Fc humano se llevó a cabo sin causar ningún cambio en la secuencia de aminoácidos. En primer lugar, se elaboró un fragmento de VH *EcoRI Sall* por medio de PCR utilizando los pares de cebadores TMC-2206-R5 '(SEQ ID NO: 22) y TMC2206VH-hlgG1/4Fc-*Sall* (SEQ ID NO: 29) que se muestran en la Tabla 2 para introducir un sitio de restricción *Sall* en el extremo 3' de la secuencia de VH murina utilizando la cadena pesada clonada en el vector pIRES-GFP como molde. El Fc de IgG1 humana se obtuvo de la amplificación del ADN del clon IMAGEN 20688 (Invitrogen, núm. de catálogo 4764519) utilizando los cebadores mostrados en la Tabla 2, hlgG1/4Fc-*Sall*-F (SEQ ID NO: 30) y hlgG1/4Fc-*NotI*-R (SEQ ID NO: 31). Los dos productos de PCR fueron digeridos con *EcoRI/Sall* y *Sall/NotI*, respectivamente, se purificaron, y se ligaron con pCI-neo-Igk digerido con *EcoRI/NotI*. El vector resultante se denominó pCI-neo-Igk-TMCVH-hFc.

Para la quimera de la cadena ligera, no fue posible diseñar un sitio *saI* sin cambiar dos aminoácidos en la unión VL-kC, E105D y L106I. Esto se logró mediante la generación de un producto de PCR utilizando los cebadores mostrados en la Tabla 2, TMC-2206-k5' (SEQ ID NO: 24) y TMC2206VL-hKc-*Sall* (SEQ ID NO: 32) para amplificar la región 2206VL a partir del plásmido, pIRES-DsRed2-TMC-2206LC anterior. El producto de la PCR se digirió con *EcoRI/Sall*, se separó en un gel de agarosa al 1%, se purificó con un kit de Extracción de Gel (Qiagen) y se ligó con la región constante de la cadena ligera de Igk humana amplificada a partir del clon IMAGE núm. 4704496 (ATCC) utilizando los cebadores hKc-*Sall*-F (SEQ ID NO: 33) y hKc-*NotI*-R (SEQ ID NO: 34) y el vector descrito anteriormente, PCL-neo-Igk. El plásmido resultante se denominó pCI-neo-Igk-TMC2206VL-hKc.

Para evaluar si el cambio de dos aminoácidos en la unión VL-kC tendría impacto en la actividad del anticuerpo, se construyó una segunda quimera cadena ligera que codificaba el plásmido quimera de la cadena ligera con la secuencia de aminoácidos parental. En primer lugar, las regiones constantes de VL y kappa humana fueron amplificadas con el par de cebadores TMC-2206VLwt-hKc-R y TMC-2206-k5' (SEQ ID NOS: 36 y 24) y el par de cebadores TMC-2206VLwt-hKc-F y hKc-*NotI*-R (SEQ ID NOS: 35 y 34), respectivamente, utilizando el vector pIRES2-DsRed2-Igk-TMC2206LC anterior como un molde. En segundo lugar, el empalme mediante OCR de extensión solapante (Horton et al., Gene 77 (1): 61-8 (1989)) con los cebadores TMC-2206-k5' (SEQ ID NO: 24) y hKc-*NotI*-R (SEQ ID NO: 34) se realizó para enlazar los dos productos, y el producto final de la PCR se digirió y se clonó en pCI-neo-Igk.

Para confirmar que el anticuerpo quimérico ratón-humano clonado tenía la misma especificidad que el anticuerpo monoclonal TMC-2206 original secretado por el hibridoma BHA2.1, el anticuerpo quimérico de ratón-humano se expresó en células 293F utilizando la metodología de transfección transitoria utilizando una mezcla de transfección compuesta por partes iguales de ADN/OptiMEM y 293fectina/OptiMEM (Invitrogen). Cada disolución se elaboró con OptiMEM precalentado a temperatura ambiente. La mezcla de ADN/OptiMEM contenía 20 µg del plásmido de expresión de la cadena pesada (HC), 20 µg del plásmido de expresión de la cadena ligera (LC), y OptiMEM hasta un volumen total de 1,3 mL. La mezcla de OptiMEM 293fectina contenía 53 µL de 293fectina y OptiMEM hasta un volumen total de 1,3 mL. La mezcla 293fectina se añadió a la mezcla de ADN, se mezclaron y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de transfección de 2,6 mL se añadió a un matraz que contenía 40 mL de cultivo de células 293F en  $10^6$  células/mL. El matraz se incubó a 37°C, 8% de CO<sub>2</sub> con agitación a 120 rpm. Después de 3 días, la suspensión celular se centrifugó y se sometió inmediatamente a cromatografía de afinidad con proteína A para purificar el anticuerpo. El producto final se concentró, se analizó por SDS-PAGE y se determinó la concentración de proteína mediante análisis de Lowry.

Para confirmar que el anticuerpo quimérico ratón-humano purificado tenía la misma actividad de unión que el anticuerpo TMC-2206 parental, se sometió a ensayo el anticuerpo quimérico ratón-humano purificado para determinar su capacidad para bloquear la adherencia celular mediada por integrina  $\alpha\beta 1$ . Las células CHO que expresaban una integrina  $\alpha 2$  humana (SEQ ID NO: 8) y  $\beta 1$  de hámster endógeno (Symington et al., J Cell Biol. 120 (2): 523-35 (1993)) se separaron del matraz de cultivo por incubación en PBS libre de Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> que contenía EDTA 5 mM. Las células se centrifugaron después (1200 rpm durante 8 minutos en un rotor Beckman GH 38) y el sedimento se resuspendió en 10 mL de RPMI-1640. Se añadieron 30 µL de CFSE 17 mM (Molecular Probes, OR) a la suspensión celular y la mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos. Las células marcadas se sedimentaron a baja velocidad, se resuspendieron en 10 mL de RPMI-1640 con BSA al 0,1% y se contaron. La concentración celular se ajustó a  $8 \times 10^5$  células/ml y se mantuvieron en la oscuridad hasta su uso. Una placa recubierta con colágeno (colágeno de cola de rata Tipo I; BD Biosciences) se bloqueó con 100 µL/pocillo de BSA al 0,1% en PBS y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las muestras de proteína se diluyeron seriadamente en medio libre de suero y se añadieron 50 µL de cada disolución de anticuerpo diluido seriadamente a la placa de colágeno. A continuación se añadieron 50 µL/pocillo de células marcadas al pocillo y la placa se incubó durante 1,5 horas a 37°C. Después del lavado, las células se lisaron con Triton X-100 al 0,1% y la intensidad de fluorescencia (excitación, 485 nm; emisión, 535 nm) se leyó utilizando un contador multi-marca Victor2 1420 (Perkin-Elmer). La quimera TMC-2206 clonada fue un potente inhibidor de la adherencia celular al colágeno de tipo I mediada por  $\alpha\beta 1$  y mostró una potencia equivalente a TMC-2206 con un valor de CE50 de 1,8 nM en comparación con 1,2 nM, respectivamente. En estos experimentos, el uso de IgG de control no produjo ninguna inhibición de la unión mientras que el uso de TMC-2206 murino o el anticuerpo quimera mostró inhibición de la unión cuando se sometió a ensayo en un intervalo de concentración molar de  $10^{-11}$  a  $10^{-6}$ .

La afinidad del anticuerpo quimérico de ratón-humano por la integrina  $\alpha\beta 1$  inmovilizada también se comparó con el anticuerpo parental TMC-2206 para determinar su capacidad para competir por la unión de TMC-2206 marcado con Eu a placas recubiertas con  $\alpha\beta 1$ , p. ej., mediante la determinación de los valores de  $K_i$ . En primer lugar, se determinó la afinidad del anticuerpo parental TMC-2206 por la integrina  $\alpha\beta 1$  inmovilizada mediante la unión de equilibrio. Los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos se recubrieron con integrina  $\alpha\beta 1$  de plaquetas (recubiertos a medida  $\alpha\beta 1$  de plaquetas humanas por GTI Inc., WI) y luego se bloquearon con leche sin grasa. Para los análisis de unión y competición, se utilizaron TMC-2206 marcado fluorescentemente o anticuerpo IgG de control de isotipo. Para marcar los anticuerpos con reactivo Eu-N1-ITC, se suspendieron aproximadamente 2 mg de cualquiera de TMC-2206 o control de isotipo, MOPC-21 (Invitrogen) y se sometieron a diálisis frente a disolución salina tamponada con fosfato (PBS;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,47 mM,  $\text{MM Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM; pH 7,4, NaCl 138 mM y KCl 2,67 mM). Después de la concentración en los concentradores Microsep prelavados (corte 30-kDa; Pall Life Sciences a 9500 rpm (7000 xg) en un rotor JA-20 (Beckman Instruments, Inc.) durante 20 minutos a 4°C), los anticuerpos se ajustaron a 4,0 mg/mL con PBS que contenía una concentración final de  $\text{NaHCO}_3$  100 mM, pH 9,3. La mezcla de mAb/bicarbonato (0,250 mL) se mezcló suavemente en un vial que contenía 0,2 mg de ácido  $N^1$ -(P-isotiocianatobencil)-dietilentriamino- $N^1, N^2, N^3, N^3$ -tetraacético quelado con  $\text{Eu}^{3+}$  (Eu-N1-ITC; Perkin Elmer Life Sciences) y se hizo reaccionar durante la noche a 4°C sin agitación. Cada mezcla de anticuerpo marcado se aplicó a una columna separada PD-10 (GE Biosciences, Piscataway, NJ) pre-equilibrada Tampón de Migración (Tris 50 mM, pH 7,4 y NaCl 138 mM). Las fracciones (0,5 mL) se recogieron y se analizaron para determinar la proteína total (reactivo de Bradford; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) utilizando un lector de placa para la absorbancia SpectraMax 384 y el europio después de una dilución 1:10.000 dilución en DELFIA Enhancement Solution (Perkin-Elmer) por fluorescencia resuelta en el tiempo (TRF) utilizando un lector de placas multi-marca Victor2 (Perkin Elmer). Las fracciones que fueron positivas tanto para la proteína como para la marca de Eu se reunieron y se aplicaron a las nuevas columnas PD-10 y las muestras recogieron y se analizaron para determinar la proteína total y el contenido de europio por TRF calibrado frente a una disolución patrón de europio (Perkin-Elmer) para calcular la razón de flúor: proteína. El anticuerpo marcado con fluorescencia, ya sea Eu-TMC-2206 o Eu-IgG de control de isotipo, se aplica a continuación a las placas de microtitulación de integrina  $\alpha\beta 1$  bloqueadas en un volumen de 10  $\mu\text{L}$ /pocillo. Después de incubar las placas selladas durante 1 hora a 37°C para permitir la unión hasta alcanzar el equilibrio, se transfirieron muestras de 2  $\mu\text{L}$  de cada pocillo a un pocillo nuevo que contenía DELFIA Enhancement Solution (100  $\mu\text{L}$ /pocillo; Perkin-Elmer) para la medición de la marca libre (no unida). Se añadió Enhancement Solution (100  $\mu\text{L}$ /pocillo) a los pocillos vacíos para la medición de marcador unido. La placa se agitó (ajuste de velocidad de Titer Plate Shaker de 5 durante 5 minutos a temperatura ambiente) y las intensidades de fluorescencia resueltas en el tiempo (TRF) se leyeron utilizando un lector de placa multi-marca Victor2 (Perkin-Elmer Wallac, Boston, MA). Se calculó mediante el análisis de Scatchard que el valor de  $K_d$  era de 0.374 nM para TMC-2206.

Las potencias de unión relativa para integrina  $\alpha\beta 1$  inmovilizada se analizaron midiendo los valores de  $K_i$  en un ensayo de competición utilizando Eu-TMC-2206 marcado con fluorescencia 100 pM en presencia de concentraciones variables de anticuerpo no marcado TMC-2206 o anticuerpo quimérico como competidores, utilizando un sistema de análisis similar al descrito anteriormente. Combinaciones de anticuerpos de ensayo se aplicaron después a los pocillos recubiertos con integrina  $\alpha\beta 1$ , sometidos a ensayo en un intervalo de concentración de  $10^{-11}$  a  $10^{-7}$  M, y tras el tiempo especificado, se determinó la cantidad de Eu-TMC-2206 unido. Las curvas de inhibición se ajustaron con el modelo de "competición por un sitio" utilizando el soporte lógico Prism (GraphPad, Inc.) para obtener valores de  $\text{CI}_{50}$  y para calcular la  $K_i$  utilizando la ecuación de Cheng y Prusoff (1973) y el valor para  $K_d$  de 0,374 nM de arriba. El anticuerpo TMC-2206 parental mostró una  $K_i$  de  $0,22 \pm 0,04$  nM ( $n = 10$ ) en comparación con un valor de  $0,27 \pm 0,07$  nM ( $n = 5$ ) para la quimera de tipo salvaje (wt). La actividad de la quimera wt fue comparable a la de la forma quimérica que llevaba las dos mutaciones LC introducidas diseñando un sitio *SalI* ( $K_i$  también 0,27 nM), lo que confirma que estas mutaciones no afectaban a la actividad. En estos experimentos, los pocillos de control recubiertos con BSA, ya sea con IgG de control o con TMC-2206 no demostraron unión a ningún anticuerpo.

### Ejemplo 3

Se diseñaron y prepararon anticuerpos humanizados con especificidad para integrina  $\alpha\beta 1$ . Los residuos del anticuerpo TMC-2206 clonado que comprenden las regiones CDR de las cadenas pesada y ligera se determinaron y se prepararon variantes humanizadas como sigue. Tres regiones de hipervariabilidad dentro de las regiones marco menos variables se encuentran en las regiones variables tanto de la cadena pesada como ligera. En la mayoría de los casos, estas regiones hipervariables corresponden a las CDR, pero pueden extenderse más allá. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y ligera de TMC-2206 se especifican anteriormente en las Tablas 3 y 4, respectivamente. Las regiones CDR y marco fueron aclaradas generalmente de acuerdo con Kabat por la alineamiento con otras regiones VH y VL utilizando búsquedas generales de homología utilizando la base de datos BLAST de proteínas de NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>, Ye et al., Nucleic Acids Res, Jul. 1: 34 (Web Server Issue): W6-9)), excepto para HCDR1. La HCDR1 fue definida por la definición de AbM como la que abarca los residuos 26 a 35. El soporte lógico de modelado de anticuerpos Oxford Molecular's AbM (<http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/>, Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9268-9272 (1.989); Martin et al., Methods Enzymol., 203, 121-153 (1991); Pedersen et al., Immunomethods, 1, 126 (1992); y Rees et al., En Sternberg M.J.E. (Ed.), Protein Structure Prediction. Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996)) combina los sistemas de numeración de Kabat y Chothia en la definición de las CDR. Así, las regiones CDR de la cadena pesada

se definieron como sigue:

HCDR1	aa26 - aa 35
HCDR2	aa50 - aa65
HCDR3	aa95 - aa102

Del mismo modo, las regiones CDR de la cadena ligera se definen como sigue:

LCDR1	aa24 - aa34
LCDR2	aa50 - aa56
LCDR3	aa89 - aa97

5 Es deseable conservar la afinidad de unión del anticuerpo murino en el anticuerpo homólogo humanizado. Puede ser deseable elegir una molécula aceptora humana que comparta homología con el anticuerpo murino. Los aceptores humanos preferidos son los marcos de la línea germinal humana debido a que la falta de mutaciones somáticas puede disminuir el grado de inmunogenicidad, sin embargo, los marcos de anticuerpos maduros individuales también pueden ser utilizados como moléculasceptoras. La base de datos V-BASE (<http://base.mrc-cpe.cam.ac.uk>) proporciona una lista completa de las secuencias de la línea germinal de la cadena pesada y ligera humanas y se utilizó como una fuente de secuencias de la línea germinal humana para comparar con la VH y la VL de TMC-2206; también se utilizó la base de datos de Kabat (<http://kabatdatabase.com/>, Johnson, G. y Wu, T.T. (2001), Nucleic Acids Res., 29, 205-206).

15 La VH de TMC-2206 VH se alineó bien con tres de las 51 secuencias de la línea germinal humana en la base de datos V-BASE, 4-59, 4-61 y 4-30.4, sin secuencias que muestren un buen ajuste en el marco 3. Las longitudes de las CDR H1 y H2 4-59 fueron idénticas a las de la VH de TMC-2206, y se seleccionó 4-59 (SEQ ID NO: 39) como un marco aceptor. Portaba la misma clase de estructura canónica 1 para la CDR H1 y la CDR H2 que CDR H1 y CDR H2 de TMC-2206. Las regiones CDR3 y FW4 de VH no se incluyen en las secuencias de la línea germinal VBASE, porque parte de la CDR3 y 4 regiones marco derivan de un gen diferente y no contiguo que varía durante la maduración de cada anticuerpo. Se utilizó la secuencia del anticuerpo, CAA48104 (NCBI entry: [gi/33583/emb/CAA48104](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para proporcionar las secuencias de CDR3 y FW 4 para el alineamiento, y una secuencia de la molécula aceptora FW4. Una comparación de la VH de TMC-2206 con 4-59 y la región CDR3 y FW4 de la secuencia del anticuerpo CAA48104 se proporciona en la Tabla 5.

**TABLA 5**

Nombre	FW1	HCDR1	FW2	HCDR2
	-----1-----2-----	-----3-----	-----4-----	5-----6-----
Núm. Kabat	1234567890123456789012345	6789012345	67890123456789	0123456789012345
TMC-2206 (SEQ ID NO: 21)	QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVS	GFSLTNYGIH	WVRQPPGKGLEWLG	VIWARGFTNYSALMS
4-59 (SEQ ID NO: 39)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS	GGSISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYSGSTNYPNPSLKS

Nombre	FW3	HCDR3	FW4
	-----7-----8-----9-----	-----10-----	-----11-----

Nombre	FW3	HCDR3	FW4
Num. Kabat:	67890123456789012ABC345678901234	567890ABCDE12	34567890123
TMC-2206 (SEQ ID NO: 21)	RLIITKDNSQSQVFLKMNSLQPDSDATYFCAR	ANDGVVYAM--DY	WGQGTSLVTVSS
4-59 (SEQ ID NO: 39)	RVTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAR	HNSSSWYGRYFDY	WGQGTSLVTVSS
CAA48104 (SEQ ID, 183)		HNSSSWYGRYFDY	WGQGTSLVTVSS

La secuencia de la línea germinal, A14 (SEQ ID NO: 37), fue una de 38 secuencias de anticuerpo VL humano en la base de datos V-BASE y fue seleccionada como un marco VL aceptor. A14 está en la familia VK VI y su LCDR1 y LCDR2 están dentro de las clases canónicas 2 y 1, respectivamente. LCDR2 de TMC-2206 es también de la clase 1, aunque LCDR1 de TMC-2206 es similar, pero no idéntica, a una estructura canónica de clase 1. Las secuencias de VL de la línea germinal se extienden a través de CDR-L3, por lo que se seleccionó una secuencia adicional para FW4 de una VL humana. La secuencia seleccionada representa un gen del marco 4 utilizado comúnmente para las cadenas ligeras kappa en anticuerpos humanos maduros (p. ej., AAB24132, entrada NCBI gi/259596/gb/AAB24132; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Aunque con la introducción del sitio *SalI*, se hicieron dos cambios de aminoácidos en la secuencia durante la construcción de la quimera de la cadena ligera (E105D y L106I, que no afectan a la unión de los anticuerpos, véase más arriba), el aceptor de la cadena ligera humana FW-4 ya tenía una isoleucina en la posición 106 por lo que este cambio sólo introdujo una mutación única conservativa de aminoácidos (E105D) en las variantes humanizadas. Una comparación de la VL de TMC-2206 con A14 y la región FW4 de la secuencia del anticuerpo AAB24132 se proporciona en la Tabla 6.

TABLA 6

Nombre	FW1	LCDR1	FW2	LCDR2
	-----1-----2---	-----3----	-----4-----	5-----
Núm. Kabat:	12345678901234567890123	45678901234	567890123456789	0123456
TMC-2206 (SEQ ID NO: 19)	QFVLTQSPAFLSASPGKVTMTC	SANS-SVNYIH	WYQQRSGTSPKKWIY	DTSKSLAS
A14 (SEQ ID NO: 37)	DVVMTQSPAFLSVTPGKVTITC	QASEGIGNYLY	WYQQRPDQAPKLLIK	YASQSSIS

Nombre	FW3	LCDR3	FW4	
	---6-----7-----8-----	-9-----	-10-----	
Núm. Kabat:	78901234567890123456789012345678	901234567	8901234567	
TMC-2206 (SEQ ID NO: 19)	GVPVRFSGSGSGTSSYSLTISSEMETEDAATYYC	QQWTTNPLT	FGAGTRVELK	
A14 (SEQ ID NO: 37)	GVPSRFSGSGSGTDFFTISSLEAEEDAATYYC	QQWTTNPLT	FGQGTKVEIK	
AAB24132 (SEQ ID NO: 184)		QQGNTLPWT	FGQGTKVEIK	

Se prepararon variantes humanizadas de TMC-2206 utilizando secuencias de CDR de las secuencias VH y VL de TMC-2206 y los marcos humanos seleccionados como se describe anteriormente. Para mantener la adecuada presentación de CDR, algunos residuos canónicos de marcos aceptores (véanse, p. ej., Chothia et al., 1985, 1992; Queen et al., 1989; Foote y Winter, 1992; <http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s>) pueden ser intercambiados por los residuos canónicos murinos donadores homólogos, un proceso llamado retro-mutación. Las Tablas 7 y 8 enumeran los residuos que pueden afectar a la conformación de CDR y al empaquetamiento entre cadenas, respectivamente, y muestran diferencias entre los residuos de VH y VL de TMC-2206 donador y los correspondientes residuos del marco aceptor humano (resaltado en negrita y cursiva). El residuo L46 marcado con un asterisco en la Tabla 8 puede jugar un papel tanto en la presentación de la estructura canónica de CDR como en el empaquetamiento entre cadenas.

Como se muestra en las Tablas 7 y 8, once residuos del marco que afectan a la presentación canónica de CDR y dos residuos que afectan al empaquetamiento entre cadenas difieren entre el TMC-2206 donador y las secuencias de la línea germinal aceptor humana A14 y 4-59, estando el residuo L46 en ambas categorías. Específicamente, estas diferencias son las posiciones H37, H48, H67, H71, H73, H78, y H91 para la cadena pesada y L2, L4, L46, L47, L49, y L71 en las regiones del marco variable de la cadena ligera. Estos residuos fueron identificados y seleccionados como candidatos para la retro-mutación.

Tabla 7

VL			VH		
Residuos Kabat Núm.	TMC-2206	Aceptor A14	Residuos Kabat Núm.	TMC-2206	Aceptor 4-59
2	F	<b>V</b>	2	V	V
4	L	<b>M</b>	47-49	W, A, G	W, <i>I</i> , G
35-36	W, Y	W, Y	67	L	<b>V</b>

VL			VH		
Residuos Kabat Núm.	TMC-2206	Aceptor A14	Residuos Kabat Núm.	TMC-2206	Aceptor 4-59
46-49	K, W, I, Y	<b>L, L, I, K</b>	69	I	I
64	G	G	71	K	<b>V</b>
66	G	G	73	N	<b>T</b>
68-69	G, T	G, T	78	V	<b>F</b>
71	Y	<b>F</b>	93-94	A, R	A, R
98	F	F	103	W	W

Tabla 8

VL			VH		
Residuos Kabat Núm.	TMC-2206	Aceptor A14	Residuos Kabat Núm.	TMC-2206	Aceptor 4-59
34	H	Y	35	H	S
36	Y	Y	37	V	<b>I</b>
38	Q	Q	39	Q	Q
44	P	P	45	L	L
46 *	K	<b>L*</b>	47	W	W
87	Y	Y	91	F	<b>Y</b>
89	Q	Q	93	A	A
91	W	G	95	A	H
96	L	L	100c	M	R
98	F	F	103	W	W

\* Mutación que también afecta a la conformación de CDR

5 Las 13 retro-mutaciones candidato identificadas, con 11 que afectan a la presentación de una estructura canónica apropiada y 2 que afectan al empaquetamiento entre cadenas, se incluyeron en la primera variante humanizada de TMC-2206. Además una Q amino terminal se mantuvo en la VL humanizada. Esta posición se mantuvo con la identidad murina debido a que es adyacente a la Phe en L2, que es un aminoácido inusual para esta posición. Estas variantes de cadena ligera y cadena pesada humanizadas se denominaron TMC-2206VH1.0 y TMC-2206VL1.0. Se prepararon variantes humanizadas adicionales con un menor número de retro-mutaciones cambiando los residuos murinos de nuevo a los residuos del marco humano. De esta manera, se identificaron los residuos del marco que fueron sensibles a una reversión al residuo humano (en términos de mantenimiento de la potencia de los anticuerpos). En paralelo, se realizó un modelado por ordenador para ayudar en la selección de los residuos candidato para cambiar de nuevo al homólogo humano.

10

Se utilizaron los vectores de expresión pCI-neo quimera de la cadena ligera y la cadena pesada descritos en el Ejemplo 1 para la expresión de todas las variantes humanizadas. La versión 1.0 de la VH de TMC-2206 humanizada (hVH1.0, SEQ ID NO: 40) y la versión 1.0 de la VL humanizada (hVL1.0, SEQ ID NO: 41) que incorporan las 14 retro- mutaciones definidas anteriormente se tradujeron a una secuencia de nucleótidos optimizada para la expresión en células de mamífero utilizando el soporte lógico Vector NTI. Estas secuencias se sintetizaron a medida en tándem dentro de un único constructo plasmídico por medio de Retrogen (San Diego, CA) y se clonaron en los sitios *EcoRI* y *SalI* de los vectores de expresión LC y HC de TMC-2206 parentales reemplazando las regiones VH y VL de ratón. Específicamente, la digestión con *EcoRI-SalI* del ADN plasmídico dio como resultado dos fragmentos de diferentes tamaños, siendo el más grande hVH1.0 y el fragmento pequeño hVL1.0. Estos dos fragmentos se clonaron a continuación en los sitios *EcoRI* y *SalI* de los vectores de expresión LC y HC quiméricos de pCI-TMC-2206 parentales, reemplazando las regiones VH y VL de ratón, respectivamente, después de la digestión con *EcoRI* y *SalI* y la purificación en gel del fragmento grande de pCI-neolgg-TMC2206VG-hFc y pCI-neolgg-TMC-2206VLhkc, respectivamente. Esta estrategia se utilizó para la preparación de variantes posteriores. Los plásmidos resultantes contenían el líder de Igk, la secuencia de inicio de la traducción de Kozak óptima, la región variable y una región constante humana.

La variante con la versión 1.0 de la VH de TMC-2206 humanizado (SEQ ID NO: 40) y la versión 1.0 de la VL humanizada (SEQ ID NO: 41) como se describe anteriormente se sometió a ensayo para determinar la actividad en un análisis de adherencia celular mediada por integrina  $\alpha\beta 1$  y en un análisis de competición para determinar la unión a la integrina  $\alpha\beta 1$  inmovilizada junto con la quimera y el anticuerpo TMC-2206 original tal como se describe en el Ejemplo 2. El valor de  $K_i$  para el prototipo humanizado fue de 0,32 nM, que era comparable con la  $K_i$  medida del anticuerpo TMC-2206 parental (0,21 nM), así como con la quimera (0,27 nM), indicando que esta primera versión humanizada conservaba la afinidad de unión. Del mismo modo, el primer prototipo humanizado mostró una actividad inhibitora comparable con el anticuerpo TMC-2206 parental en el bloqueo de la adherencia celular mediada por  $\alpha\beta 1$  al colágeno (p. ej.,  $CE_{50}$  de 1,5 nM para ambas).

Utilizando los datos generados por la variante de la versión 1.0, se realizaron una serie de mutaciones de nuevo a los residuos del marco de VH y VK humanas utilizando la metodología de PCR y se determinó un número mínimo de retro-mutaciones (residuos murinos) para evitar comprometer la especificidad y la afinidad del mAb TMC-2206 original. Las variantes humanizadas deseables incluyen aquellas que conservan la actividad biológica del anticuerpo murino parental y también contienen menos residuos murinos para disminuir la inmunogenicidad potencial.

Las secuencias cebadoras individuales se sintetizaron por medio de Sigma-Genosys y sus secuencias se enumeran en la Tabla 9. Los pares de cebadores y los moldes utilizados para las variantes generadas se muestran en las Tablas 10 y 11. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando las siguientes condiciones: Cebador 1 y 2 (concentración final 0,6  $\mu$ M), dNTP (concentración final 1 mM), molde de ADN (1 a 10 ng), y 1 unidad de ADN polimerasa Pfx (Invitrogen, CA) típicamente en un volumen final de 50  $\mu$ L. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos siendo cada ciclo de 95°C durante 30 segundos, 56°C durante 45 segundos y 68°C durante un minuto y medio. La etapa final fue a 68°C durante 10 minutos.

Tabla 9

Nombre del cebador	Secuencias de nucleótidos (5' - 3')
hVH3.0-F (SEQ ID NO: 42)	AGCGTGGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTG
hVH3.0-R (SEQ ID NO: 43)	GTTCTTGCTGGTGTCCACGCTGATGGTCACGCGGGACATGAGAGCGCTGTT
hVH4.0-F (SEQ ID NO: 44)	CCTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCGTGATATGGGCTCGCGGC
hVH4.0-R (SEQ ID NO: 45)	CTCCAGGCCCTTGCTGGAGGCTGGCGTATCCAGTGGATGCCATAGTTGGT
hVL3.0-F	CCCAAGCTCCTGATCTATGACACTTCCAAGCTG

ES 2 541 302 T3

Nombre del cebador	Secuencias de nucleótidos (5' - 3')
(SEQ ID NO: 46)	
hVL3.0-R (SEQ ID NO: 47)	AGTGTCATAGATCAGGAGCTTGGGGCCTGGTCGGGCTTCTG
hVL4.0-F (SEQ ID NO: 48)	GACGCGAATTCAGACGTGGTGATGACCCAGTCTCCAGCATTCTG
hVH2.0-F (SEQ ID NO: 49)	GTGACCATCAGCAAGGACAACAGC
hVH2.0-R (SEQ ID NO: 50)	GCTGTTGTCCTTGCTGATGGTCACGCGGGACATGAGAGCGCTGTT
hVH5.0-F (SEQ ID NO: 51)	ATCGGCGTGATATGGGCTCGCGGCTTC
hVH5.0-R (SEQ ID NO: 52)	GCCGCGAGCCCATATCACGCCGATCCACTCCAGGCCCTTGCCTGG
hVH6.0-F (SEQ ID NO: 53)	ATATGGGCTCGCGGCTTCACAAAC
hVH6.0-R (SEQ ID NO: 54)	GTTTGTGAAGCCGCGAGCCCATAT
hVH7.0-F (SEQ ID NO: 55)	GCCGCGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGCCAACGACGGG
hVH7.0-R (SEQ ID NO: 56)	GTAGTACACGGCGGTGTCCGCGGCGGT
hvh8.0-f (SEQ ID NO: 57)	ATATCCAACATATGGCATCCACTGGGTT
hVH8.0-R (SEQ ID NO: 58)	CCAGTGGATGCCATAGTTGGATATGCTAAATCCAGAGACGGTACAGGT
VH12.0.(K71V)-F (SEQ ID NO: 97)	GCCTGACCATCAGCGTGGACAACAGCAAGAACCAGGTGAG
VH12.0-(K71V)-R (SEQ ID NO: 98)	CTCACCTGGTTCTTGCTGTTGTCCACGCTGATGGTCAGGC
VH13.0-(N73T)-F	CTGACCATCAGCAAGGACACCAGCAAGAACCAGGTGAGCC

ES 2 541 302 T3

Nombre del cebador	Secuencias de nucleótidos (5' - 3')
(SEQ ID NO: 99)	
VH13.0-(N73T)-R (SEQ ID NO: 100)	GGCTCACCTGGTTCTTGCTGGTGTCTTGCTGATGGTCAG
VH14.0-(V78F)-F (SEQ ID NO: 101)	GCAAGGACAACAGCAAGAACCAGTTTAGCCTGAAGCTGAGC
VH14.0-(V78F)-R (SEQ ID NO: 102)	GCTCAGCTTCAGGCTAAACTGGTTCTTGCTGTTGTCCTTGC
hVL2.0-R (SEQ ID NO: 59)	CAGCTTGGAAGTGTATAGATCAATTTCTTGGGGCCTGGTCGGG
hVL5.0-F (SEQ ID NO: 60)	GACGCGAATTCAGAC TTCGTGCTGACCCAGTCTCCAGCATTCTG
hVL6.0-F (SEQ ID NO: 61)	GACGCGAATTCACAG TTCGTGATGACCCAGTCTCCAGCATTCTG
hVL7.0-F (SEQ ID NO: 62)	GACGCGAATTCAGACTTCGTGATGACCCAGTCTCCAGCATTCTG
hVL8.0-F (SEQ ID NO: 63)	TTCACCTTCACCATCAGCAGCCTGGAG
hVL8.0-R (SEQ ID NO: 64)	CTCCAGGCTGCTGATGGTGAAGGTGAAGTCGGTGCCGCTGCCGCTGCC
VH12.0-(K71V)-F (SEQ ID NO: 97)	GCCTGACCATCAGCGTGGACAACAGCAAGAACCAGGTGAG
VH12.0-(K71V)-R (SEQ ID NO: 98)	CTCACCTGGTTCTTGCTGTTGTCCACGCTGATGGTCAGGC
hLCQ3-F (SEQ ID NO: 65)	CCAATCAAGCGTGAACCTACATTCACTGG
hLCQ3-R (SEQ ID NO: 66)	CCAGTGAATGTAGTTCACGCTTGATTGGGCGCTGCAGGTGATGGTCAC
Igk-For (SEQ ID NO: 67)	ACTCCTGCTATGGGTACTGCTGC
hIgG1Fc-CH1-R	GAAGTAGTCCTTGACCAGGCAG

ES 2 541 302 T3

Nombre del cebador	Secuencias de nucleótidos (5' - 3')
(SEQ ID NO: 68)	
CI-neo-msc3' (SEQ ID NO: 69)	TTTCACTGCATTCTAGTTGTGG

Tabla 10

<b>Variantes VH</b>	<b>Cebadores Fragmento 1</b>	<b>PCR para</b>	<b>Cebadores Fragmento 2</b>	<b>PCR para</b>	<b>Cebadores Fragmento 3</b>	<b>PCR para</b>	<b>VH completa</b>
2.0	Igk-For y hVH2.0-R		hVH2.0-F y hlgG1 Fc-CH1-R		Igk-For y hlgG1 Fc-CH1-R		
3.0	Igk-For y hVH3.0-R		hVH3.0-F y hlgG1 Fc-CH1-R		Igk-For y hlgG1 Fc-CH1-R		
4.0	Igk-For y hVH4.0-R		hVH4.0-F y hlgG1 Fc-CH1-R		Igk-For y hlgG1 Fc-CH1-R		
5.0	Igk-For y hVH5.0-R		HVH5.0-F y hlgG1 Fc-CH1-R		Igk-For y hlgG1 Fc-CH1-R		
6.0	Igk-For y hVH6.0-R		hVH6.0-F y hlgG1 Fc-CH1-R		Igk-For y hlgG1 Fc-CH1-R		
7.0	Igk-For y hVH7.0-R		hVH7.0-F y hlgG1 Fc-CH1-R		Igk-For y hlgG1 Fc-CH1-R		
8.0	Igk-For y hVH8.0-R		hVH8.0-F y hlgG1 Fc-CH1-R		Igk-For y hlgG1 Fc-CH1-R		
9.0	Igk-For y hVH7.0-R		hVH7.0-F y hlgG1 Fc-CH1-R		Igk-For y hlgG1 Fc-CH1-R		
10.0	Igk-For y hVH7.0-R		hVH7.0-F y hlgG1 Fc-CH1-R		Igk-For y hlgG1 Fc-CH1-R		
11.0	Igk-For y hVH2.0-R		hVH2.0-F y hlgG1 Fc-CH1-R		Igk-For 8 hlgG1 Fc-CH1-R		
12.0	Igk-For y VH12.0-R		VH12.0-F y hlgG1Fc-CH1-R		Igk-For y hlgG1 Fc-CH1-R		
13.0	Igk-For y VH13.0-R		VH13.0-F y hlgG1Fc-CH1-R		Igk-For y hlgG1 Fc-CH1-R		
14.0	Igk-For y VH14.0-R		VH14.0-F y hlgG1Fc-CH1-R		Igk-For y hlgG1 Fc-CH1-R		

Tabla 11

<b>Variantes VL</b>	<b>Cebadores Fragmento 1</b>	<b>PCR para</b>	<b>Cebadores Fragmento 2</b>	<b>PCR para</b>	<b>Cebadores Fragmento 3</b>	<b>PCR para</b>	<b>VL completa</b>
2.0	Igk-For y hVL2.0-R		hVL2.0-F y CI-neo-msc3'		Igk-For y CI-neo-msc3'		
3.0	Igk-For y hVL3.0-R		hVL3.0-F y CI-neo-msc3'		Igk-For y CI-neo-msc3'		
4.0	N/A		N/A		hVL4.0-F y CI-neo-msc3'		
5.0	N/A		N/A		hVL5.0-F y CI-neo-msc3'		

ES 2 541 302 T3

Variantes VL	Cebadores Fragmento 1 PCR para	Cebadores Fragmento 2 PCR para	Cebadores PCR para VL completa
6.0	N/A	N/A	hVL6.0-F y Cl-neo-msc3'
7.0	N/A	N/A	hVL7.0-F y Cl-neo-msc3'
8.0	Igk-For y HVL8.0-R	hVL8.0-F y Cl-neo-msc3'	Igk-For y Cl-neo-msc3'
9.0	Igk-For y hVL2.0-R	hVL2.0-F y Cl-neo-msc3'	Igk-For y Cl-neo-msc3'
10.0	Igk-For y hVL8.0-R	hVL8.0-F y Cl-neo-msc3'	Igk-For y Cl-neo-msc3'
11.0	Igk-For y hVL8.0-R	HVL8.0-F y Cl-neo-msc3'	Igk-For y Cl-neo-msc3'
12.0	Igk-For y VL12.0-R	VL12.0-F y Cl-neo-msc3'	Igk-For y Cl-neo-msc3'

La Tabla 12 enumera variantes de VH y la Tabla 13 enumera variantes de VL y compara los marcos aceptores humanos seleccionados con las variantes de VH y VL iniciales (1.0). Las variantes de VH enumeradas en la Tabla 12 incluyen: hVH1.0 (SEQ ID NO:21); hVH2.0 (SEQ ID NO:70); hVH3.0 (SEQ ID NO:71); hVH4.0 (SEQ ID NO:72); hVH5.0 (SEQ ID NO:73); hVH6.0 (SEQ ID NO:74); hVH7.0 (SEQ ID NO:75); hVH8.0 (SEQ ID NO:76); hVH9.0 (SEQ ID NO:77); hVH10.0 (SEQ ID NO:78); hVH11.0 (SEQ ID NO:79); hVH12.0 (SEQ ID NO:109); hVH13.0 (SEQ ID NO:110); hVH14.0 (SEQ ID NO:111). Las variantes de VL enumeradas en la Tabla 13: hVL1.0 (SEQ ID NO:41); hVL2.0 (SEQ ID NO:80); hVL3.0 (SEQ ID NO:81); hVL4.0 (SEQ ID NO:82); hVL5.0 (SEQ ID NO:83); hVL6.0 (SEQ ID NO:84); hVL7.0 (SEQ ID NO:85); hVL8.0 (SEQ ID NO:86); hVL9.0 (SEQ ID NO:87); hVL10.0 (SEQ ID NO:88); hVL11.0 (SEQ ID NO:89); hVL12.0 (SEQ ID NO:108). Los residuos murinos conservados se indican en **negrita**. También se muestra cada variante adicional construida (véase más abajo). Cada variante mostrada en la Tabla 12 de más abajo VH1.0 tiene la misma secuencia que VH1.0 (indicada por un guión [-]) a menos que se muestre una sustitución de aminoácido específica, que cambia el residuo murino conservado al homólogo del marco humano. De un modo similar, cada variante de VL mostrada en la Tabla 13 tiene la misma secuencia que la variante VL1.0 excepto por las sustituciones de aminoácidos específicas indicadas.

Tabla 12

Nombre	FW1	CDR1	FW2	CDR2
Kabat	-----1-----2-----	---3---	---4---	5-----6-----
TMC-2206 VH	<b>QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVS</b>	<b>GFSLTNYGIH</b>	<b>WVRQPPGKGLEWLG</b>	<b>VIWARGFTNYNSALMS</b>
4-59 VH	<b>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS</b>	<b>GGSISSYYWS</b>	<b>WIRQPPGKGLEWIG</b>	<b>YIYYSGSTNYNPSLKS</b>
hVH1.0	<b>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS</b>	<b>GFSLTNYGIH</b>	<b>WVRQPPGKGLEWLG</b>	<b>VIWARGFTNYNSALMS</b>
hVH2.0	-----	-----	-----	-----
hVH3.0	-----	-----	-----	-----
hVH4.0	-----	-----	-I-----I-	-----
hVH5.0	-----	-----	-----I-	-----
hVH6.0	-----	-----	-----I-	-----
hVH7.0	-----	-----	-----	-----
hVH8.0	-----	---IS---	-----	-----
hVH9.0	-----	-----	-----	-----
hVH10.0	-----	-----	-----	-----
hVH11.0	-----	-----	-----	-----
hVH12.0	-----	-----	-I-----	-----
hVH13.0	-----	-----	-----I-	-----
hVH14.0	-----	-----	-I-----	-----

Nombre	FW3	CDR3	FW4
Kabat	----7-----8--ABC-----9----	-----10-----	-----11--
TMC-2206 VH	RLIITKDNSQSQVFLKMNSLQPDDSATYFCAR	ANDGVYYAM DY	WGQGTSLVTVSS
4-59 VH	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	HNSSSWYGRYFDY	WGQGTSLVTVSS
hVH1.0	RLTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYFCAR	ANDGVYYAM DY	WGQGTSLVTVSS
hVH2.0	-V-----	-----	-----
hVH3.0	-V--V-T---F-----	-----	-----
hVH4.0	-----	-----	-----
hVH5.0	-----	-----	-----
hVH6.0	-V-----	-----	-----
hVH7.0	-----Y---	-----	-----
hVH8.0	-----	-----	-----
hVH9.0	----V-----	-----	-----
hVH10.0	-----T-----	-----	-----
hVH11.0	-----F-----	-----	-----
hVH12.0	-----Y---	-----	-----
hVH13.0	-V-----Y---	-----	-----
hVH14.0	-V-----Y---	-----	-----

TABLA 13

Nombre	FW1	CDR1	FW2	CDR2
Kabat	-----1-----2---	-----3-----	-----4-----	5-----
TMC-2206 VL	QFVLTQSPAFLSASPGKXVTNVC	SANSS VNYIH	WYQQKSGTSPKRWIY	DTSKLAS
A14 VL	DVVMTQSPAFLSVTPGKXVTITC	QASEGIGNYLY	WYQQKPDQAPRLLIK	YASQSIG
hVL1.0	QFVLTQSPAFLSVTPGKXVTITC	SANSS VNYIH	WYQQKPDQAPRWIY	DTSKLAS

Nombre	FW1	CDR1	FW2	CDR2
hVL2.0	-----	-----	-----L--	-----
hVL3.0	-----	-----	-----LL--	-----
hVL4.0	DV-M-----	-----	-----	-----
hVL5.0	D-----	-----	-----	-----
hVL6.0	--M-----	-----	-----	-----
hVL7.0	D--M-----	-----	-----	-----
hVL8.0	-----	-----	-----	-----
hVL9.0	-----	-----	-----X	-----
hVL10.0	D--M-----	-----	-----L--	-----
hVL11.0	D--M-----	-----	-----	-----
hVL12.0	D--M-----	-----	-----L--	-----

Nombre	FW3	CDR3	FW4
Kabat	---6-----7-----8-----	---9-----	---10-----
TMC-2206 VL	GVPSRFSGSGSGTSYSLTISSMETEDAATYYC	QQWTTNPLT	FGAGTRVELK
A14 VL	GVPSRFSGSGSGTDFTFITISLSLEAEDAATYYC	QQGNKHPLT	FGQGTKVEIK
hVH1.0	GVPSRFSGSGSGTDFTFITISLSLEAEDAATYYC	QQWTTNPLT	FGQGTKVEIK
hVL2.0	-----	-----	-----
hVL3.0	-----	-----	-----
hVL4.0	-----	-----	-----
hVL5.0	-----	-----	-----
hVL6.0	-----	-----	-----
hVL7.0	-----	-----	-----
hVL8.0	-----F-----	-----	-----
hVL9.0	-----	-----	-----
hVL10.0	-----	-----	-----
hVL11.0	-----F-----	-----	-----
hVL12.0	-----F-----	-----	-----

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de TMC-2206 con secuencias de la línea germinal mostró una agrupación de residuos del marco que habían sido retro-mutados al equivalente murino en la variante de TMC-2206 humanizada inicial (TMC-2356)]. Como se muestra en el alineamiento, hubo dos agrupaciones que cayeron dentro FW2 y FW3 en la cadena pesada, y de manera similar hubo dos agrupaciones, uno situado en FW1 y uno en FW2, en la cadena ligera. Dos variantes de hVH y hVL que contenían retro-mutaciones a residuos humanos en los sitios de interés fueron las variantes 3.0 y 4.0, diseñadas para transportar agrupaciones de mutaciones para ayudar a definir las regiones en las que los residuos de interés podrían mentir (Tablas 12 y 13). Además de las diferencias en los residuos resaltados en las Tablas 7 y 8 para las regiones VL, la posición L1 se cambió a Asp humano en VL4.0, ya que este es un residuo común para las cadenas ligeras  $\kappa$  humanas. Las cadenas pesadas hVH3.0 y hVH4.0 fueron co-transfectadas con las cadenas ligeras hVL3.0 y hVL4.0 en varias combinaciones VH/VL y los anticuerpos resultantes se compararon con el anticuerpo hVH1.0/hVL1.0 descrito anteriormente para determinar la afinidad por el ligando mediante comparaciones de cabeza a cabeza con el anticuerpo monoclonal TMC-2206 sin marcar. En la Tabla 14, los residuos de la versión 1.0 de VH o VL humanizadas que se revirtieron a los residuos humanos se indican en *negrita* y *cursiva*. Los números entre paréntesis en la Tabla 14 representan la multiplicidad de cambio de potencia en comparación con la variante hVH1.0, hVL1.0.

TABLA 14

VH \ VL	hVH1.0 Valores $K_i$ [nM]	hVH3.0 (H67, H71, H73, H78) Valores $K_i$ [nM]	hVH4.0 (H37, H48) Valores $K_i$ [nM]
hVL1.0	0,33	12,0 (36x)	0,44 (1,3x)
hVL3.0 (L46, L47)	0,64 (1,9x)	202 (631x)	1,34 (4,2x)
hVL4.0 (L1, L2, L4)	1,40 (4,2x)	118 (358x)	2,60 (7,9x)

A partir de los valores de  $K_i$  resultó evidente que los cambios en la variante VH 3.0 (residuos humanos insertados en H67, H71, H73 y H78, denominada agrupación FW-3) indujeron una gran disminución en la potencia en los anticuerpos que contenían hVH3.0; del mismo modo, también se observó una disminución para las variantes hVL4.0 (residuos humanos insertados en L1, L2 y L4, denominada agrupación FW-1). Excepto para los anticuerpos combinados hVH1.0/hVL3.0 y hVH4.0/hVL1.0, que mostraron una multiplicidad de cambio de 1,9 y 1,3 en la potencia cuando se compararon con el anticuerpo hVH1.0/hVL1.0, respectivamente, todas las combinaciones restantes mostraron una disminución mayor que 4 veces en la potencia (Tabla 14). Estos datos indicaron que las retromutaciones H37 (V a I) y H48 (L a I), ambas las cuales son cambios de aminoácidos conservativos, fueron bien toleradas. Los cambios L46 (K a L) y L47 (W a L) de los residuos murinos de nuevo a los residuos humanos fueron razonablemente bien tolerados en combinación con hVH1.0 pero tuvieron un efecto adverso sinérgico marcada sobre la afinidad de los anticuerpos cuando se combinaban con la variante hVH3.0.

El examen de las diferencias en los residuos que existían entre los marcos de VH y VL humanas y murinas indicó que había algunos cambios conservativos. Adicionalmente, se realizó un modelado tridimensional por ordenador de VH y VL de TMC-2206 murino, las moléculasceptoras humanas, y las estructuras hVH 1.0 y hVL 1.0. Para guiar el modelado por ordenador, se realizó una búsqueda BLAST para identificar las estructuras de la base de datos que se ajustaban más a VL y VH de TMC-2206. La estructura ISY6.pdb (resolución 2,0 Å) se seleccionó para

la VL de TMC-2206 y la estructura IGIG.pdb (resolución 2,3 Å) se seleccionó para la VH de TMC-2206. Para la molécula aceptora de la cadena ligera humana A14, se seleccionó la estructura ICE1.pdb (resolución 1,9 Å) mientras para la molécula aceptora de la cadena pesada VH humana, se seleccionó 4-59, IDN0 (resolución 2,3 Å).

5 El modelado predijo que era probable que los residuos murinos conservados en al VL 1.0 humanizada contactaran con el antígeno, excepto dos (L1 y L4). Los modelos también indicaron que los residuos del marco de la línea germinal humana conservados no contactaban con las CDR mientras los residuos del marco murino conservado se agrupaban generalmente en torno a las CDR.

10 En las regiones variables de cadena pesada, se identificaron tres áreas de diferencia entre las regiones VH murinas y humanas modeladas. La primera área eran los residuos H27-H33 que se predijo que era probable que contactaran con el antígeno y CDR H1. Estos residuos también pueden afectar el ángulo de la interfaz VLNH y tener efectos indirectos adicionales sobre la unión al antígeno. La segunda área fue el primer bucle de CDR H2 que puede requerir el residuo H71 de FW. La tercera área fue CDR H3.

15 Para las regiones de cadena ligera, también se observaron tres áreas de diferencia entre las estructuras de VL murinas y humanas modeladas. La primera estructura era CDR1 que era un residuo más larga en la VL de TMC-2206 murino. La Y murina en L71 (F en A14) fue útil para dar cabida a esta diferencia. La segunda área era el bucle murino L40 a L43 que fue empujado hacia afuera aún más en el disolvente en comparación con el humano lo que indicó que L40-43 humano podría ser problemático, aunque la actividad del primer prototipo humanizado demostró que estas retro-mutaciones fueron toleradas en hVH 1.0. La tercera área eran los residuos del marco humano L55 a L59 que estaba desplazado con relación a la estructura murina. Se predijo que el residuo L73 del marco (L en el murino, F en el humano) era responsable de esta diferencia, aunque la retro-mutación fue tolerada en hVL1.0.

20 Utilizando el análisis *in silico*, se predijeron los resultados para los residuos de la cadena pesada específica de interés y se resumen en la Tabla 15 a continuación. Resultados similares para los residuos de la cadena ligera de interés se enumeran en la Tabla 16.

Tabla 15

Residuo	Murino	Humano	Posición	Tipo de cambio
H37	V	I	Posiblemente en la interfaz VHNL	Conservativo
H48	L	I	Interior, lejos del sitio de unión, cerca de H67	Conservativo
H67	L	V	Interior, lejos del sitio de unión, cerca de H48	Conservativo
H71	K	V	Detrás de los residuos H53-H55 de CDR H2	Grande
H73	N	T	Detrás de CDR H2, solvatado, cerca de H71	Moderado
H78	V	F	Contacta con el residuo H34 de CDR H1, enterrado	Grande
H91	F	Y	En la interfaz VH/VL	Conservativo

25

Tabla 16

Residuo	Murino	Humano	Posición	Tipo de cambio
L1	Q	D	Detrás de CDR L3, solvatado	Conservativo
L2	F	V	Contactos profundos con CDR L3, parcialmente solvatado	Grande
L4	L	M	Detrás de CDR L3, parcialmente solvatado	Conservativo
L46	K	L	En la interfaz VH/VL	Grande

Residuo	Murino	Humano	Posición	Tipo de cambio
L47	W	L	Interior VL detrás de CDR L2	Grande
L49	Y	K	Posibles contactos directos con el antígeno	Grande
L71	Y	F	Detrás de CDR L1	Conservativo

Utilizando el análisis *in silico*, se accedió a las posiciones y se clasificaron con el fin de reflejar la probabilidad de que una sustitución humana pudiera causar un efecto sobre el rendimiento del anticuerpo: H48, H67 < H37, H91 < H73 < H78, H71. En esta clasificación, se predijo que muy probablemente una retro-mutación humana en la posición H48 sería la mejor tolerada, mientras que se predijo que una retro-mutación en las posiciones H78 o H71 sería la menos tolerada. Del mismo modo, se predijo el orden siguiente para las posiciones de interés dentro de la región de la cadena ligera: L1 < L4 < L71 < L2 < L47 < L46 < L49. En general, estas clasificaciones estaban de acuerdo con los valores de  $K_i$  obtenidos con las variantes hVH3.0, hVH4.0 y hVL4.0. Sin embargo, se observó una diferencia entre los efectos de la sustitución pronosticados por el modelado por ordenador y los efectos observados encontrados con las variantes construidas en la actividad para la variante hVL3.0. Por ejemplo, la variante de anticuerpo que comprendía una combinación entre VH1.0/VL3.0 dio una actividad razonable, aunque los datos del ordenador anteriores pronosticaban que la variante hVL3.0 tendría una actividad enormemente disminuida. El impacto de los residuos del marco murino conservados se evaluaron adicionalmente mediante la construcción de variantes humanizadas adicionales, incluyendo ocho variantes VH y seis VL, cada una con una sola mutación del murino conservado con respecto a su homólogo humano. Se midieron las contribuciones relativas de los cambios a la actividad. La Tabla 12 enumera las variantes VH y la Tabla 13 enumeran las variantes VL.

Los valores de  $K_i$  que se obtuvieron para estas variantes indicaron que los residuos de ratón en H71, H78, L2 y L46 se conservaban preferiblemente para maximizar la actividad, mientras que H37, H48, H67, H91, L1, L4 y L71 se podrían cambiar por sus homólogos humanos sin dar como resultado una pérdida significativa en la actividad. El uso del modelado por ordenador, pronosticó que el cambio del residuo de ratón, L47 (Triptófano, un residuo raro para esta posición en anticuerpos humanos) y H73 tendría impacto en la unión al antígeno. Sin embargo, se predijo que el cambio a Val-L47 humano no afectaría significativamente a la unión del antígeno, y el cambio a Thr-H73 sólo causaría un cambio menor (disminución de 1,6 veces) como se mide mediante la  $K_i$ . Se predijo que L49 (Tirosina) se uniría al antígeno por medio del modelado *in silico* y se predijo que el cambio a una lisina humana causaría un gran cambio en la potencia. Sin embargo, el cambio a la lisina humana para esta posición causó solamente una disminución de 3,3 veces en la potencia medida por  $K_i$ .

Se observó un cambio significativo en la VH para el cambio en H78 de la valina murina a la fenilalanina humana, lo que causó una disminución de 70 veces en la potencia para hVH11.0, variante de hVL1.0 en comparación con hVH1.0, variante de hVL1.0 medida por  $K_i$ . El modelado indicó que este residuo juega un papel en la estructura canónica de HCDR1. Estos resultados sugieren que HCDR1 juega un papel importante en la unión al antígeno. Para maximizar la actividad, H71 también está conservado. El cambio de este residuo de Lys a Val dio como resultado una disminución de 6,4 veces la observada con hVH9.0, variante de anticuerpo hVL1.0. Además, entre los residuos canónicos de la cadena ligera, la fenilalanina de L2 fue sensible al cambio como se evidencia por la pérdida marcada en la afinidad de unión observada con la variante hVL4.0 en comparación con las variantes hVL5.0, hVL6.0 y hVL7.0. El modelado por ordenador indicó que esta Phe-L2 podía hacer un amplio contacto con LCDR3. Las búsquedas en las bases de datos de anticuerpos humanos y murinos, además, indicaron que esta Phe en la posición L2 es rara, lo que sugiere que puede representar una mutación somática que tiene un impacto en la unión al antígeno.

Esos residuos seleccionados después del análisis como se describe anteriormente por ser tolerantes a una retro-mutación se combinaron en las variantes de hVH 12,0 a 14,0 y las variantes de VL VL10.0 a 12 y la actividad de estas variantes se comparó con el anticuerpo monoclonal TMC-2206 original y el anticuerpo TMC-2206 químico ratón-humano. Los resultados indicaron que el número de residuos murinos en hVL podría reducirse a tres (p. ej., L2 [Phe], L46 [Lys] y L49 [Tyr]) sin causar ninguna pérdida de actividad de las variantes. Del mismo modo el número de residuos murinos en hVH se podría reducir de siete a tres (p. ej., H71 [Lys], H73 [Asn] y H78 [Val]) sin causar cambios estadísticamente significativos en la afinidad y la potencia. Estos resultados se resumen en la Tabla 17.

Tabla 17

VH	VL	Cambios de nuevo a humano	Núm. residuos murinos	$K_i$ (nM) Media ± DT	CE <sub>50</sub> (nM) Media ± DT

VH	VL	Cambios de nuevo a humano	Núm. residuos murinos	$K_i$ (nM)	$CE_{50}$ (nM)
				Media $\pm$ DT	Media $\pm$ DT
mAb TMC-2206		N/A		0,22 $\pm$ 0,04	118 $\pm$ 0,35
Quimera		N/A		0,26 $\pm$ 0,07	1,66 $\pm$ 0,64
1.0	1,0	N/A	14	0,27 $\pm$ 0,06	2,70 $\pm$ 1,66
1.0	1,0Q	N/A	14	0,35 $\pm$ 0,03	3,00 $\pm$ 1,20
12.0	10,0	H37, H48, H91, L1, L4, L47	8	0,29 $\pm$ 0,05	2,20 $\pm$ 0,58
12.0	10,0Q	H37, H48, H91, L1, L4, L47	8	0,31 $\pm$ 0,05	2,36 $\pm$ 1,06
14.0	10,0	H37, H48, H91, H91, L1, L4, L47	7	0,32 $\pm$ 0,07	2,90 $\pm$ 2,71
14.0	10,0Q	H37, H48, H91, H91, L1, L4, L47	7	0,29 $\pm$ 0,05	2,98 $\pm$ 1,98
14.0	12,0	H37, H48, H67, H91, L1, L4, L47, L71	6	0,38 $\pm$ 0,10	2,93 $\pm$ 1,37
14.0	12,0Q	H37, H48, H67, H91, L1, L4, L47, L71	6	0,33 $\pm$ 0,11	2,95 $\pm$ 0,32

[El análisis ANOVA con ensayo de comparación múltiple de Dunnett no mostró diferencias estadísticamente significativas con TMC-2206 o la quimera].

5 En paralelo, se construyeron homólogos a estas variantes en los que se cambió la secuencia de glicosilación consenso dentro de LCDRI. La eliminación del sitio de glicosilación (NSS a QSS) puede ser útil para la producción aguas abajo y el desarrollo del proceso. El cambio N26Q en las variantes de hVL1.0, hVL10.0 y hVL12.0 (indicado como hVL1.0Q [SEQ ID NO: 90], hVL10.0Q [SEQ ID NO: 91] y hVL12.0Q [SEQ ID NO: 92 ]) se introdujo en la variante VL relevante utilizando los pares de cebadores indicados en la Tabla 18 cuyas secuencias se proporcionan en la Tabla 9. El cambio N26Q no tuvo ningún efecto estadísticamente significativo sobre la actividad de cualquiera de los anticuerpos resultantes, como se muestra en la Tabla 17. Aunque este sitio de glicosilación existe en la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo TMC-2206 de tipo salvaje, estos datos indican que no parece jugar un papel en la afinidad de la actividad de la función de bloqueo del anticuerpo TMC-2206.

Tabla 18

Variante VL	Cebadores de PCR para Fragmento 1	Cebadores de PCR para Fragmento 2	Cebadores de PCR para VL completa
1.0Q	Igk-For y hLCQ3-R	hLCQ3-F y Cl-neo-msc3'	Igk-For y Cl-neo-msc3'
10.0Q	Igk-For y Hlcq3-R	Hlcq3-F y Cl-neo-msc3'	Igk-For y Cl-neo-msc3'
12.0Q	Igk-For y Hlcq3-R	Hlcq3-F y Cl-neo-msc3'	Igk-For y Cl-neo-msc3'

#### 15 Ejemplo 4

Los anticuerpos humanos de clase  $\gamma$ 1 portan funciones efectoras asociadas con el complemento y funciones mediadas por el receptor Fc. Los expertos en la técnica apreciarán que, para evitar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y las respuestas del complemento, se prefiere una cadena  $\gamma$ 4 que carezca de esta funcionalidad, tal como una región constante  $\gamma$ 4 humana. Para generar una versión  $\gamma$ 4 de los anticuerpos VH12.0, VL10.0Q y los anticuerpos VH14.0, VL10.0Q, se reemplazó una secuencia de la región constante  $\gamma$ 1 por una secuencia de la región constante  $\gamma$ 4 en la cadena pesada VH12.0 y VH14.0 de la siguiente manera. La secuencia de la región constante  $\gamma$ 4 se obtuvo de la secuencia KO1316 de Genbank. Tanto una secuencia  $\gamma$ 1 Fc derivada del clon

IMAGE 20688 utilizada para generar las cadenas pesadas intactas de anticuerpos IgG1 con regiones hVH y hVL como se describe en la presente memoria como el Fc  $\gamma$ 4 derivado de la secuencia KO1316 contienen un sitio de restricción Apa1 de origen natural cerca de la unión de las regiones variables y constantes. Este sitio se utilizó para clonar una región constante  $\gamma$ 4 para reemplazar la región constante  $\gamma$ 1. Se colocaron sitios de restricción *Bam*H1 y *Not*I en el extremo 3' de la secuencia para facilitar la subclonación en el vector de expresión pCI-neo. La secuencia  $\gamma$ 4 (SEQ ID NOS: 105 y 106), se sintetizó a continuación como un gen sintético *de novo* por medio de Blue Heron Biotechnology (Bothell, WA). El plásmido de Blue Heron Biotechnology, que contenía la región constante de IgG4 sintetizada *de novo*, se digirió con *Apal* y *NotI*, el fragmento de la región constante de  $\gamma$ 4 de 1 kb se purificó en gel y se ligó en los plásmidos PCI-VH12.0 y pCI-VH14.0 digeridos con *Apal/NotI* para producir plásmidos que codificaban VH12.0- $\gamma$ 4 y VH14.0- $\gamma$ 4. Estos se combinaron individualmente con el plásmido pCI-VL10.0Q y se transfectaron en células CHO. Cuatro días después de la transfección, los sobrenadantes de cultivo se recogieron y los isotipos de IgG4 de los anticuerpos VH12.0, VL10.0Q y VH14.0, VL10.0Q se purificaron mediante cromatografía de afinidad con Proteína A. Se realizaron paralelamente nuevas transfecciones transitorias de los constructos  $\gamma$ 1 de estas variantes.

Después de la elución con ácido y la neutralización, la cromatografía de exclusión por tamaño analítica mediante HPLC indicó la presencia de formas oligoméricas de orden superior en las preparaciones de IgG4 purificadas con Proteína A. Por lo tanto, se llevó a cabo una segunda etapa de purificación mediante cromatografía de exclusión de tamaño Sephacryl S-300 26/60 para obtener la fracción monomérica. Para esto, la columna de Sephacryl S-300 26/60 fue pre-equilibrada en 660 ml de Tampón de Migración SEC (HEPES 40 mM, pH 6,5, L-histidina 20 mM, NaCl 100 mM y Tween-80 al 0,02%). Las fracciones reunidas que contenían la proteína eluida de la columna de Proteína A se cargaron (inyección de 12,5 ml de muestra) a través de un Superloop (Amersham Biosciences). Las fracciones SEC (5 ml cada una) se recogieron a una velocidad de flujo de 2,0 ml/min. Las fracciones correspondientes a la forma monomérica (elución pico a 168,4 ml) se reunieron, y el contenido de proteína se determinó por medio de análisis de Lowry.

Los anticuerpos IgG1 ilustrativos tienen una cadena pesada hVH 14,0  $\gamma$  (SEQ ID NO: 181) o una cadena pesada hVH12.0  $\gamma$ 1 (SEQ ID NO: 182) y una cadena ligera hVL10.0Q (SEQ ID NO: 178). Los anticuerpos IgG4 ilustrativos tienen una cadena pesada hVH14.0  $\gamma$ 4 (SEQ ID NO: 174) o una cadena pesada hVH12.0  $\gamma$ 4 (SEQ ID NO: 176) y una cadena ligera hVL 10.0Q (SEQ ID NO: 178). Los anticuerpos purificados se sometieron a ensayo en el análisis de competición para comparar la potencia por medio de los valores de  $K_i$ , así como en el análisis de adherencia celular a colágeno, donde la potencia se mide como valores de  $CE_{50}$ . No se observó una diferencia significativa entre los isotipos de las diferentes variantes ni tampoco se diferencian significativamente del mAb original TMC-2206 en cualquiera de análisis como se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19

	Isotipo	VH	VL	$K_i$ (nM)	$CE_{50}$ (nM)
TMC-2206	IgG1/k	Murina	Murina	0,22	1,03±0,29
	hIgG1/k	14.0	10.0Q	0,24	1,30±0,10
	hIgG1/k	12.0	10.0Q	0,27	2,20±0,12
	hIgG4/k	14.0	10.0Q	0,36	2,82±1,04
	hIgG4/k	12.0	10.0Q	0,27	1,83±0,27

## Ejemplo 5

El efecto de anti- $\alpha$ 2 sobre la extravasación de neutrófilos se estudió en un modelo de inflamación de peritonitis murino y de rata. La administración intraperitoneal de ciertos antígenos tales como caseína, carragenano o tioglicolato induce una respuesta de mastocitos rápida que inicia una respuesta de peritonitis aguda (Edelson et al., Blood 103 (6): 2214-2220 (2004)). Esta peritonitis se caracteriza por una rápida infiltración de neutrófilos (en cuestión de horas) seguido de una infiltración más lenta y proliferación de los macrófagos (3-5 días). Por lo tanto, se empleó este modelo para evaluar por primera vez el uso de anticuerpos anti-integrina  $\alpha$ 2 en la prevención o disminución funcional de la respuesta de los neutrófilos.

El modelo de peritonitis aguda se realizó en ratas y en ratones. El anticuerpo TMC-2206 reconoce la integrina  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 de rata, pero no su homólogo murino. Sin embargo, muchos modelos *in vivo* de los modelos inflamatorios se llevan a cabo en ratones y se utilizó un anticuerpo anti- $\alpha$ 2 sustituto, Ha 1/29 (Pharmingen, Becton Dickinson, CA, núm. de catálogo 559987), en el modelo de peritonitis aguda murino.

Se inyectó a los animales IV o IP un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  o de control de isotipo a dosis que oscilaban de 0,1 a 10 mg/kg 15 minutos antes de la sensibilización. Se suministró una inyección de 1 mL de cualquiera de caseína al 9% (ratones) o carragenano (ratas) IP y los animales se devolvieron a su jaula durante períodos de tiempo específicos: 3 horas (ratones) o 5 horas (ratas) (n = 4 por grupo). Los animales fueron sacrificados a continuación con halotano y la cavidad peritoneal se lavó con 5 mL (ratones) o 10 mL (ratas) de PBS que contenía EDTA 5 mM. Las células se recogieron por centrifugación a baja velocidad, se resuspendieron en 5 mL de PBS/EDTA y se observó una alícuota de 100  $\mu$ L mediante microscopía, donde se observó que la mayoría de las células tenían una morfología polimorfonuclear coincidente con la de los neutrófilos. Las células de la suspensión restante se sometieron a centrifugación a baja velocidad para obtener un sedimento celular lavado.

Contenido de neutrófilos se cuantificó analizando el nivel de actividad mieloperoxidasa (MPO) (p. ej., Speyer et al., Am J Pathol.163(6): 2319-28 (2003)). El sedimento celular recuperado del fluido de lavado se resuspendió en 500  $\mu$ L de tampón de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM tampón (pH 6,0) que contenía bromuro de hexadecil-trimetilamonio al 0,5% (HTAB; Sigma-Aldrich, MI). Las muestras se sometieron a sonicación durante 60-90 segundos y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se llevó a cabo una dilución seriada 2:1 del sobrenadante aclarado mediante la transferencia de 50  $\mu$ L de muestra a 50  $\mu$ L de tampón HTAB en el pocillo de una placa de microtitulación. A continuación, se transfirieron 50  $\mu$ L de esta solución del pocillo a otros 50  $\mu$ L de tampón, y así sucesivamente hacia a lo largo de la serie de dilución. Se añadieron 200  $\mu$ L de tampón de sustrato (tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM (pH 6,0) que contenía 0,168 mg/mL de o-dianisidina y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,0005%) a cada muestra para iniciar la reacción colorimétrica, que se controló con un lector de placa Molecular Devices ajustado a una longitud de onda de 460 nm. Después se calculó el número de Unidades de actividad enzimática en la suspensión celular original (500  $\mu$ L de suspensión celular lavada para cada animal individual). Una curva de calibración, creada para titular los neutrófilos/mL (evaluada por conteo directo de neutrófilos) frente a la actividad MPO indicó una fuerte correlación lineal entre U/mL y el número de neutrófilos/mL dentro del intervalo medido.

Como se muestra en la Tabla 20, tanto el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2\beta 1$  murino Ha1/29 como TMC-2206 tenían un efecto marcado sobre la infiltración de neutrófilos en la cavidad peritoneal después de la sensibilización con caseína al 9% en ratones o carragenano al 1% en ratas como se mide por la actividad total de MPO recuperada en el fluido de lavado peritoneal. El valor de  $\text{DE}_{50}$  obtenido en ratón con Ha1/29 fue  $\sim 0,07$  mg/kg, mientras la  $\text{DE}_{50}$  para TMC-2206 en la rata fue  $\sim 5$  mg/kg. Esta diferencia se corresponde en parte con la afinidad relativa del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2\beta 1$  humano para integrina  $\alpha 2\beta 1$  de rata en comparación con la afinidad del anticuerpo Ha1/29 por la integrina  $\alpha 2\beta 1$  de ratón, y en parte con las diferencias en el antígeno utilizado en los modelos de rata y ratón (carragenano y caseína, respectivamente).

Tabla 20

	Dosis	Contenido MPO (U)		
	(mg/kg)	Media $\pm$ ETM	(n)	
Ha 1/29	0,0	44,6 $\pm$ 10,1	(4)	
	0,05	28,1 $\pm$ 3,4	(3)	
	0,1	13,6 $\pm$ 0,8	(4)	P<0,01
(caseína al 9%)	0,5	7,3 $\pm$ 2,7	(3)	P<0,01
	1,0	7,5 $\pm$ 1,6	(4)	P<0,01
	5,0	172 $\pm$ 41	(6)	P<0,01
TMC-2206	0,0	362 $\pm$ 49	(5)	
	10,0	136 $\pm$ 24	(5)	P<0,01
	15,0	82 $\pm$ 18	(6)	P<0,01

Se estudió el efecto de los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  en un modelo de ratón (colitis inducida por sulfato de dextrano) de enfermedad inflamatoria intestinal. En este modelo, la colitis se induce en ratones mediante la administración de una disolución de sal de sodio de sulfato de dextrano al 5% (DSS) en el agua de bebida (Elson et al., *Gastroenterology* 109(4): 1344-1367 (1995); Egger B., et al., *Digestion* 62(4): 240-8 (2000)). Se evaluó el efecto del tratamiento con un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2\beta 1$  murino sobre el desarrollo de los signos clínicos y los síntomas de colitis, así como el efecto sobre la infiltración de leucocitos pro-inflamatorios en el colon.

Se alojaron ratones Balb/C (Harlan, IN) con un peso de 16-21 gramos por parejas. Los animales recibieron agua destilada o agua que contenía sal de sodio de sulfato de dextrano al 5% (DSS); (ICN, Irvine, CA) *ad libitum* durante 7 días. En esta etapa los ratones presentaban diarrea y pérdida de peso notable. El diseño del estudio fue de cuatro grupos de seis ratones cada uno; uno que servía como control sin tratamiento previo, uno que servía como control de DSS y dos asignados a recibir inyecciones intraperitoneales de 2 ó 5 mg/kg de dosis de anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  PS/2 en los Días 0, 2, 4 y 6. Los ratones fueron sacrificados el día 7 (168 horas después del inicio de la alimentación con DSS). Se pesaron para observar cualquier cambio desde el inicio del estudio, se midió la longitud del colon y luego puntuaron en una escala de 0 a 2, siendo 2 la más severa, para la diarrea, el sangrado de colon y el sangrado rectal como sigue:

<b>sangrado rectal:</b>	puntuación de 0 = no hay sangre visible;	2 = sangre visible
<b>Consistencia de las heces:</b>	puntuación de 0 = normal; 1 = suelta;	2 = acuosa
<b>sangrado de colon:</b>	puntuación de 0 = no hay sangre visible;	2 = sangre visible.

Los cólores fueron procesados a continuación para la inmunohistoquímica. Los cólores, desde el ciego hasta el recto, se retiraron cuidadosamente y se fijaron durante 2 horas a 4°C en paraformaldehído (PFA) al 4%, se dejaron durante la noche en sacarosa al 20% y luego se congelaron rápidamente en compuesto de congelación OCT (Tissue Tek). Se cortaron secciones finas (grosor 10  $\mu$ m) seriadas utilizando un criostato Leica, se secaron al aire, se bloquearon durante 2 horas en suero de cabra al 3% en PBS y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente en anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios utilizados incluían anti-CD11b/mac-1 murino de rata (un marcador para macrófagos y neutrófilos activados, Clone M1/70, BD-Pharmingen) anti-CD3 murino de hámster (un marcador de células T, BD-Pharmingen), y el clon F4/80 (un marcador de macrófagos, Research Diagnostics, Inc). Los portaobjetos se lavaron a continuación, se incubaron 2 horas en el correspondiente anticuerpo secundario marcado con Alexa 488 o TRITC (Molecular Probes, OR) y se lavaron tres veces durante 5 minutos en PBS y se montaron en medio Vectashield que contenía DAPI (Vector Labs, CA). Las secciones se observaron con un microscopio de epifluorescencia Leica conectado a una cámara Spot RT (Research Diagnostics). Se cuantificó la intensidad de la fluorescencia y el número de células fluorescentes dentro de una región seleccionada de interés (ROI) que delineaba la región entre la lámina propia y las puntas de las vellosidades, pero eliminaba la superficie serosa (alta autofluorescencia) y el lumen entérico, de un total de 5 campos de visión en cinco secciones separadas, para cada animal utilizando el soporte lógico ImagePro (Media Cybernetics, MD).

Como se muestra en la Tabla 21, el tratamiento con el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  murino tuvo un efecto de la dosis estadísticamente significativo sobre revertir la pérdida de peso y la consistencia de las heces asociada con la alimentación con DSS. Ambos grupos de tratamiento (2 mg/kg y 5 mg/kg) tuvieron efectos significativos sobre el sangrado rectal y el sangrado de colon, pero ningún efecto significativo sobre el acortamiento de colon asociado con el desarrollo de colitis. El tratamiento también se correspondía con una marcada disminución en el número de leucocitos infiltrantes (datos no mostrados).

Tabla 21

	Agua	DSS		
		Disolución salina	2 mg/kg anti- $\alpha 2$	5 mg/kg anti- $\alpha 2$
Ganancia peso (gm)	3,02 $\pm$ 1,19	-9,16 $\pm$ 0,63	-0,44 $\pm$ 0,81***	-2,30 $\pm$ 0,64**
Longitud colon (cm)	7,43 $\pm$ 0,26	5,22 $\pm$ 0,17	5,35 $\pm$ 0,17	5,32 $\pm$ 0,43
Sangrado rectal	0	1,67 $\pm$ 0,21	0,83 $\pm$ 0,31	0,83 $\pm$ 0,31
Sangrado colon	0	1,0 $\pm$ 0,45	0*	0*

	Agua	DSS		
		Disolución salina	2 mg/kg anti- $\alpha$ 2	5 mg/kg anti- $\alpha$ 2
Consistencia heces	0	1,0 $\pm$ 0,0	0,50 $\pm$ 0,22*	0,17 $\pm$ 0,17**
*p<0,05				
**p<0,01				

5 En otro estudio, se examinaron el efecto del anticuerpo anti-integrina  $\alpha$ 4 (clon PS/2; Southern Biotech, AL), anti-integrina  $\alpha$ 2 (clon Ha1/29, BD Pharmingen, CA) y anti-integrina  $\alpha$ 1 (clon Ha8/31; Invitrogen, CA) en comparación con ratones tratados solamente con DSS (n=8 por grupo). Las dosis del tratamiento con anticuerpo fueron 5 mg/kg. Se ha informado de que estos anticuerpos anti-integrina de bloqueo de la función modulan la colitis experimental (Kriegelstein et al., J Clin Invest. 110(12):1773-82 (2002); Watanabe et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 283(6):G1379-87 (2002)). Como se muestra en la Tabla 22, los tres anticuerpos anti-integrina se asociaron con una reversión en el acortamiento de colon, pero solamente el tratamiento con anti- $\alpha$ 2 se asoció con una mejora significativa en la consistencia de las heces (diarrea). El tratamiento tanto con anti- $\alpha$ 2 como con anti- $\alpha$ 4 dio como resultado una mejora significativa en el sangrado de colon. En este estudio, ninguno de los tratamientos con anticuerpo indujo un efecto significativo sobre la pérdida de peso. Cuando el número de células T residentes, macrófagos y neutrófilos se evaluó mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando anti-CD3, F4/80 y anti-Mac1 (como se ha descrito previamente), los tres grupos tratados con anti-integrina mostraron un descenso significativo en comparación el control con Disolución salina como se muestra en la Tabla 23. Estos datos apoyan la conclusión de que suscitar antagonismo sobre  $\alpha$ 2 tiene un profundo efecto sobre los niveles en estado estacionario de estas células efectoras inmunitarias que se acumulan en el colon inflamado en respuesta a DSS y que estos cambios se corresponden concurrentemente con una mejora en las mediciones clínicas asociadas con la colitis.

Tabla 22

	Agua	DSS			
Signos clínicos		Disolución salina	Anti- $\alpha$ 2	Anti- $\alpha$ 1	Anti- $\alpha$ 4
Ganancia de peso (gm)	7,10 $\pm$ 0,70	-1,67 $\pm$ 0,76	-1,10 $\pm$ 1,69	-0,43 $\pm$ 1,17	1,62 $\pm$ 0,69
Longitud colon (cm)	7,43 $\pm$ 0,26	4,73 $\pm$ 0,16	6,08 $\pm$ 0,25**	5,85 $\pm$ 0,22**	5,92 $\pm$ 0,09**
Sangrado rectal	0,0	2,00 $\pm$ 0,21	0,50 $\pm$ 0,33*	0,50 $\pm$ 0,33*	0,83 $\pm$ 0,31
Sangrado colon	0,0	1,5 $\pm$ 0,33	0,25 $\pm$ 0,25**	0,75 $\pm$ 0,37	0,00**
Consistencia heces	0,0	1,0 $\pm$ 0,0	0,38 $\pm$ 0,182*	0,63 $\pm$ 0,18	0,67 $\pm$ 0,21
*p<0,05					
**p<0,01					

Tabla 23

	Agua	DSS			
Recuentos celulares		Disolución salina	Anti- $\alpha$ 2	Anti- $\alpha$ 1	Anti- $\alpha$ 4
Células T (células CD3 positivas)	6,1 $\pm$ 1,5	618 $\pm$ 160	211 $\pm$ 78*	174 $\pm$ 48**	112 $\pm$ 36**
Macrófagos (células F4/80 positivas)	21 $\pm$ 3	778 $\pm$ 94	298 $\pm$ 45**	510 $\pm$ 132	328 $\pm$ 53**
Neutrófilos +Macrófagos (células CD11b/Mac-1 positivas)	19 $\pm$ 5	1937 $\pm$ 239	499 $\pm$ 144**	524 $\pm$ 141"	574 $\pm$ 192**
*p<0,05					
**p<0,01					

## Ejemplo 7

5 Se estudiaron los efectos del anticuerpo anti-integrina  $\alpha$ 2 sobre los signos clínicos y los síntomas en un modelo experimental de encefalomiелitis alérgica (EAE) de la esclerosis múltiple. El modelo de EAE de esclerosis múltiple, inducida por inyección del péptido sintético encefalogénico PLP<sub>139-151</sub> junto con coadyuvante de Freund en ratones SJL, se considera que es un modelo predictivo de esclerosis múltiple de recaída-remisión (Encinas et al., J Neurosci Res. 45(6): 655-69 (1996)).

10 En un estudio de 4 grupos de ratones (8/grupo; véase la Figura 1), a dos grupos se les administraron dosis de 5 mg/kg en los días 10, 11, 12, 14, 15, 18 y 20, control de isotipo o con el anticuerpo anti-integrina  $\alpha$ 2 murino, Ha1/29, desde la aparición de síntomas de la enfermedad hasta el Día 20, que es a lo largo del primer brote agudo. Este fue un régimen de dosis agudo. El Día 0 se definió como la aparición del cebado con el péptido sintético PLP139-151 más coadyuvante de Freund. El inicio de la enfermedad se definió como el segundo día consecutivo de pérdida de peso. Los otros dos grupos fueron asignados a un régimen de dosis retardada donde recibieron 5 mg/kg de anticuerpo anti-integrina  $\alpha$ 2 murino o disolución salina tres veces a la semana desde el Día 18 hasta el Día 36, que vino a coincidir con el segundo brote/primer recaída. Los ratones se puntuaron en cuanto a los signos y síntomas clínicos de la siguiente manera:

puntuación de 0,5	= 2 días consecutivos de pérdida de peso
puntuación de 1	= cola lacia
puntuación de 2	= ataxia
puntuación de 3	= parálisis de miembros traseros
puntuación de 4	= moribundo
puntuación de 5	= muerto

20 Como se muestra en la Tabla 24, el tratamiento con 5 mg/kg del anticuerpo anti- $\alpha$ 2 desde el inicio del primer brote (p. ej., el tratamiento agudo) mitigó el alcance del primer brote y también limitó el grado del segundo brote. Cuando la dosificación se inició después del final del primer brote en el Día 18 (p. ej., retraso en el tratamiento; véase la Figura 1), los ratones tratados con 5 mg/kg de anticuerpo anti-integrina  $\alpha$ 2 murino también mostraron puntuaciones clínicas más bajas durante la primera recaída hasta el Día 32, momento en el que los dos grupos mostraron puntuaciones de enfermedad similares como se muestra en la Tabla 24. Cuando los ratones recibieron dosis sólo durante la fase de inducción, como se muestra en la Figura 2, el mAb anti-integrina  $\alpha$ 2 tuvo poco o ningún efecto sobre el primer ataque o las fases posteriores del modelo de EAE y los ratones desarrollaron una enfermedad esencialmente equivalente a la de los animales tratados con el control de isotipo. Estos resultados contrastan con los obtenidos previamente usando el anticuerpo anti- $\alpha$ 4, PS/2, en el modelo de EAE (Yednock et al., Nature 356(6364):

63-6 (1992); Theien et al., J. Clin. Invest., 107(8): 995-1006 (2001)), que se utiliza para apoyar el tratamiento de la esclerosis múltiple recidivante con el anticuerpo anti- $\alpha 4$  natalizumab (Miller et al, N. Engl J. Med 348 (1): 15-23 (2003)). Estos resultados indican que en contraste con el papel que juega la integrina  $\alpha 4$  en los trastornos neuro-inflamatorios, donde el antagonismo de este receptor puede retrasar el inicio de las recaídas-brotos asociados con la esclerosis múltiple, suscitar antagonismo sobre la integrina  $\alpha 2$  es una modalidad de tratamiento útil para mitigar y tratar los brotes cuando se producen.

Tabla 24

	Puntuaciones clínicas	
	Estudio Media $\pm$ ETM (n=6-8)	Estudio 2 Media $\pm$ ETM (n=17-20)
<b>Día 15</b>		
IgG control	1,56 $\pm$ 0,42	2,22 $\pm$ 0,29
anti- $\alpha 2$	1,00 $\pm$ 0,37	0,88 $\pm$ 0,21 ( $p < 0,01$ )
anti- $\alpha 4$	--	1,64 $\pm$ 0,25
<b>Día 20</b>		
IgG control	1,13 $\pm$ 0,48	1,25 $\pm$ 0,28
anti- $\alpha 2$	0,58 $\pm$ 0,41	0,61 $\pm$ 0,20
anti- $\alpha 4$	--	1,11 $\pm$ 0,22
<b>Día 35</b>		
IgG control	1,13 $\pm$ 0,48	1,49 $\pm$ 0,29
anti- $\alpha 2$	0,33 $\pm$ 0,33	1,08 $\pm$ 0,29
anti- $\alpha 4$	--	1,47 $\pm$ 0,27
<b>Día 55</b>		
IgG control IgG	1,63 $\pm$ 0,63	2,00 $\pm$ 0,28
anti- $\alpha 2$	1,00 $\pm$ 0,59	0,75 $\pm$ 0,31 ( $p < 0,001$ )
anti- $\alpha 4$	--	1,33 $\pm$ 0,35

Se realizó un análisis histológico en cerebros y médulas espinales obtenidos de los ratones cuando estaban moribundos (fase 4) o al final del estudio. Los ratones fueron sacrificados con halotano cuando estaban moribundos (puntuación clínica 4), o después del período de observación de 55-60 días. Los animales fueron perfundidos con PBS, seguido de una disolución de paraformaldehído al 4%. Los cerebros se dividieron en cinco cortes coronales, la médula espinal en diez a doce cortes transversales y los tejidos fueron incluidos en parafina y las secciones de 4  $\mu$  de grosor se tiñeron con azul Luxol para visualizar la mielinización. Los tejidos se puntuaron de una manera ciega para determinar el grado de mielinización, infiltración (meningitis) y acumulaciones perivasculares. Para puntuar las secciones de la médula espinal, cada sección de la médula espinal se dividió en cuadrantes: el funículo anterior, el funículo posterior y cada funículo lateral. A cualquier cuadrante que contuviera meningitis, acumulación perivascular o desmielinización se le dio una puntuación de 1 en esa clase patológica. Se determinó el número total de cuadrantes positivos para cada clase patológica, a continuación, se dividió por el número total de cuadrantes presentes en el portaobjetos y se multiplicó por 100 para dar el porcentaje de participación para cada clase

patológica. También se determinó una puntuación patológica general dando una puntuación positiva si se encontraba presente en el cuadrante cualquier lesión.

Se observaron lesiones desmielinizantes inflamatorias notables en la médula espinal, con más frecuencia en el fasciculus gracilis del funículo posterior y la zona de salida de la raíz ventral en el funículo anterolateral. Sólo se observó leve acumulación perivascular. La meningitis y la desmielinización mostraron una fuerte correlación con los signos clínicos ( $r = 0,84$  y  $0,79$ , respectivamente) y mostraron puntuaciones significativamente más bajas en el grupo tratado con anti- $\alpha 2$  ( $P < 0,01$  entre los grupos tratados con anti- $\alpha 2$  e IgG de control para ambos parámetros). Estos datos indican que el tratamiento con anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  inhibe la meningitis y la desmielinización asociadas con un brote y/o facilita la remielinización y la reparación. El resultado global es un resultado clínico mejorado.

Se realizó otro estudio ( $n = 17$  a  $20$  por grupo) para comparar el anticuerpo anti-integrina- $\alpha 2$  con el anti-integrina  $\alpha 4$ , PS/2 (obtenido de Southern Biotech), tratamiento durante el primer brote agudo hasta la aparición de remisión (Días 10 a 20). Se trataron dos grupos adicionales con IgG de control o anti-integrina  $\alpha 2$  desde el inicio de la remisión (Día 18) hasta la primera recaída (Día 36) y en el inicio de la fase crónica de la enfermedad. Una vez más el tratamiento anti-integrina  $\alpha 2$  tuvo un marcado efecto sobre la incidencia de secuelas neurológicas (parálisis) y una reducción estadísticamente significativa en la puntuación clínica media máxima durante el primer brote de EAE, así como en la fase de recaída posterior (fase crónica de la EAE; Tabla 24). Hubo un ligero efecto de mejora del tratamiento anti- $\alpha 2$  retardado en las puntuaciones clínicas durante la fase crónica de la enfermedad. La incidencia de la enfermedad durante el primer ataque (anti- $\alpha 2$ , el 61%; IgG de control 85%) y durante la fase crónica (anti- $\alpha 2$ , 77%; IgG de control 100%) fue menor en el grupo de ratones tratados con anti- $\alpha 2$  en comparación con el control. En el caso del grupo tratado con anti- $\alpha 4$ , la incidencia de la enfermedad durante el primer ataque (tratamiento anti- $\alpha 4$ , 94%; control 82%) y la recaída (tratamiento anti- $\alpha 4$ , 89%; control, 92%) fue similar entre el grupo tratado con anticuerpo anti- $\alpha 4$  frente al control. Sin embargo, el grado de recaídas posteriores se redujo notablemente. Estos datos con respecto a un anticuerpo anti- $\alpha 4$  son comparables con los informes anteriores sobre el efecto del tratamiento con anticuerpo anti- $\alpha 4$  en el resultado clínico en EAE (Theien et al, J. Clin Invest 107 (8): 995-1006 (2001)).

#### Ejemplo 8

Se estudiaron los efectos de la unión a la integrina  $\alpha 2\beta 1$  de plaquetas ( $\alpha 2\beta 1$  se expresa en la superficie de las plaquetas), incluyendo los efectos sobre la función plaquetaria. Se realizaron diferentes conjuntos de ensayos para estudiar estos efectos.

Los primeros estudios evaluaron si la unión de TMC-2206 conducía a la activación de plaquetas medida por la regulación al alza de P-selectina o la activación de la integrina  $\alpha IIb\beta 3$  de plaquetas que se midieron utilizando un anticuerpo-específico de la de  $\alpha IIb\beta 3$  tal como PAC-1. Se recogió sangre venosa humana utilizando una aguja de calibre 21 de la vena cubital de donantes sanos que se habían abstenido de medicamentos durante al menos 10 días en 1/10 de volumen de tampón de citrato-dextrosa acidulado (ACD: citrato de sodio 85 mM, dextrosa 111 mM y ácido cítrico 71 mM, sin ajuste de pH) que contenía 500 ng/ml de prostaglandina  $I_2$  ( $PGI_2$ , Sigma-Aldrich) en caso de ser utilizado para la elaboración de plaquetas lavadas. La sangre completa se centrifugó a  $160 \times g$  durante 20 minutos a temperatura ambiente y el plasma rico en plaquetas (PRP) se retiró sin alterar la capa leucocitaria. Las plaquetas lavadas se prepararon diluyendo el PRP 2,5 veces con tampón salino de glucosa con citrato añadido (CGS; citrato trisódico 13 mM, cloruro de sodio 120 mM y dextrosa 30 mM, pH 7,0) y  $PGI_2$  (500 ng/ml) y centrifugando a  $160 \times g$  durante 20 minutos a temperatura ambiente para eliminar cualquier leucocito contaminante. El sobrenadante se recogió y se centrifugó a  $1100 \times g$  durante 10 minutos y el sedimento de plaquetas resultante se resuspendió suavemente en tampón CGS, se lavó y se resuspendió en tampón normal de Tyrodes-Hepes ( $NaHCO_3$  12 mM, NaCl 138 mM, glucosa 5,5 mM, KCl 2,9 mM, HEPES 10 mM,  $CaCl_2$  1 mM,  $MgCl_2$  1 mM, pH 7,4). Se permitió que las plaquetas se recuperaran durante un máximo de 30 minutos a  $37^\circ C$ . Las plaquetas lavadas se contaron a continuación antes de la adición de  $CaCl_2$  y  $MgCl_2$  a 1 mM. Las plaquetas lavadas de rata se prepararon de una manera similar, aunque se extrajo sangre de la vena cava para minimizar la activación de plaquetas durante la extracción de sangre.

Se incubaron  $50 \mu L$  de PRP recién preparado de PRP con  $5 \mu g/mL$  de TMC-2206 o anticuerpo de control IgG de ratón durante 30 minutos, se lavaron y después se incubaron con anti-ratón de cabra marcado con Alexa-594 en presencia o ausencia de anticuerpo contra selectina P marcado con Alexa 488 (BD Pharmingen, núm. de catálogo. 555523), anticuerpo PAC-1 marcado con Alexa-488 (BD Pharmingen, núm. de catálogo. 340507) o 150 ng de fibrinógeno marcado con Alexa-488 (Molecular Probes) durante 40 minutos a temperatura ambiente. P-selectina y PAC-1 son marcadores de la activación de las plaquetas, y las plaquetas activadas son capaces de unirse al fibrinógeno. Al final del periodo de incubación, las plaquetas se fijaron con 1/10 de volumen de paraformaldehído al 4% y se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACScalibur™. Los resultados de estos experimentos demostraron inesperadamente que aunque las plaquetas se unían claramente a TMC-2206, como se indica por un desplazamiento log en un aumento de la intensidad de fluorescencia observado en las plaquetas tratadas con TMC-2206 pero no en las tratadas con IgG de control; no hubo un aumento concomitante en la tinción con P-selectina o PAC1, lo que indica que la unión a TMC-2206 no activó las plaquetas.

Los siguientes estudios evaluaron si la unión de TMC-2206 conduce a la activación de las plaquetas, medida por los efectos sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno. El colágeno soluble es un potente agonista de la agregación plaquetaria y se utiliza como una medida rutinaria de la capacidad de respuesta de las plaquetas (véase, p. ej., Hemostasis and Thrombosis; (2001), ed. Colman et al.). Los estudios con ratones con el gen  $\alpha 2$  desactivado han sugerido que las plaquetas de estos ratones muestran una respuesta alterada leve al colágeno (Holtkotter et al., J. Biol. Chem. 277(13): 10789-94 (2002) E. pub ene, 11, 2002; Chen et al., Am. J. Pathol 161(1): 337-344 (2002)). Para someter a ensayo si TMC-2206 tendría algún efecto adverso sobre las respuestas de las plaquetas al colágeno, se realizaron análisis de agregación de plaquetas humanas y de rata por agregometría de transmisión de luz clásica usando un agregómetro Bio-data PAR4. Se preparó PRP como se ha descrito anteriormente y el recuento de plaquetas se ajustó a  $3 \times 10^8$ /mL. Se agitaron 450  $\mu$ L de PRP o de plaquetas lavadas con un lecho magnético durante 1 minuto a 37°C en presencia de 5  $\mu$ g/mL de TMC-2206 antes de añadir colágeno de piel ternera de Tipo I (Biodata Corp) para iniciar la agregación. El volumen final hasta 500  $\mu$ L se alcanzó con tampón Tyrodes para la agregación de las plaquetas lavadas y con plasma pobre en plaquetas (PPP) para los análisis de plasma rico en plaquetas (PRP). Se utilizaron 500  $\mu$ L de tampón Tyrodes o PPP como blanco para los análisis. El PPP se preparó sedimentando plaquetas en PRP mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos en una microcentrífuga. La velocidad y el grado de la agregación plaquetaria después de la adición de colágeno soluble fueron comparables en presencia o ausencia de TMC-2206. Los resultados de estos experimentos demostraron que la unión de TMC-2206 a las plaquetas no tenía inesperadamente ningún efecto sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno cuando se sometió a ensayo *in vitro* a las concentraciones sometidas a ensayo.

Los siguientes estudios evaluaron si la unión de TMC-2206 conducía a trombocitopenia, una consecuencia potencial de anticuerpos que se unen a las plaquetas *in vivo*. (Hansen y Balthasar, J Pharmacol Exp Ther. 298(1): 165-71 (2001)). Para someter a ensayo si se produciría trombocitopenia tras la administración de TMC-2206n, se administró a las ratas una dosis de 10 mg/kg de TMC-2206 o IgG de control murina mediante inyección IP. Antes de la inyección, se utilizó una muestra de sangre de la cola para medir los recuentos de células de sangre de referencia. Las muestras de sangre fueron tomadas en puntos específicos de tiempo después de la administración del fármaco IP (p. ej., 10, 30, 60 minutos y 4, 24 y 72 horas) de ratas no anestesiadas mediante recogida de muestras retro-orbital utilizando una Unopipet capilar. Aproximadamente 40  $\mu$ L de sangre se transfirieron a un tubo que contenía 5  $\mu$ L de ACD y de inmediato se tomaron muestras en un contador de células sanguíneas Hemavet (Drew Scientific). Los resultados de este estudio no mostraron inesperadamente ningún cambio significativo a partir de los recuentos de plaquetas de referencia a las dosis de 5 mg/kg o 10 mg/kg de TMC-2206. En contraste, la inyección de 0,1 mg/kg de un anticuerpo a otro receptor de plaquetas (aIIb, anticuerpo anti-CD41 (BD Pharmingen, CA)) indujo trombocitopenia, con un recuento de plaquetas que disminuyó casi un 80% a los 15 minutos de la administración del anticuerpo.

#### Ejemplo 9

Se estudiaron los efectos de los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  sobre la adherencia de las plaquetas al colágeno incluyendo la adherencia a varios subtipos de colágeno. La integrina  $\alpha 2\beta 1$  es la única integrina de unión a colágeno, aunque no el único receptor de colágeno, que es expresada por las plaquetas. Sin embargo, como se comentó anteriormente, existen otros mecanismos, especialmente después de la activación de plaquetas, para facilitar la adherencia firme a una matriz de colágeno. En este ejemplo, se evaluó la capacidad del anticuerpo TMC-2206 para bloquear la adherencia de las plaquetas a los colágeno de Tipo I, II, III, IV y VI, tanto plaquetas en reposo como para plaquetas activadas con el agonista moderado de plaquetas, ADP.

Se recubrieron plaquetas Immulon II con colágeno de los tipos I, II, III, VI (Rockland Immunochemical) e IV (Sigma, St. Louis, MO) que se habían solubilizado sin formación de espuma en ácido acético 5 mM, a una concentración final de 1 mg/mL. Los pocillos se lavaron dos veces usando tampón HEPES - Tyrode modificado sin  $\text{Ca}^{++}$  o BSA, pero con 2 mM/Mg $^{++}$  y se bloquearon con 100  $\mu$ L/pocillo de tampón HEPES - Tyrode que contenía 2 mM/Mg $^{++}$  y BSA al 0,35%, pero sin  $\text{Ca}^{++}$ .

Se utilizó sangre venosa humana para la preparación de las plaquetas, incluyendo PRP, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 8. Se elaboró plasma pobre en plaquetas (PPP) por centrifugación del PRP a 1100 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sedimento de plaquetas resultante se resuspendió suavemente para el marcaje en 1,0 mL de CGS (citrato trisódico 13 mM, cloruro de sodio 120 mM y dextrosa 30 mM pH 7,0), se transfirió a un tubo de fondo redondo de 5 ml y se le añadieron 3  $\mu$ L de solución de partida de CFSE (concentración final 53,7  $\mu$ M) con balanceo suave durante exactamente 20 minutos. Las plaquetas marcadas se diluyeron en tampón CGS y se lavaron. El sedimento de plaquetas se resuspendió en 1 ml de tampón CMFTH (HEPES 5 mM, pH 7,3, bicarbonato de sodio 12 mM, NaCl 137 mM, KCl 3 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,3 mM, dextrosa 5 mM y BSA al 0,35%) y se mantuvo en la oscuridad tanto como fue posible. Las plaquetas lavadas de rata se prepararon de una manera similar, aunque se extrajo sangre de la vena cava en una jeringa que contenía 500 ng/mL de PGE $_1$  en ACD para minimizar la activación de plaquetas durante la extracción de sangre.

Se diluyeron plaquetas marcadas con CFSE a  $20 \times 10^5$ / $\mu$ L utilizando tampón HEPES - Tyrode que contenía BSA al 0,35%. Las plaquetas marcadas ( $1,0 \times 10^7$  pocillo) se aplicaron a los pocillos que contenían ADP 20 mM en tampón HEPES - Tyrode con BSA al 0,35% y concentraciones variables de inhibidor de ensayo. Las placas de microtitulación que contenían mezclas de plaquetas se centrifugaron a 550 xg durante 10 minutos a temperatura

ambiente seguido por incubación en la oscuridad durante 10 minutos adicionales. Los pocillos se lavaron con tampón HEPES - de Tyrode. La fluorescencia se leyó usando un lector de placa de fluorescencia Victor2. Para determinar la relación de la intensidad de fluorescencia frente al número de plaquetas, las plaquetas marcadas se diluyeron a diferentes niveles en tampón de HEPES - Tyrode que contenía BSA al 0,35% (sin  $\text{Ca}^{++}$  o ADP), se aplicaron a pocillos recubiertos con colágeno de Tipo I o Tipo IV, se centrifugaron, y se tomaron medidas de la fluorescencia CFSE. Como se muestra en la Tabla 25, TMC-2206 bloqueó la unión a colágeno en estas condiciones estáticas, con una  $\text{CE}_{50}$  de 1,7 nM. Se realizaron estudios similares con plaquetas de rata utilizando TMC-2206. Los valores de  $\text{CE}_{50}$  para inhibir la unión de las plaquetas de rata a colágeno de rata de Tipo I fueron de 6,3 nM, lo que indicaba un cambio de aproximadamente 5 veces en la afinidad para la rata en comparación con  $\alpha 2\beta 1$  humana sobre las plaquetas.

Tabla 25

Tipo de colágeno	Fuente de colágeno humano	Estim. ADP ( $\mu\text{M}$ )	$\text{CE}_{50}$ (nM)
Tipo I	placenta	0	1,7
		20	9,5
Tipo II	cartílago de rodilla	0	1,9
		20	27
Tipo III	placenta	0	1,6
		20	11
Tipo IV	placenta	0	10
		20	>1000
Tipo VI	placenta	0	2,3
		20	23

Como se muestra en la Tabla 25, TMC-2206 fue un potente inhibidor de la adherencia de las plaquetas a los colágenos fibrilares, pero fue menos potente para el colágeno de Tipo IV no fibrilar (10 nM en comparación con 1-2 nM). Inesperadamente, en presencia de ADP, hubo una disminución de aproximadamente 10 a 20 veces en la potencia para inhibir la unión a los colágenos fibrilares y el anticuerpo ya no fue eficaz en la prevención de la adherencia al colágeno de Tipo IV. Estas observaciones inesperadas sugieren que el TMC-2206 y los anticuerpos con la especificidad de unión al epítipo de TMC-2206 son menos activos en la inhibición de las interacciones de las plaquetas activadas al colágeno fibrilar, y tendrían poco o ningún efecto [en el intervalo de dosificación terapéutico] sobre la unión al colágeno de Tipo IV, el subtipo predominante de colágeno de la pared vascular endotelial.

## Ejemplo 10

Se estudiaron los efectos de los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  sobre el tiempo de sangrado. Existe la expectativa por parte de los expertos en la técnica de que la administración de un anticuerpo contra una integrina plaquetaria podría causar trastornos de la coagulación y conducir a un mayor tiempo para coagular en un sujeto que reciba semejante anticuerpo después de una lesión aguda. Para evaluar si los anticuerpos dirigidos contra la integrina  $\alpha 2$  aumentarían la propensión a la hemorragia *in vivo*, se determinó el efecto de TMC-2206 sobre el tiempo de sangrado en rata.

Se administró a las ratas una inyección IP o IV de TMC-2206 15 minutos antes del ensayo para determinar el tiempo de sangrado. Las ratas no anestesiadas fueron inmovilizadas en un dispositivo de contención y se les cortaron 0,8 cm de la punta de la cola rápidamente para iniciar el sangrado. La cola se insertó rápidamente en un vaso de precipitados que contiene 30 mL de PBS se mantuvo a 37°C. El tiempo requerido para que la cola dejara de sangrar se registró como el tiempo de sangrado. Como se muestra en la Tabla 26, los datos demostraron que la administración de dosis de TMC-2206 de hasta 10 mg/kg no tuvo ningún efecto significativo sobre el tiempo de sangrado.

Tabla 26

Dosis de TMC-2206 mg/kg	Tiempo de sangrado (n) minutos
0,0	3,86 ± 0,32 (5)
5,0	4,51 ± 0,32 (4)
10,0	4,62 ± 0,67 (7)

## Ejemplo 11

Se estudiaron los efectos de los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  en un modelo de trombosis arterial. Otra manifestación potencial de trastornos del sangrado de la administración de anticuerpos reactivos con la  $\alpha 2\beta 1$  sobre las plaquetas podría ser un mayor tiempo para que se produzca la oclusión trombótica después de una lesión arterial aguda debido a efectos no deseados de la función plaquetaria. Por lo tanto, los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$  tales como TMC-2206, se sometieron a ensayo en un modelo de trombosis arterial en rata inducida por cloruro férrico. Este es un modelo convencional que ha sido utilizado para el desarrollo de agentes anti-trombóticos y la actividad se manifiesta como un retraso en el tiempo de oclusión después de la exposición del revestimiento endotelial del vaso sanguíneo a una disolución de  $\text{FeCl}_3$  (Kurz et al., *Thromb Res.* 60(4): 269-80 (1990); Hoekstra et al., *J Med Chem* 42(25): 5254-65 (1999)).

Se administró anticuerpo TMC-2206 se administró a las ratas a través de inyección en la vena de la cola aproximadamente 30 minutos antes de la inducción de lesión arterial a dosis que oscilaban de 1 mg/kg a 15 mg/kg. Para inyecciones IV, la mayoría de los anticuerpos se concentraron a 4-5 mg/mL para reducir los volúmenes de inyección necesarios para las dosis más altas. Los grupos de tratamiento fueron 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 y 15 mg/kg de TMC-2206, 5,0 mg/kg IgG( $\kappa$ ) murina de control (clon MOPC21) 5,0 mg/kg de anti-vWF policlonal de conejo (DAKO) o solución salina; había 3-4 animales en cada grupo de tratamiento.

Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley (Harlan) que pesaban 220-270 gramos con 60 mg/kg de pentobarbital de sodio. Una vez que alcanzaron un plano suficiente de anestesia, se expuso la arteria carótida y se colocó sobre un trozo de papel de filtro (4 mm x 5 mm), que se plegó a lo largo de 4 mm para acunar la arteria carótida y proporcionar una superficie para que el cloruro férrico (35%) bañara la carótida. Se aplicaron doce  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_3$  al 35% durante 5 minutos, a continuación, el papel de filtro se retiró y la sonda de flujo de un sistema de flujo Transonic Systems Inc. (Ithaca, NY) se colocó alrededor de la arteria carótida. El flujo se midió durante un máximo de 45 minutos.

Se registraron los valores medios y el ETM para las velocidades de flujo de varios animales por grupo en los puntos de tiempo específicos después de la administración de cloruro férrico. No hubo diferencias significativas en el tiempo hasta la oclusión observado con cualquiera de las dosis de TMC-2206 sometidas a ensayo, incluso tan altas como 15 mg/kg, en comparación con el control de disolución salina lo que indicó que no parecía haber ningún efecto adverso sobre la trombosis debido a administración de TMC-2206. Aunque los valores de flujo de partida pueden variar sustancialmente entre los animales, el tiempo hasta la oclusión se produjo constantemente entre 10 y 16 minutos después de la administración de cloruro férrico en los grupos tratados con TMC-2206, que fue muy similar al de los grupos tratados con disolución salina e IgG de control, que tuvieron tiempos medios hasta la oclusión de 12 y 14 minutos, respectivamente. El único tratamiento sometido a ensayo que estuvo asociado con la prevención de la oclusión fue el control positivo, un anticuerpo policlonal anti-vWF, que no dio como resultado ninguna reducción en los parámetros de flujo por períodos tan largos como 45 minutos después de la adición de  $\text{FeCl}_3$ .

## Ejemplo 12

Se estudiaron las propiedades de unión de los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 2$ , incluyendo estudios de mapeo de epítomos, para caracterizar la naturaleza del sitio de unión a TMC-2206 sobre la subunidad de integrina  $\alpha 2$ . Se puede esperar que un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  que se une directamente al sitio de unión a la diana y sirve como competidor directo para la unión del ligando produzca la activación de plaquetas tras la unión de la integrina  $\alpha 2\beta 1$ . Alternativamente, un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  que se une a la integrina  $\alpha 2\beta 1$  en un estado inactivo y no hace que la integrina sea activada podría tener un perfil no activador de plaquetas similar al que se encontró inesperadamente para TMC-2206. Los anticuerpos con el mismo o similar epítipo de unión que TMC-2206 inhibirían la adherencia celular de los leucocitos a colágeno, y por lo tanto tendrían una utilidad terapéutica significativa, pero no estarían asociados con las complicaciones hemorrágicas que podría tener un anticuerpo que se une a, y activa, la integrina  $\alpha 2\beta 1$ .

Se realizaron estudios para investigar si el epítipo reconocido por TMC-2206 estaba dentro del dominio I de

unión a ligando de la subunidad de integrina  $\alpha 2$ , o si era dependiente simplemente de la presencia de un dominio I intacto (Hangan et al., Cancer Res. 56: 3142-3149 (1996)). Para estos estudios, se elaboró una proteína de fusión de GST-dominio I de  $\alpha 2$  utilizando una versión modificada del protocolo descrito por Tuckwell et al., J. Cell Sci.108 (Pt 4): 1629-1637 (1995). El dominio I de  $\alpha 2$  humana se clonó a partir de ARNm aislado de aproximadamente  $10^6$  células CHO que expresaban la integrina  $\alpha 2$  humana (Symington et al., J Cell Biol 120 (2): 523-35 (1993). Las células se lisaron en reactivo Trizol (Gibco) y se añadió cloroformo para extraer la fase acuosa antes de la adición de 0,2 volúmenes de isopropanol para precipitar el ARN que se recogió por centrifugación y se resuspendió en agua libre de ARNasa.

Los cebadores que flanqueaban el dominio I de  $\alpha 2$  humana fueron sintetizados por Sigma-Genosys. Los cebadores fueron diseñados con sitios *Bam*HI y *Eco*RI en los extremos 5' y 3', respectivamente, para la clonación en el vector pGEX-2TK (GE Biosciences). Se utilizaron los cebadores halphal F (5'GGGGATCCAGTCCTGATTTTCAGCTCTCAG; SEQ ID NO: 117) y halphal R (5' GGGAATTCAACAGTACCTTCAATGCTG; SEQ ID NO: 118) (véase la Tabla 27) para una reacción de RT-PCR de un solo paso utilizando un kit de Qiagen convencional para amplificar los aminoácidos 123 a 346 de la subunidad de la integrina  $\alpha 2$  madura y para incorporar un sitio *Bam*HI en el extremo amino (que añade GS aguas arriba del residuo 124 del dominio I) y un hexapéptido EFIVTD adicional como parte del sitio de clonación *Eco*RI a través del codón de parada. Se detectó una sola banda por electroforesis en gel de agarosa. La reacción de PCR se limpió usando un Kit Qiagen PCR Quick, el producto se digirió con enzimas de restricción y se clonó en el vector pGEX-2TK (Amersham, GE) utilizando técnicas convencionales de biología molecular. Las bacterias transformadas se escrutaron para determinar los insertos y varios clones se secuenciaron utilizando un sistema CEQ de Beckman-Coulter. La secuencia de aminoácidos deducida como clonada era idéntica a la secuencia disponible de un dominio I de  $\alpha 2$  humana (SEQ ID NO: 11, que se muestra en la Tabla 28). Un solo clon que contenía el inserto de ADN correcto se amplificó en células DH5a (Invitrogen) y se volvió a transformar en bacterias electro-competentes BL21 (Invitrogen).

Tabla 27

Nombre del cebador	Secuencias de nucleótidos (5'-3')
halphal F	GGGGATCCAGTCCTGATTTTCAGCTCTCAG
(SEQ ID NO:117)	
halphal R	GGGAATTCAACAGTACCTTCAATGCTG
(SEQ ID NO:118)	
malphal F	GGGGATCCAGTCCAGACTTTTCAGTTCTTG
(SEQ ID NO:121)	
malphal R	TGGGAATTCAACAGTGCCTTCAATGCTG
(SEQ ID NO:122)	
ralphal F	GGGGATCCAGTCCAGACTTTTCAGTCGTTGAC
(SEQ ID NO:123)	
ralphal R	TGGGAATTCTGCCATTTCCATCTGGAAGTTG
(SEQ ID NO:124)	
halphal I21V F	CAGCCCTGCCCTTCCCTCGTAGATGTTGTGGTTG
(SEQ ID NO:125)	

ES 2 541 302 T3

Nombre del cebador	Secuencias de nucleótidos (5'-3')
halphal I21V R	CAACCACAACATCTACGAGGGAAGGGCAGGGCTG
(SEQ ID NO:126)	
halphal E44V	CAGTAAAGAATTTTTGGTAAAATTTGTCAAGG
(SEQ ID NO:127)	
halphal E44V R	CCTTGACAAATTTTACCAAAAAATTCTTTACTG
(SEQ ID NO:128)	
halphal Q48T F	TTTTGGAAAAATTTGTAACAGGCCTGGATATAGGC
(SEQ ID NO:129)	
halphal Q48T R	GCCTATATCCAGGCCTGTTACAAATTTTTCCGGGG
(SEQ ID NO:130)	
halphal N67E F	CAGTATGCCAATGAGCCAAGAGTTGTGTTAAC
(SEQ ID NO:131)	
halphal N67E R	GTAAACACAACCTCTGGCTCATTGGCATACTG
(SEQ ID NO:132)	
halphal V70I F	TGCCAATAATCCAAGAATTGTGTTAACTTGAAC
(SEQ ID NO:133)	
halphal V70I R	GTTCAAGTTAACACAATTCTTGGATTATTGGCA
(SEQ ID NO:134)	
halphal V71I F	CCAATAATCCAAGAGTTATCTTTAACTTGAACAC
(SEQ ID NO:135)	
halphal V71I R	GTGTTCAAGTTAAAGATAACTCTTGGATTATTGG
(SEQ IF NO:136)	
halphal T76D F	GTGTTAACTTGAACGACTATAAAACCAAAGAA
(SEQ ID NO:137)	
halphal T76D R	TTCTTTGGTTTTATAGTCGTTCAAGTTAAACAC
(SEQ ID NO:138)	

ES 2 541 302 T3

Nombre del cebador	Secuencias de nucleótidos (5'-3')
halphal Y77F F	TTTAACTTGAACACATTTAAAACCAAAGAAGAA
(SEQ ID NO:139)	
halphal Y77F R	TTCTTCTTTGGTTTTAAATGTGTTCAAGTTAAA
(SEQ ID NO:140)	
halphal K78E F	AACTTGAACACATATGAAACCAAAGAAGAAATG
(SEQ ID NO:141)	
halphal K78E R	CATTTCTTCTTTGGTTTCATATGTGTTCAAGTT
(SEQ ID NO:142)	
halphal Y93H F	TCCAGACATCCCAACATGGTGGGGACCTCACA
(SEQ ID NO:143)	
halphal Y93H R	TGTGAGGTCCCCACCATGTTGGGATGTCTGGGA
(SEQ ID NO:144)	
halphal Y93F F	ACATGGGAGACATCCCAATTTGGTGGGGACCTCACAAAC
(SEQ ID NO:145)	
halphal Y93F R	GTTTGTGAGGTCCCCACCAAATTGGGATGTCTCCCATGT
(SEQ ID NO:146)	
halphal Q105E F	TTCGGAGCAATTGAATATGCAAGAAAATATGCC
(SEQ ID NO:147)	
halphal Q105E R	GGCATATTTTCTTGCATATTCAATTGCTCCGAA
(SEQ ID NO:148)	
halphal A114Q F	AAATATGCCTATTCACAAGCTTCTGGTGGGCGACGAAGT
(SEQ ID NO:149)	
halphal A114Q R	ACTTCGTCGCCACCAGAAGCTTGTGAATAGGCATATTT
(SEQ ID NO:150)	
halphal A115T F	AAATATGCCTATTCAGCAACTTCTGGTGGGCGACGAAGT
(SEQ ID NO:151)	

ES 2 541 302 T3

Nombre del cebador	Secuencias de nucleótidos (5'-3')
halphal A115T R	ACTTCGTCGCCCACCAGA AGTTGCTGAATAGGCATATTT
(SEQ ID NO:152)	
halphal A115Q F	AAATATGCCTATTCAGCACAGTCTGGTGGGCGACGAAGT
(SEQ ID NO:153)	
halphal A115Q R	ACTTCGTCGCCCACCAGACTGTGCTGAATAGGCATATTT
(SEQ ID NO:154)	
halphal R165D F	GTTCTTGGGTACTTAAACGACAACGCCCTTGATACTAAA
(SEQ ID NO:155)	
halphal R165D R	TTTAGTATCAAGGGCGTTGTCGTTTAAGTACCCAAGAAC
(SEQ ID NO:156)	
halphal N166D F	CTTGGGTACTTAAACAGGGACGCCCTTGATACTAAAAAT
(SEQ ID NO:157)	
halphal N166D R	ATTTTTAGTATCAAGGGCGTCCCTGTTTAAGTACCCAAG
(SEQ ID NO:158)	
halphal E195W F	TTCAATGTGTCTGATTGGGCAGCTCTACTAGAAAAGGCTG
(SEQ ID NO:159)	
halphal E195V5W R	CAGCCTTTTCTAGTAGAGCTGCCCAATCAGACACATTGAA
(SEQ ID NO:160)	
halphal K40D F	ATCCTTGGGATGCAGTAGACAATTTTTTGAAAAATTT
(SEQ ID NO:161)	
halphal K40D R	AAATTTTTCCAAAAAATTGTCTACTGCATCCCAAGGAT
(SEQ ID NO:162)	
halphal R69D F	CAGTATGCCAATAATCCAGACGTTGTGTTTAACTTGAAC
(SEQ ID NO:163)	
halphal R69D R	GTTCAAGTTAAACACAACGTCTGGATTATTGGCATACTG
(SEQ ID NO:164)	

ES 2 541 302 T3

Nombre del cebador	Secuencias de nucleótidos (5'-3')
halphal N73D F	AATCCAAGAGTTGTGTTTGACTTGAACACATATAAA
(SEQ ID NO:165)	
halphal N73D R	TTTATATGTGTTCAAGTCAAACACAACCTCTTGATT
(SEQ ID NO:166)	
halphal Q89H F	ATGATTGTAGCAACATCCCACACATCCCAATATGGTGGG
(SEQ ID NO:167)	
halphal Q89H R	ATGATTGTAGCAACATCCCACACATCCCAATATGGTGGG
(SEQ ID NO:168)	
malphalH93Y F	CACATCTGAGACGCGCCAATATGGTGGGGACCTCACAAAC
(SEQ ID NO:169)	
malphalH93Y R	GTTTGTGAGGTCCCCACCATATTGGCGCGTCTCAGATGTG
(SEQ ID NO:170)	
halphal F	GGGGATCCAGTCCTGATTTTCAGCTCTCAG
(SEQ ID NO:117)	
halphal R	GGAATTCAACAGTACCTTCAATGCTG
(SEQ ID NO:118)	
malphal F	GGGGATCCAGTCCAGACTTTCAGTTCTTG
(SEQ ID NO:121)	
malphal R	TGGGAATTCAACAGTGCCTTCAATGCTG
(SEQ ID NO:122)	
ralphal F	GGGGATCCAGTCCAGACTTTCAGTCGTTGAC
(SEQ ID NO:123)	
ralphal R	TGGGAATTCTGCCATTTCCATCTGGAAGTTG
(SEQ ID NO:124)	
halphal I21V F	CAGCCCTGCCCTTCCCTCGTAGATGTTGTGGTTG
(SEQ ID NO:125)	

ES 2 541 302 T3

Nombre del cebador	Secuencias de nucleótidos (5'-3')
halphal I21V R (SEQ ID NO:126)	CAACCACAACATCTACGAGGGAAGGGCAGGGCTG
halphal E44V (SEQ ID NO:127)	CAGTAAAGAATTTTTGGTAAAATTTGTCAAGG
halphal E44V R (SEQ ID NO:128)	CCTTGACAAAATTTTACCAAAAAATTTCTTTACTG
halphal Q48T F (SEQ ID NO:129)	TTTTGGAAAAATTTGTAACAGGCCTGGATATAGGC
halphal Q48T R (SEQ ID NO:130)	GCCTATATCCAGGCCTGTTACAAATTTTTCCGGGG
halphal N67E F (SEQ ID NO:131)	CAGTATGCCAATGAGCCAAGAGTTGTGTTTAAC
halphal N67E R (SEQ ID NO:132)	GTAAACACAACCTCTTGGCTCATTGGCATACTG
halphal V70I F (SEQ ID NO:133)	TGCCAATAATCCAAGAATTGTGTTTAACTTGAAC
halphal V70I R (SEQ ID NO:134)	GTTCAAGTTAACACAATTCTTGGATTATTGGCA
halphal V71I F (SEQ ID NO:135)	CCAATAATCCAAGAGTTATCTTTAACTTGAACAC
halphal V71I R (SEQ IF NO:136)	GTGTTCAAGTTAAAGATAACTCTTGGATTATTGG
halphal T76D F (SEQ ID NO:137)	GTGTTTAACTTGAACGACTATAAAACCAAAGAA

ES 2 541 302 T3

Nombre del cebador	Secuencias de nucleótidos (5'-3')
halphal T76D R	TTCTTTGGTTTTATAGTCGTTCAAGTTAAACAC
(SEQ ID NO:138)	
halphal Y77F F	TTTAACTTGAACACATTTAAAACCAAAGAAGAA
(SEQ ID NO:139)	
halphal Y77F R	TTCTTCTTTGGTTTTAAATGTGTTCAAGTTAAA
(SEQ ID NO:140)	
halphal K78E F	AACTTGAACACATATGAAACCAAAGAAGAAATG
(SEQ ID NO:141)	
halphal K78E R	CATTTCTTCTTTGGTTTCATATGTGTTCAAGTT
(SEQ ID NO:142)	
halphal Y93H F	TCCCAGACATCCCAACATGGTGGGGACCTCACA
(SEQ ID NO:143)	
halphal Y93H R	TGTGAGGTCCCCACCATGTTGGGATGTCTGGGA
(SEQ ID NO:144)	
halphal Y93F F	ACATGGGAGACATCCCAATTTGGTGGGGACCTCACAAC
(SEQ ID NO:145)	
halphal Y93F R	GTTTGTGAGGTCCCCACCAAATTGGGATGTCTCCCATGT
(SEQ ID NO:146)	
halphal Q105E F	TTCGGAGCAATTGAATATGCAAGAAAATATGCC
(SEQ ID NO:147)	
halphal Q105E R	GGCATATTTTCTTGCATATTCAATTGCTCCGAA
(SEQ ID NO:148)	
halphal A114Q F	AAATATGCCTATTCACAAGCTTCTGGTGGGCGACGAAGT
(SEQ ID NO:149)	
halphal A114Q R	ACTTCGTCGCCACCAGAAGCTTGTGAATAGGCATATTT
(SEQ ID NO:150)	

ES 2 541 302 T3

Nombre del cebador	Secuencias de nucleótidos (5'-3')
halphal A115T F (SEQ ID NO:151)	AAATATGCCTATTCAGCAACTTCTGGTGGGCGACGAAGT
halphal A115T R (SEQ ID NO:152)	ACTTCGTCGCCCACCAGA AGTTGCTGAATAGGCATATTT
halphal A115Q F (SEQ ID NO:153)	AAATATGCCTATTCAGCACAGTCTGGTGGGCGACGAAGT
halphal A115Q R (SEQ ID NO:154)	ACTTCGTCGCCCACCAGACTGTGCTGAATAGGCATATTT
halphal R165D F (SEQ ID NO:155)	GTTCTTGGGTACTTAAACGACAACGCCCTTGATACTAAA
halphal R165D R (SEQ ID NO:156)	TTTAGTATCAAGGGCGTTGTCGTTTAAGTACCCAAGAAC
halphal N166D F (SEQ ID NO:157)	CTTGGGTACTTAAACAGGGACGCCCTTGATACTAAAAAT
halphal N166D R (SEQ ID NO:158)	ATTTTTAGTATCAAGGGCGTCCCTGTTTAAGTACCCAAG
halphal E195W F (SEQ ID NO:159)	TTCAATGTGTCTGATTGGGCAGCTCTACTAGAAAAGGCTG
halphal E195V5W R (SEQ ID NO:160)	CAGCCTTTTCTAGTAGAGCTGCCCAATCAGACACATTGAA
halphal K40D F (SEQ ID NO:161)	ATCCTTGGGATGCAGTAGACAATTTTTTGGAAAAATTT
halphal K40D R (SEQ ID NO:162)	AAATTTTTCCAAAAAATTGTCTACTGCATCCCAAGGAT
halphal R69D F (SEQ ID NO:163)	CAGTATGCCAATAATCCAGACGTTGTGTTAACTTGAAC

Nombre del cebador	Secuencias de nucleótidos (5'-3')
halphal R69D R	GTTCAAGTTAAACACAACGTCTGGATTATTGGCATACTG
(SEQ ID NO:164)	
halphal N73D F	AATCCAAGAGTTGTGTTTGACTTGAACACATATAAA
(SEQ ID NO:165)	
halphal N73D R	TTTATATGTGTTCAAGTCAAACACAACCTCTGGATT
(SEQ ID NO:166)	
halphal Q89H F	ATGATTGTAGCAACATCCCACACATCCCAATATGGTGGG
(SEQ ID NO:167)	
halphal Q89H R	ATGATTGTAGCAACATCCCACACATCCCAATATGGTGGG
(SEQ ID NO:168)	
malphalH93Y F	CACATCTGAGACGCGCCAATATGGTGGGGACCTCACAAAC
(SEQ ID NO:169)	
malphalH93Y R	GTTTGTGAGGTCCCCACCATATTGGCGCGTCTCAGATGTG
(SEQ ID NO:170)	

La proteína de fusión de GST con el dominio  $\alpha 21$  humano se expresó en bacterias BL21 con crecimiento logarítmico utilizando IPTG como un agente inductor. Aproximadamente 4 horas después de la inducción, las bacterias se recogieron y se sedimentaron a 3000 RPM en tubos cónicos de 50 mL. El sedimento se resuspendió en PBS que contenía Triton X-100 al 1% e inhibidores de proteasa. El producto homogeneizado se sometió a sonicación durante 1 minuto y se centrifugó a 3000 RPM para aclarar el producto lisado de los desechos celulares. La proteína de fusión GST se purificó a partir de productos lisados bacterianos utilizando perlas de glutatión-Sefarosa (GE-Amersham) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se hicieron eluir en TBS (pH 8,0) que contenía glutatión libre 20 mM. El dominio I de GST- $\alpha 2$  purificado se unió al colágeno con misma especificidad que se ha informado anteriormente (Tuckwell et al., J Cell Sci. 108 (Pt 4): 1629-1637 (1995)), es decir, una mayor afinidad por el colágeno de Tipo I en comparación con el de Tipo IV. Este se unía a TMC-2206 inmovilizado con una  $K_d$  aparente por medio de ELISA de 0,31 nM, que era comparable a la afinidad observada en la unión de TMC-2206 a integrina  $\alpha 2\beta 1$  intacta de 0,37 nM derivada de los estudios de unión directa descritos en el Ejemplo 2. La proteína de fusión de GST-dominio I de  $\alpha 2$  soluble se evaluó a continuación para determinar su capacidad para competir con TMC-2206 marcado con Eu por la unión a placas recubiertas de  $\alpha 2\beta 1$  como se describe en el Ejemplo 2. Se encontró que el valor de  $K_i$  para el dominio GST-dominio I de  $\alpha 2$  soluble era similar (0,18 nM en comparación con 0,28 nM) a la obtenida para TMC-2206 no marcado, lo que indica que el sitio de unión para TMC-2206 estaba dentro del dominio I de  $\alpha 2$  y no requería la presencia de la subunidad  $\beta 1$ .

Se realizaron estudios para investigar la dependencia de cationes de la unión por TMC-2206. La dependencia de cationes indica que un radical de unión se está dirigiendo al sitio de unión al catión divalente (MIDAS) de una integrina, y actuando de ese modo como un mimético de ligando. La unión de colágeno a  $\alpha 2$  es dependiente de  $Mg^{++}$  en condiciones fisiológicas normales, mientras que no se produce ninguna unión cuando  $Mg^{++}$  se sustituye por  $Ca^{++}$  (Staatz et al., Cell Biol 108 (5): 1917-1924 (1989); Emsley et al., Cell 101(1): 47-56 (2000)). Para estos estudios, la proteína de fusión de GST-dominio I de  $\alpha 2$  se inmovilizó sobre placas de microtitulación recubiertas con glutatión Reacti-Bind (Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL) y se determinó la capacidad de TMC-2206 marcado con Eu para unirse en diferentes condiciones de cationes (libre de Ca y Mg,  $Ca^{++}$  o  $Mg^{++}$  a concentraciones que varían de 0,1  $\mu M$  a 3 mM). Las placas se recubrieron incubando 100  $\mu L$ /pocillo de proteína de fusión de GST- $\alpha 21$  (2,0  $\mu g/mL$  en Tampón de Lavado libre de cationes divalentes: HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM y Tween-20 al 0,5%) durante 1 hora a la temperatura ambiente y los pocillos se lavaron cuatro veces en Tampón de Lavado libre de cationes divalentes. Los pocillos se bloquearon usando 100  $\mu L$ /pocillo de Tampón de Bloqueo

(Tampón de Lavado que contenía 3,0 mg/mL de BSA libre de IgG [Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA]) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavó cuatro veces en Tampón de Lavado libre de catión divalente, y se empapó en Tampón de Lavado libre de catión divalente (300 µL/pocillo) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se equilibraron adicionalmente en Tampón de Lavado (300 µL/pocillo) que contenía el nivel deseado de cationes divalentes durante 30 minutos y después se incubaron durante 1 hora a 37°C en presencia de o TMC-2206 marcado con Eu 41 pM, 199 pM, 345 pM o 1 nM, o anticuerpo de control. El anticuerpo TMC-2206 murino se unió de una manera dependiente de la concentración, con una potencia similar en todas las condiciones, lo que indica que su unión al dominio I de  $\alpha 2$  era independiente de cationes, y por lo tanto no implicaba al sitio MIDAS. El IgG de control marcado con Eu no se unió a los pocillos recubiertos con integrina  $\alpha 2\beta 1$  confirmando que la unión era específica.

Se llevaron a cabo estudios adicionales para investigar el sitio de unión de TMC-2206. Los ligandos de integrina tienen típicamente un ácido clave que forma el enlace quelante final para el ion de metal divalente (Haas y Plow, Curr. Opin. Cell Bio. 1994; Lee et al., Structure 1995) una característica compartida por muchos antagonistas de integrina, incluyendo el mAb anti-integrina  $\alpha 1$ , AQC2 (Karpusas et al., J. Mol. Biol. 2003) en el que el ácido es proporcionado por el residuo D101 dentro de CDR-H3. Por analogía, el D100 de TMC-2206 CDR-H3 podría proporcionar una interacción de este tipo con el MIDAS de  $\alpha 2$ . Por lo tanto, se generaron dos anticuerpos que contenían VH murina variante, uno que llevaba una mutación D100A y uno una mutación D100R. Su capacidad para competir por la unión a Eu-TMC-2206 se evaluó a continuación en el ensayo de  $K_i$  en comparación con el anticuerpo quimérico ratón-humano TMC-2206. El mutante D100A era completamente inactivo a concentraciones de hasta 0,9 µM que representaba un cambio mayor de 1600 veces en la potencia con respecto a la del anticuerpo quimérico ratón-humano TMC-2206. En contraste, el mutante de carga inversa D100R fue casi tan potente como el anticuerpo quimérico TMC-2206 ratón-humano como se pone de manifiesto por los valores de  $K_i$  similares (0,41 nM en comparación con 0,52 nM). Esto proporciona una evidencia en contra de cualquier papel para el residuo D100 de TMC-2206 en el acoplamiento en el complejo de quelante metálico que forma el sitio del ligando MIDAS.

Se llevaron a cabo estudios adicionales para investigar la especificidad de unión de TMC-2206, incluyendo los estudios de mapeo de epítomos, con este anticuerpo monoclonal murino que se dirige contra el dominio I de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  humana. TMC-2206 presenta reacción cruzada con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  de rata, pero no presenta reacción cruzada con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  de ratón. Puesto que las proteínas integrina  $\alpha 2\beta 1$  comparten una alta homología entre especies, los residuos de  $\alpha 2\beta 1$  que son importantes para la unión a los anticuerpos fueron identificados por medio de métodos que identificarían las diferencias que existen entre las especies que presentan reacción cruzada con el anticuerpo en comparación con aquellas que no lo hacen (p, ej., Champe et al., J. Biol. Chem. 270(3): 1388-1394 (1995); Karpusas et al., J. Mol. Biol. 327 (5): 1031-1041 (2003); Bonnefoy et al., Blood 101(4): 1375-83). Se ha analizado la estructura cristalina I del dominio de la integrina  $\alpha 2$  solo y cuando forma complejo con su ligando diana, el colágeno (Emsley et al., J. Biol. Chem. 272(45): 28512-7 (1997); Emsley et al., Cell 101(1): 47-56 (2000)). En la Tabla 28 se muestra una comparación de la secuencia de los dominios de  $\alpha 2$  I humana (SEQ ID NO: 11),  $\alpha 2$  I de rata (SEQ ID NO: 93), y  $\alpha 2$  I de ratón (SEQ ID NO: 94), obtenidos a partir de presentaciones de Genbank. Este análisis revela que el dominio I de ratón que contiene 14 residuos que difieren de los dominios  $\alpha 2$  I tanto humano como de rata (mostrados en negrita y subrayados en la Tabla 28). Estos residuos se utilizaron para estudiar más a fondo el epítomo de unión de TMC-2206.

Tabla 28

$\alpha 2$ I humano	1 SPDFQLSASF SPATQPCPSL IDVVVVCDES NSIYPWDAVK NFLE <b>KFVQGL</b> DIGPTKTQVG
$\alpha 2$ I de rata	1 SPDFQSLTSF SPAV----- <b>QDWVVCDES</b> NSIYPWEAVK NFLE <b>KFVQGL</b> DIGPKKTQVA
$\alpha 2$ I de ratón	1 SPDFQ <b>FL</b> TSF SPAVQACPSL <b>V</b> DVVVVCDES NSIYPWEAVK NFL <b>V</b> KF <b>V</b> <b>T</b> IGL DIGPKKTQVA
$\alpha 2$ I humano	61 LIQYANNPRV <b>V</b> FNLNTY <b>KTK</b> <b>E</b> EEMIVATSQT SQYGGDLTNT FGAI <b>Q</b> YARKY AYS <b>A</b> ASGGRR
$\alpha 2$ I de rata	61 LIQYANDPRV VFNL <b>T</b> TY <b>K</b> KNK <b>E</b> DMVQATSET RQYGGDLTNT FKAI <b>Q</b> FARDI AYL <b>P</b> ESGGRP
$\alpha 2$ I de ratón	61 LIQYAN <b>E</b> PR <b>I</b> <b>I</b> FNLN <b>D</b> F <b>E</b> TK EDMVQATSET RQ <b>H</b> GGDLTNT FRAI <b>E</b> FARDY AYSQTS <b>Q</b> TSSGRP
$\alpha 2$ I humano	121 SATKVMVVVT DGESHGDSML KAVIDQCNHD NILRFGIAVL GYLNRNALDT KNLIKEIKAI

α2I de rata	121 GATKVMVVVT DGESHGSKL QTVIQQCNDD EILRFGIAVL GYLNRNALDT KNLIKEIKAI
α2I de ratón	121 GATKVMVVVT DGESHGSKL KTVIQQCNDD EILRFGIAVL GYLNRNALDT KNLIKEIKAI
α2I humano	181 ASIPTERYFF NVSDEAALLE KAGTLGEQIF SIEGTVQGGD NFMEM
α2I de rata	181 ASTPTERYFF NVADEAALLE KAGTLGEHIF SIEGTVQGGD NFMEMAQ
α2I de ratón	181 ASTPTERYFF NVSDEAALLE KAGTLGEQIF SIEGTVQGGD NFMEMSQ

Se clonaron tanto el dominio I de GST-α2 de ratón como el de rata en forma de proteínas de fusión con GST para confirmar que se conservaba la reactividad cruzada apropiada por los respectivos dominios I mediante la metodología de PCR tal como se describe en el Ejemplo 3. El dominio I de α2 murina se clonó a partir de ARNm aislado de riñón de ratón Balb/C por medio de RT-PCR utilizando los cebadores malphal F (SEQ ID NO: 121) y malphal R (SEQ ID NO: 122) y el dominio I de α2 de rata a partir de un riñón de rata Sprague Dawley por medio de RT-PCR utilizando los cebadores ralphal F (SEQ ID NO: 123) y ralphal R (SEQ ID NO: 124). Además se clonaron dos dominios I de α2 de primates a partir de sedimentos de glóbulos blancos de la sangre obtenidos por centrifugación a baja velocidad de la sangre fresca extraída de monos rhesus y cynomolgus individuales. Los glóbulos blancos se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Un total de  $5 \times 10^6$  (rhesus) y  $2 \times 10^6$  (cynomolgus) células se lisaron en 1 ml de Trizol (Invitrogen, núm. de Cat 15596-026) y el ARN total se preparó como se ha descrito anteriormente. El sedimento de ARN final se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC. Este sirvió como molde para la primera etapa de la transcriptasa inversa (RT). La reacción RT consistió en 8 µl de ARN celular (2,24 µg para ARNm de Rhesus, 1,44 µg para ARNm de cynomolgus), 1 µl (10 mM) de dNTPs y 1 µl (2 µM) del cebador directo para el dominio I humano (GGGGATCCAGTCCTGATTT; SEQ ID NO: 119). Esta mezcla se incubó a 65°C durante 5 min, se enfrió en hielo. A continuación se utilizaron cinco µl de este ADNc como molde para la reacción de amplificación por PCR, utilizando los cebadores directo e inverso humanos (Directo: GGGGATCCAGTCCTGATTT, SEC ID NO: 119; Inverso: GGAATTCAACAGTACCTT, SEC ID NO: 120). Los tiempos del ciclo fueron 1 ciclo a 94°C durante 30 seg., 94°C durante 30 seg., 55°C durante 30 seg., 40 ciclos a 68°C durante 1 min. y 1 ciclo a 68°C durante 5 min. Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% y la banda (del tamaño esperado) se purificó directamente a partir del gel de agarosa, se digirió con *Bam*HI y *Eco*RI y se clonó en los mismos sitios en el vector pGEX-2TK y se transformó en bacterias BL21.

Se aislaron colonias individuales y los insertos se secuenciaron utilizando un analizador de ADN Beckman CEQ 8000 para verificar la identidad del dominio I de α2 murino y de rata y determinar la homología de secuencia de las dos especies de monos con la humana. La secuencia murina clonada mostró una identidad exacta con la región del dominio I de la secuencia depositada, NM\_008396.1. Del mismo modo, la secuencia de rata clonada era idéntica a la entrada de Genbank para integrina de rata, XM\_34156.1, con la excepción de que la secuencia clonada contenía 6 residuos adicionales con respecto a la secuencia depositada, lo que permitió que la región entre los residuos 16 y 21 (residuos 139 a 144 de la integrina α2 intacta) del dominio rata fuera traducida con precisión. Esta secuencia de aminoácidos, ACPSLV, era idéntica a los residuos de ratón en estas posiciones.

A nivel de nucleótidos las dos secuencias de primate mostraron una homología muy alta con las secuencias del dominio I de α2 humana. El dominio I de α2 de rhesus en la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 104) mostró sólo una diferencia de nucleótidos con la secuencia de nucleótidos humana, dentro de codón 50, un cambio de CTT a CTG, pero ya que ambos codificaban una leucina, las secuencias de proteínas deducidas fueron idénticas a la humana. La secuencia de nucleótidos del dominio I de α2 de cynomolgus (SEQ ID NO: 103) fue idéntica a la humana, excepto para el codón 40, donde había un cambio de la AAG humana a GAC. Esto da como resultado un cambio de lisina a un residuo de ácido aspártico en esta posición. Sin embargo, estudios posteriores revelaron que este cambio de nucleótido es debido a un polimorfismo que no se conserva a través de los animales, ya que otros cynomolgus mostraron una homología de 100% para el dominio I de α2 humana (véase el Ejemplo 18).

A continuación se expresaron las proteínas de fusión y se purificaron como se ha descrito anteriormente para la proteína de fusión de GST-dominio I de α2 humana. El análisis del material eluido de la columna de glutationa-Sefarosa indicó que las proteínas de fusión de roedores contenían formas agregadas. Por lo tanto, estas y las proteínas de fusión de primates se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Sephadex 75 10/30 (GE-Amersham) (primate) por FPLC en un sistema Akta-Basic FPLC (GE-Amersham) para producir una fracción monomérica. Las proteínas de fusión GST se sometieron a ensayo a continuación para determinar su capacidad para unirse a TMC-2206 inmovilizado, así como su capacidad para competir con TMC-2206 marcado con Eu por la unión a la integrina α2β1 humana inmovilizada. Los análisis de  $K_i$  se realizaron como se describe anteriormente en el Ejemplo 2. Para evaluar la unión directa a TMC-2206, se

recubrieron 4 placas Immulon utilizando 50  $\mu$ l de una disolución de bicarbonato (pH 9,0) que contenía 5  $\mu$ g/ml de TMC-2206. Las placas se sellaron y el recubrimiento se produjo durante la noche a 4°C. A la mañana siguiente, las placas se lavaron dos veces con di solución de TBS y luego se bloquearon utilizando 200  $\mu$ l de la solución de bloqueo descrito anteriormente durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Después del bloqueo, la solución de bloqueo se retiró pero los pocillos no se lavaron. En lugar de ello, se llevó a cabo una dilución en serie de proteína de fusión con GST, se añadió a los pocillos y después se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Los pocillos se aspiraron después y se aplicó un tampón de lavado de TBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. La etapa de lavado se repitió dos veces más antes de aplicar el anticuerpo secundario. La etapa del anticuerpo secundario consistió en anticuerpo anti-GST de conejo conjugado con HRP de Amersham diluido 1:2000 en tampón de bloqueo. Se añadieron cien  $\mu$ l de anticuerpo secundario a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1,5 horas con sacudimiento. Los pocillos se aspiraron de nuevo y se lavaron tres veces con tampón de lavado antes de añadir la mezcla de reacción del sustrato. Después se añadieron 100  $\mu$ l de mezcla de reacción de sustrato (dilución 1:1 del kit TMB), a cada pocillo durante 6 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M. La reacción dentro de los pocillos se leyó a continuación y se cuantificó mediante absorción espectrofotométrica utilizando el lector de placas de Molecular Dynamics y el soporte lógico Softmax asociado, respectivamente. A continuación se estimaron los valores de  $K_d$  a partir de los valores de  $CE_{50}$  utilizando el soporte lógico Prism (GraphPad, CA).

Hubo un cambio de 3 veces en  $K_d$  para la unión de I de  $\alpha 2$  de a TMC-2206 en comparación con  $\alpha 2$  humana, mientras que la proteína de fusión de GST-I de  $\alpha 2$  murina mostró sólo una ligera unión específica a la mayor concentración, lo que representa un cambio mayor de 1500 veces en la afinidad (véase la Tabla 29). La GST-I de  $\alpha 2$  de rhesus mostró una afinidad comparable a la humana, mientras que de forma inesperada, la GST-I de  $\alpha 2$  de mono cynomolgus no mostró ninguna afinidad detectable por TMC-2206 hasta concentraciones de 1  $\mu$ Ma. Estas clasificaciones relativas también se observaron en el análisis de la  $K_i$ . La falta de reactividad cruzada de la proteína de fusión de GST-dominio I de cynomolgus I hacia TMC-2206 indica que el residuo K40 puede ser un factor determinante del epítipo. La diferencia en la afinidad de la GST-I de  $\alpha 2$  de rata clonada (valor de  $K_d$  de 0,54 nM y de  $K_i$  de 3,8 nM) en comparación con la proteína de fusión de GST-I de  $\alpha 2$  humana (valor de  $K_d$  de 0,18 y de  $K_i$  de 0,33 nM) es consistente con el cambio en los valores de  $CE_{50}$  encontrados en los análisis de TMC-2206 para determinar su capacidad para suscitar antagonismo sobre la adherencia de las plaquetas de nueva aportación de rata en comparación con las plaquetas humanas a colágeno de Tipo I, tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 9. Del mismo modo la falta de reactividad cruzada de la proteína de fusión de GST-I de  $\alpha 2$  ratón con TMC-2206 es consistente con la falta de reactividad cruzada del anticuerpo intacto con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  de ratón.

Tabla 29

Proteína de fusión	$K_d$ (nM)	$k_i$ (nM)
h $\alpha 2$ I	0,18	0,33
$\alpha 2$ de rata	0,54	3,8
$\alpha 2$ de ratón	ND*	ND*
$\alpha 2$ de Cynomolgus	ND@40nM	ND*
$\alpha 2$ de Rhesus	0,04	4,4
GST	ND*	ND*
*ND indica no detectable hasta concentraciones de $\sim 1 \mu$ M		

En estudios adicionales, los 14 residuos correspondientes a las diferencias únicas en el dominio I de  $\alpha 2$  murina en comparación con los dominios I de  $\alpha 2$  humana y de rata se mutaron individualmente en la proteína de fusión del dominio I de  $\alpha 2$  humana clonada por PCR utilizando métodos convencionales de la biología molecular (las secuencias de cebadores se muestran en la Tabla 30). Los clones bacterianos individuales se secuenciaron para verificar que la mutación correcta se había incorporado al dominio I. Una variante pretendida, el mutante G101R, no proporcionó un clon correcta y no se estudió más. Los cebadores diseñados para crear la mutación Y93H dieron como resultado una serie de clones que llevaba en su lugar una mutación Y93D. Se evaluaron ambas variantes de Y93. Todos los demás tenían una secuencia correcta. Las variantes de proteínas resultantes se expresaron y se purificaron como se ha descrito anteriormente para las proteínas de fusión de dominio I de  $\alpha 2$  humana wt-GST. Éstas se sometieron a ensayo a continuación para determinar la actividad de tres maneras: primero por su

capacidad relativa para unirse a diferentes colágenos para asegurar que las mutaciones no introdujeran perturbaciones conformacionales brutas que pudieran interferir en la unión del ligando; segundo, por su afinidad aparente para TMC-2206 (unión directa a TMC-2206 inmovilizado medida por ELISA) y tercero, por su capacidad para actuar como ligandos competitivos en el análisis de  $K_i$ . Los datos de  $K_i$   $K_d$  aparente también se resumen en la Tabla 30.

5

Tabla 30

Mutaciones de la proteína de fusión	$K_d$ aparente (nM)	$K_i$ (nM)
Dominio I de $\alpha 2$	0,31	0,18
Dominio I de $\alpha 2$ 121V	0,28	0,24
Dominio I de $\alpha 2$ E44V	0,23	0,35
Dominio I de $\alpha 2$ Q48T	0,19	0,73
Dominio I de $\alpha 2$ N67E	0,28	0,40
Dominio I de $\alpha 2$ V70I	0,44	0,86
Dominio I de $\alpha 2$ V71I	0,19	0,83
Dominio I de $\alpha 2$ T76D	0,17	0,15
Dominio I de $\alpha 2$ Y77F	0,22	0,39
Dominio I de $\alpha 2$ K78E	0,16	0,51
Dominio I de $\alpha 2$ Y93D	ND@440nM	ND*
Dominio I de $\alpha 2$ Y93H	6,1	ND*
Dominio I de $\alpha 2$ Q105E	0,15	0,38
Dominio I de $\alpha 2$ A114Q	0,19	0,64
Dominio I de $\alpha 2$ A115T	0,19	0,76
*ND = no detectable hasta concentraciones de $\sim 1 \mu\text{M}$ .		

De los 13 residuos evaluados, 12 se cambiaron al homólogo murino con efectos menores sobre la afinidad, pero los cambios en Y93 causaron una marcada pérdida en la afinidad como se muestra en la Tabla 31. La mutación Y93D abolió la capacidad de unirse a antígeno incluso a concentraciones de 3-logs por encima del valor de la  $K_d$  para la proteína de fusión de dominio I wt con GST. El cambio a la histidina murina (Y93H) causó una disminución de 23 veces en la afinidad aparente hacia el antígeno de TMC-2206. Ambas mutaciones abolieron la capacidad de GST-dominio I para suscitar antagonismo sobre la unión del anticuerpo marcado con Eu a su antígeno. El cambio de la H93 murina a Y confirió la capacidad del dominio I de  $\alpha 2$  murina para unirse a TMC-2206, aunque con una disminución de 200 veces en la potencia con respecto al dominio I de  $\alpha 2$  wt humana, como se muestra en la Tabla 31.

10

15

Tabla 31

Mutaciones de la proteína de fusión	Cebadores utilizados	$K_i$ (nM)
Dominio I de $\alpha 2$		0,28
Dominio I de $\alpha 2$ E195W	halphalE195W F (SEQ ID NO: 159)	12,8
	halphalE195W R (SEQ ID NO: 160)	
Dominio I de $\alpha 2$ R165D	halphalR165D F (SEQ ID NO: 155)	1987
	halphalR165D R (SEQ ID NO: 156)	
Dominio I de $\alpha 2$ N166D	halphalN166G F (SEQ ID NO: 157)	ND
	halphalN166G R (SEQ ID NO: 158)	
Dominio I de $\alpha 2$ Y93F	HalphalY93F F (SEQ ID NO: 145)	ND
	halphalY93F R (SEQ ID NO: 146)	
Dominio I de $\alpha 2$ K40D	halphalK40D F (SEQ ID NO: 161)	ND
	halphalK40D R (SEQ ID NO: 162)	
Dominio I de $\alpha 2$ N73D	halphalN73D F (SEQ ID NO: 165)	2,17
	halphalN73D R (SEQ ID NO: 166)	
Dominio I de $\alpha 2$ Q89H	halphalQ89H F (SEQ ID NO: 167)	4,46
	halphalQ89H R (SEQ ID NO: 168)	
<b>Mutaciones de <math>\alpha 2</math>I murina</b>		
Dominio I de $\alpha 2$ H93Y	malphalH93Y F (SEQ ID NO: 169)	20,2
	malphalH93Y R (SEQ ID NO: 170)	

5 La comparación de las estructuras cristalinas para el dominio I de  $\alpha 2$  humana en la conformación cerrada (entrada 1AOX de PDB de NCBI) y abierta, unida al ligando (entrada 1 DZI de PDB) revela que Y93 se encuentra en una cara del dominio I que está detrás de la hélice  $\alpha 7$ , que se mostró que experimentaba un gran movimiento hacia abajo tras la unión del ligando (Emsley et al., J. Biol. Chem. 272:28512 (1997) y Cell 100:47 (2000)). Aunque no se identificó previamente como un cambio conformacional asociado con la unión del ligando, el examen de las estructuras cristalinas indica que en la conformación cerrada, el anillo aromático de Y93 se extiende hacia fuera de la superficie de la proteína, pero se voltea hacia los lados y hacia abajo para alinearse a lo largo de la cara del dominio I en la conformación unida al ligando, abierta. Para investigar si la unión de TMC-2206 a la integrina  $\alpha 2\beta 1$  depende de un estado conformacional dado, se introdujeron mutaciones en el dominio I para favorecer una conformación abierta del dominio I. Se ha informado de que la mutación E195W (E318 en la integrina  $\alpha 2$  intacta) bloquea el dominio I de  $\alpha 2$  humana en la conformación abierta (Aquilina et al., Eur. J. Biochem. 269(4): 1136-1144 (2002)) por lo que su uso permite hacer una distinción en cuanto a si un anticuerpo reconoce una conformación dependiente de la activación o no. Además, los estudios cristalográficos han demostrado que E195 forma un puente salino enterrado con el residuo R165 situado en el bucle  $\alpha C$ , que sirve para sujetar el bucle  $\alpha C$  en una conformación que protege el sitio de unión del ligando (Emsley et al., Cell 100:47 (2000)). El bucle  $\alpha C$  adopta una conformación extendida en la posición abierta y se ha postulado que tanto el residuo R165 como el R166 adyacente contribuyen a la unión a colágeno (Emsley et al., J Biol Chem. 272:28512 (1997) y Cell 100:47 (2000); Kåpylä et al., J Biol Chem

10

15

275:3348 (2000)). Por lo tanto, se construyeron cuatro mutaciones, la E195W; una mutación R165D para invertir la carga y, por tanto interrumpir el puente salino que se forma con E195W en la conformación cerrada, y una mutación N166D, de nuevo para invertir la carga dentro de la hélice  $\alpha$ C. El cambio E195W causó una disminución de 45 veces en los valores de  $K_i$  como se muestra en la Tabla 31 que indica que el anticuerpo TMC-2206 exhibe una mayor afinidad por la conformación cerrada. Tanto el cambio R165D como N166D abolieron la capacidad del dominio I de unirse al epítipo de TMC-2206 incluso a concentraciones tan altas como 1  $\mu$ M, sugiriendo de nuevo que el anticuerpo TMC-2206 reconoce una conformación cerrada.

A partir de los estudios de mutagénesis y de conformación, parece que el Y93 en la conformación cerrada puede desempeñar un papel en la unión de TMC-2206, y puede proporcionar un factor determinante para la especificidad de unión de la especie. Los resultados inesperados obtenidos con el dominio I de cynomolgus polimórfico indicaron que el residuo K40 también puede jugar un papel en la interacción antígeno - TMC-2206. El modelado por ordenador del anticuerpo TMC-2206 indicó que las CDR forman un sitio de unión relativamente plano, lo que sugiere que el anticuerpo hace varios contactos con el antígeno. Puesto que varios residuos dentro de las CDR están cargados, se identificaron los residuos cargados que rodean el Y93 en la posición cerrada que también muestran marcados cambios de posición en la conformación abierta a partir de las estructuras de PDB de los dos conformeros abiertos y cerrados como K40, R69, N73 y Q89. Las cargas de tres de estos residuos se invirtieron mediante la generación de los siguientes mutantes, K40D, R69D, y N73D y se modificaron en el cuarto mediante la generación de una variante Q89H, como se muestra en la Tabla 31. Además, se elaboró una tercera variante del residuo 93, un cambio de tirosina a fenilalanina, para determinar si el carácter aromático de la tirosina era la característica estructural importante, o si la actividad era dependiente del carácter hidroxílico aromático que es característico de tirosina. En el caso de este conjunto de mutaciones, todas fueron sometidas a purificación por HPLC para enriquecer la fracción monomérica de las preparaciones de proteína obtenidas fuera de la columna de afinidad de glutationa-Sefarosa. Cada variante se sometió a ensayo primero para determinar la funcionalidad mediante la evaluación la unión al colágeno. Todas, excepto la variante R69D se unieron al colágeno con un valor de  $CE_{50}$  parecido al del dominio I de  $\alpha$ 2 humana wt. En consecuencia, la R69D no se estudió más. De los mutantes restantes, la introducción de la variante K40D abolió la capacidad para competir por la unión al epítipo de TMC-2206. Esto fue coherente con los resultados obtenidos con el dominio I de cynomolgus clonado que muestra polimorfismo en este residuo (cambio de lisina a ácido aspártico). Del mismo modo, la mutación Y93F también abolió la capacidad de competir por la unión de EU-TMC-2206. N73D y Q89H mostraron una disminución de 7,8 y 15,9 veces en los valores de  $K_i$  respectivamente (Tabla 30). Tomados en conjunto los datos de mutación indican que los residuos K40, Y93, R165 y N166 pueden ser factores determinantes para la unión de TMC-2206 a su epítipo, y que N73 y Q89 también contribuyen a la energía de unión.

Estos datos indican que el anticuerpo TMC-2206, sus derivados y anticuerpos de tipo TMC-2206 (p. ej. AK7) que reconocen el mismo epítipo o epítipos similares a TMC-2206, (véase p. ej., el Ejemplo 13) son antagonistas miméticos no ligandos, atípicos de interacciones  $\alpha$ 2 $\beta$ 1-colágeno. Esta conclusión está apoyada por i) su capacidad para bloquear la adherencia a colágeno mediada por la integrina  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 de una manera independiente de cationes divalentes, ii) esta inhibición no implica la interacción de un grupo ácido crítico, tal como D100 dentro de H-CDR3, con MIDAS, iii) el anticuerpo se une a una superficie del dominio I que está en una posición distal con respecto al sitio de unión al ligando directo, iv) el sitio de unión a TMN-2206 favorece la conformación cerrada del receptor y abarca los residuos de aminoácido K40, N73, Q89, Y93, R165 y N166. Por consiguiente, la unión de TMC-2206 y anticuerpos de tipo TMC-2206 (p. ej., que reconocen el mismo epítipo o epítipos similares a TMC-2206) no soportarán la señalización extracelular mediada por integrina que se produciría normalmente después de la intervención del ligando de colágeno cognado, y es este modo de unión el que puede contribuir al perfil de no sangrado de este anticuerpo y anticuerpos de tipo TMC-2206.

#### Ejemplo 13

Se realizaron estudios para comparar la unión de otros anticuerpos anti-integrina  $\alpha$ 2 con bloqueo de la función con TMC-2206. Los resultados de los estudios de mapeo descritos en el Ejemplo 12 indicaron que el anticuerpo TMC-2206 parecía unirse a una conformación cerrada del dominio I de la integrina  $\alpha$ 2 y/o no actuaba como un mimético de ligando. Estos resultados inesperados, junto con los resultados inesperados de los estudios relacionados con las plaquetas descritos en los Ejemplos 8, 9, 10 y 11, demostraron que el epítipo TMC-2206 es particularmente ventajoso y que anticuerpos similares en sus propiedades funcionales a TMC-2206 son particularmente útiles. Los métodos de escrutinio para la identificación de tales anticuerpos similares se desarrollaron como se describe en el presente documento, y los anticuerpos fueron identificados mediante tales métodos.

Para determinar qué anticuerpos anti-integrina  $\alpha$ 2 con bloqueo de la función se unían de una manera similar a TMC-2206, se realizaron una serie de estudios de competición cruzada. Para los estudios de anticuerpos anti-integrina  $\alpha$ 2 humana comercialmente disponibles, se inmovilizó proteína de fusión de GST-I  $\alpha$ 2 humana sobre placas de microtitulación como anteriormente. Los anticuerpos sometidos a ensayo fueron AK7 (Mazurov et al., *Thromb. Haemost.* 66(4):494-9 (1991)), P1E6 (Wayner et al., *J. Cell Biol.* 107(5):1881-1891 (1988)), 10G11 (Giltay et al., *Blood* 73(5):1235-1241 (1989)) y A2-11E10 (Bergelson et al., *Cell Adhes. Commun.* 2(5):455-64 (1994)) disponible comercialmente de Chemicon, (Temecula, CA; números de catálogo, CBL477 (AK7); MAB1950 (P1E6); MAB1988 (10G11) y Upstate, (Waltham, MA; A2-11E10, número de catálogo 05-227), respectivamente. Los anticuerpos se

sometieron a ensayo junto con el mismo lote de placas de microtitulación recubiertas con  $\alpha 2\beta 1$  de plaquetas utilizadas en los estudios de mapeo epitópico para determinar su capacidad para suscitar antagonismo sobre la unión de TMC-2206 marcado con Eu. En otra serie de estudios, se determinó la capacidad de los anticuerpos para suscitar antagonismo sobre la unión de plaquetas en reposo recién aisladas a colágeno de Tipo I. Por lo tanto, la capacidad de los diferentes anticuerpos dirigidos contra la integrina  $\alpha 2$  humana para suscitar antagonismo sobre la unión del anticuerpo marcado con Eu TMC-2206 a placas de microtitulación recubiertas con  $\alpha 2\beta 1$  de plaquetas se midió en forma de valores de  $K_i$ , y para suscitar antagonismo sobre la adherencia de las plaquetas en reposo a colágeno tipo I se midió en condiciones estáticas en forma de valores de  $CE_{50}$ . Los resultados, presentados en la Tabla 32, demuestran que el anticuerpo AK7 es un competidor eficaz de TMC-2206. El clone 10G11 mostró una clara competencia bifásica de TMC-2206, lo que sugiere que no actuaba como un simple antagonista competitivo. A2-IIE10 mostró un cambio de 10 veces en comparación con TMC-2206 en el bloqueo de la adherencia de las plaquetas, pero un cambio de aproximadamente 350 veces en su capacidad para competir con TMC-2206 marcado con Eu, lo que indica de nuevo que no había una concordancia directa entre los dos anticuerpos. P1E6 no mostró ningún efecto en ninguno de los análisis, lo que indica que reconoce una conformación activa.

Tabla 32

Anticuerpo competitivo	$K_i$ (nM)	$CE_{50}$
TMC-2206	0,11	6
AK7	0,07	
10G11	Alta afinidad: 0,05	>200
	Baja afinidad: 7,7	
A2-IIE10	29,6	68
P1E6	*[Sin competición]	*[Sin efecto]
Control IgG	*[Sin competición]	*[Sin efecto]
*No detectado en las condiciones de análisis descritas.		

Estos datos demuestran por primera vez que no todos los anticuerpos de bloqueo de la función se unen a la integrina  $\alpha 2$  de la misma manera, y demuestran adicionalmente métodos para la identificación de un nuevo subgrupo de anticuerpos similares en especificidad de epítipo a TMC-2206 con actividades de bloqueo de la función similares. Estos datos también demuestran que este nuevo subgrupo de anticuerpos anti- $\alpha 2$ , que incluye TMC-2206 y anticuerpos similares en especificidad de epítipo a TMC-2206, se caracterizan por una falta inesperada de complicaciones hemorrágicas *in vivo* y/o por la falta de activación de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  de plaquetas. La especificidad de epítipo, actividades de bloqueo de la función, y ventajas (p. ej., no activación de plaquetas) no son características de todos los anticuerpos de bloqueo de la función anti- $\alpha 2\beta 1$  humana, sino más bien la característica novedosa de un nuevo subgrupo de anticuerpos que incluyen TMC-2206 y anticuerpos similares, incluyendo derivados y/o variantes de TMC-2206 que pueden ser identificados y/o seleccionados como se describe en la presente memoria.

Habiendo mostrado que no todos los anticuerpos con bloqueo de la función que se unen al dominio  $\alpha 2$  I se unen al mismo o similar (p. ej., solapamiento) epítipo TMC-2206, se realizaron estudios para determinar si el anticuerpo sustituto utilizado para los estudios de eficacia en múrdos tenía propiedades similares a TMC-2206. Puesto que el anticuerpo Ha1/29 reacciona de forma cruzada con la integrina  $\alpha 2$  de rata y ratón, y el anticuerpo TMC-2206 se une tanto a la integrina  $\alpha 2$  humana como de rata, se utilizó la proteína de fusión GST de rata para determinar si los dos anticuerpos se unían a los sitios de solapamiento (p. ej., compartían especificidad de epítipo). Para esto, la proteína de fusión GST -dominio I de  $\alpha 2$  de rata se inmovilizó sobre placas de microtitulación recubiertas con glutatión Reacti-Bind (Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL). Primero se determinó la  $K_d$  de la unión de Eu-TMC-2206 a GST-dominio I de  $\alpha 2$  inmovilizada de ser humano y de rata a 37°C como se describe en el Ejemplo 2. El análisis de Scatchard de la unión frente a Eu-TMC-2206 libre indicó que valores de  $K_d$  eran de 0,2 nM para el dominio  $\alpha 2$  I humano y 1,3 nM (una disminución de 6 veces) para el dominio  $\alpha 2$  I de rata. A continuación, se evaluó la capacidad de TMC-2206 marcado con Eu para unirse al dominio  $\alpha 2$  I de rata en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpo competidor como se describe en el Ejemplo 2 utilizando el valor de  $K_d$  de 1,3 nM para obtener el valor de  $K_i$  a partir de los valores de  $CE_{50}$  observados. El anticuerpo Ha1/29 (Mendrick y Kelly, Lab Invest. 69(6):690-702 (1993)), pero no el HMa2 (Miyake et al., Eur J. Immunol. 24:2000-2005 (1994)) fue un antagonista eficaz de la unión de Eu-TMC-2206, lo que indica que el anticuerpo Ha1/29 se unía a sitios similares (p. ej., solapamiento) al sitio de unión de TMC-2206.

Ejemplo 14

Se realizó otro estudio sobre anticuerpos IgG4 ilustrativos que tenían una cadena pesada hVH14.0 y4 (SEQ ID NO: 174) o una cadena pesada hVH12.0 y4 (SEQ ID NO: 176) y una cadena ligera HVL 10.0Q (SEQ ID NO: 178). Este estudio evaluó si la unión de estos anticuerpos IgG4 conduce a la activación de las plaquetas, medida por los efectos sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno. Se recogieron muestras de sangre a través de venopunción de la vena antecubital en tubos de llenado de vacío que contenían 3,8% de citrato de sodio después de descartar los primeros 3,0 ml de sangre de flujo libre. Todos los anticuerpos se diluyeron en solución salina a concentraciones finales de 140 mg/ml. Cada cubeta desechable (que contenía un conjunto de electrodos desechable) se dividió en alícuotas con sangre completa con 0,5 ml de citrato añadido y con 0,5 ml de solución salina o una disolución de anticuerpo. Cada cubeta se pre-calentó a 37°C durante 5 minutos en el pocillo de calentamiento del agregómetro (Modelo 591A, Chrono-Log, Havertown, PA), después se colocó en el pocillo de reacción, se añadió el conjunto de referencia, y a continuación, o 20 µl de solución salina o colágeno (1 mg/ml; tipo I equino, Chrono-Log)) para iniciar la reacción de agregación. Durante la agregación se formó una acumulación de plaquetas en las superficies expuestas de los electrodos, lo que dio como resultado un aumento de la impedancia. La adquisición de datos prosiguió durante 6 minutos con el cambio de impedancia ( $\Delta\Omega$ , Ohms) registrado con un registrador de gráficos (Modelo 707, Chrono-Log).

Los datos (Tabla 33) se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, que sometió a ensayo la hipótesis de que las medianas de población de cada uno (solución salina o colágeno) de los cuatro grupos eran equivalentes, y rechazarían esta hipótesis (95% de confianza) si los valores P eran de menos de o iguales a 0,05. Para el grupo de solución salina (valor P = 0,148) ni el control de isotipo ni los dos anticuerpos humanizados indujeron la agregación de plaquetas humanas en comparación con el control negativo de solución salina. Para el grupo de colágeno (valor P = 0,201), ni el control de isotipo ni los dos anticuerpos humanizados inhibieron la agregación inducida por colágeno en comparación con el control negativo de solución salina. Los resultados de este estudio y los del Ejemplo 8 muestran que la unión de TMC-2206 y de las dos variantes de anticuerpos IgG4 humanizados no tiene ningún efecto sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno cuando se somete a ensayo *in vitro* en todas las concentraciones sometidas a ensayo.

Tabla 33

Agonista	Artículo de ensayo				Valor P
	Solución Salina	hIgG4/k	hIgG4/k VH14.0/VL10.0Q	hIgG4/k VH12.0/VL10.0Q	
Solución Salina	1,0, 2,4, 2,8, 2,8, 2,8, 3,8	2,4, 5,2, 5,6, 5,6	2,2, 3,0, 3,4, 4,2	2,8, 3,6, 3,8, 5,2	0,148
Colágeno	17,8, 18,2, 19,4, 20,4, 21,1, 21,6	15,3, 17,2, 18,4	15,0, 15,2, 16,0, 21,8	13,2, 14,8, 18,1, 20,0	0,201

Ejemplo 15

Se sometió a ensayo TMC-2206 humanizado (hIgG4/kVH12.0/VL10.0Q) para determinar su capacidad para bloquear la unión en la adherencia celular mediada por integrina  $\alpha 2\beta 1$  a colágeno de tipo I utilizando células CHO- $\alpha 2$ , células HT1080 (fibrosarcoma humano), y plaquetas humanas siguiendo los procedimientos descritos en el Ejemplo 2. TMC-2206 humanizado era un potente inhibidor de la unión celular a colágeno con valores de CE<sub>50</sub> comparables a TMC-2206 (Tabla 34).

Tabla 34

Fuente de Colágeno de Tipo I	Células	TMC-2206 CE <sub>50</sub> (nm) (Media ± ETM)	TMC-2206 Humanizado EC <sub>50</sub> (nm) (media ± ETM)
Cola De Rata	Plaquetas humanas	3,1 ± 0,3	4,7 ± 0,3
	HT1080	0,90 ± 0,02	0,90 ± 0,27
	CHO- $\alpha 2$	0,58 ± 0,51	1,9 ± 1,5
Placenta Humana	Plaquetas humanas (n = 1)	8,44	13,1

Ejemplo 16

Se evaluó TMC-2206 humanizado por su capacidad para unirse a  $\alpha 1\beta 1$  humana inmovilizada en un formato ELISA. La integrina  $\alpha 1\beta 1$  humana (Chemicon International) se diluyó en Tampón de Recubrimiento (Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM) a una concentración final de 0,5 µg/ml. Se recubrieron inmunoplaacas de 96 pocillos con  $\alpha 1\beta 1$  a 50 ng/pocillo y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con tampón de

lavado (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Tween-20 al 0,5%) y se bloquearon con leche desnatada al 5% p/v en Tampón de Lavado durante una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos TMC-2206 humanizado, IgG4/k humano (control de isotipo), anti- $\alpha$ 1 humana de ratón (FB-12, Chemicon International) se diluyeron seriadamente en Tampón de Unión (0,1 mg/ml de BSA, libre de IgG, en tampón de lavado). Se añadieron cincuenta microlitros/pocillo de las disoluciones diluidas de anticuerpos a las placas recubiertas de  $\alpha$ 1 $\beta$ 1, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, y a continuación se lavaron tres veces. Se añadió anti-IgG humana de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (anticuerpo secundario; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) a los pocillos que contenía el control de isotipo y TMC-2206 humanizado; se añadió anti-IgG de ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) a los pocillos que contenían FB-12. Después de una incubación de una hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron tres veces, se incubaron en disolución de sustrato (1 mg/ml de fosfato de 4-nitrofenilo, dietanolamina 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 9,8) durante 20 minutos, y se terminó con NaOH. La absorbancia (405 nm) se leyó utilizando un lector de placas Spectramax Plus utilizando el soporte lógico Softmax Pro. Similar a TMC-2206, TMC-2206 humanizado y los anticuerpos IgG4/ $\beta$  no se unían a  $\alpha$ 1 $\beta$ 1. El anticuerpo de control anti- $\alpha$ 1 $\beta$ 1 (FB-12) se unió a  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 con una CE<sub>50</sub> de 0,79  $\pm$  0,15 nM.

#### 15 Ejemplo 17

Los valores de K<sub>D</sub> y K<sub>i</sub> para unión de los Mab TMC-2206 y TMC-2206 humanizado a  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 inmovilizada se determinaron utilizando el análisis de unión competitiva. Los pocillos en una placa de microtitulación de 96 pocillos se recubrieron con integrina  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 de plaquetas (recubiertos a la medida con  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 de plaquetas humanas por GTI Inc., WI) y a continuación se bloquearon con leche desnatada. El anticuerpo TMC-2206 humanizado se marcó con reactivo Eu-N1-ITC, aproximadamente 2 mg se suspendieron en y se dializaron contra tampón fosfato salino (PBS; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM; pH 7,4, NaCl 138 mM y KCl 2,67 mM). Después de la concentración en concentradores Microsep prelavados [corte a 30 kDa; Pall Life Sciences a 9500 rpm (7000 xg) en un rotor JA-20 (Beckman Instruments, Inc.) durante 20 minutos a 4°C], el anticuerpo se ajustó a 4,0 mg/ml con PBS, NaHCO<sub>3</sub> 100 mM, pH 9,3. La mezcla de Mab/bicarbonato (0,250 ml) se mezcló suavemente en un vial que contenía 0,2 mg de ácido N<sup>1</sup>-(p-isotiocianatobencil)-dietilentriamino-N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>,N<sup>3</sup>,N<sup>3</sup>-tetraacético quelatado con Eu<sup>3+</sup> (Eu-N1-ITC; Perkin Elmer Life Sciences) y se incubó durante la noche a 4°C sin agitación. La mezcla de anticuerpo marcado se aplicó a una columna PD-10 (GE Biosciences, Piscataway, NJ) pre-equilibrada con Tampón de Migración (Tris 50 mM, pH 7,4 y NaCl 138 mM). Las fracciones (0,5 ml) se recogieron y se analizaron para determinar la proteína total (reactivo de Bradford; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) usando un lector de placa de absorbancia SpectraMax 384 y para el europio después de dilución 1:10.000 en DELFIA Enhancement Solution (Perkin-Elmer) mediante fluorescencia resuelta en el tiempo (TRF) usando un lector de placas multi-marca Victor2 (Perkin Elmer). Las fracciones que fueron positivas tanto para la marca de la proteína y europio se reunieron, se aplicaron a una nueva columna PD-10, y las muestras recogieron y se analizaron para determinar la proteína total y el contenido de europio por TRF calibrado frente a una disolución patrón de europio (Perkin-Elmer) para calcular la razón de fluor:proteína. A continuación, se aplicó el Eu-TMC-2206 humanizado a las placas de microtitulación de integrina  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 bloqueadas en un volumen de 10  $\mu$ l/pocillo. Después de incubar las placas selladas durante 1 hora a 37°C para permitir la unión para alcanzar el equilibrio, se transfirieron muestras de 2  $\mu$ l desde cada pocillo a un nuevo pocillo que contenía DELFIA Enhancement Solution (100  $\mu$ l/pocillo) para la medición de la marca libre (no unida). Se añadió Disolución Intensificadora (100  $\mu$ l/pocillo) a los pocillos vacíos para la medición de marcador unido. La placa se agitó (Titer Shaker Plate, ajuste de velocidad de 5, 5 minutos a temperatura ambiente) y las intensidades de TRF se leyeron utilizando el lector de placas multi-marca Victor2. Los valores de K<sub>D</sub> se calcularon mediante los análisis de Scatchard.

Las potencias de unión relativa a integrina  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 inmovilizada se analizaron mediante la medición de los valores de K<sub>i</sub> en un análisis de competición utilizando Eu-TMC-2206 humanizado 100 pM en presencia de concentraciones variables de anticuerpo TMC-2206 no marcado o TMC-2206 humanizado como competidores, utilizando un sistema de análisis similar al descrito anteriormente en este ejemplo. A continuación se aplicaron combinaciones de anticuerpos de ensayo a los pocillos recubiertos con integrina  $\alpha$ 2 $\beta$ 1, se sometieron a ensayo a lo largo de un intervalo de concentración de 10<sup>-11</sup> a 10<sup>-7</sup> M, y tras el tiempo especificado, se determinó la cantidad de Eu-TMC-2206 humanizado unido. Las curvas de inhibición se ajustaron con el modelo de "competición por un sitio" utilizando el soporte lógico Prism (GraphPad, Inc.) para obtener los valores de CI<sub>50</sub> y para calcular la K<sub>i</sub> utilizando la ecuación de Cheng y Prusoff (1973) y los respectivos valores para K<sub>D</sub> anteriores.

Los valores de K<sub>D</sub> y K<sub>i</sub> para TMC-2206 y TMC-2206 humanizado casi fueron un múltiplo de 2 (Tabla 35). Por lo tanto las afinidades de unión de TMC-2206 y TMC-2206 humanizado a  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 inmovilizada fueron similares.

Tabla 35

Parametro de afinidad	TMC-2206	TMC-2206 Humanizado
K <sub>D</sub>	0,72 $\pm$ 0,18 nm	1,29 $\pm$ 0,17 nm
K <sub>i</sub>	0,21 $\pm$ 0,08 nm	0,41 $\pm$ 0,06 nm

TMC-2206 y TMC-2206 humanizado se sometieron a análisis de resonancia de plasmón superficial (RPS) para determinar las constantes de disociación y de asociación cinética,  $k_d$  y  $k_a$  (también conocidas como  $k_{off}$  y  $k_{on}$ ), respectivamente, para el dominio  $\alpha 2$  I. La RPS, un método para la caracterización de las interacciones macromoleculares, es una técnica óptica que utiliza el fenómeno de onda transitoria para medir exquisitamente cambios mínimos en el índice de refracción muy cerca de una superficie del sensor. La unión entre un antígeno en disolución (p. ej., proteína de fusión) y su MAb receptor (inmovilizado en la superficie de un chip sensor) da como resultado un cambio en el índice de refracción. La interacción se verifica en tiempo real y la cantidad de antígeno unido y las constantes de velocidad de asociación y disociación se pueden medir con alta precisión. La constante de equilibrio de disociación se puede calcular fácilmente a partir de:  $K_D = k_d/k_a = k_{off}/k_{on}$ . La clonación del dominio  $\alpha 2$  I humano y la purificación de la proteína de fusión de GST-dominio I de  $\alpha 2$  humana expresada se describió en el Ejemplo 12. Los análisis se realizaron a 20°C utilizando un sensor óptico Biacore 2000 con un chip sensor CM5 (Life Sciences Biacore, Uppsala, Suecia) de calidad investigación y se equilibró con tampón (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,25 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,25 mM, Tween-20 al 0,5%, 0,1 mg/ml de BSA, pH 7,4). Para la captura de TMC-2206 en el chip sensor, dos de las superficies celulares de flujo del chip se recubrieron con IgG anti-ratón; las otras dos células de flujo se recubrieron con proteína A para la captura de TMC-2206 humanizado. Cada ciclo de unión del antígeno (proteína de fusión de GST/dominio I de  $\alpha 2$  humana) a las IgG anti-ratón conectadas a la superficie implicó tres etapas. En la primera etapa, TMC-2206 fue capturado en una superficie anti-ratón y a continuación TMC-2206 humanizado fue capturado en una superficie de Proteína A. [Las otras dos superficies (una anti-ratón y una Proteína A) sirvieron como referencias analíticas]. En el segundo paso, la proteína de fusión de GST-dominio I de  $\alpha 2$  humana se inyectó a través de las cuatro superficies. Las respuestas obtenidas a partir de las superficies de referencia (debido a desajustes del índice de refracción entre el antígeno y el tampón migración) se restaron de las respuestas obtenidas de las superficies de reacción. En la tercera etapa, los complejos antígeno/anticuerpo fueron desprendidos de las superficies de tal manera que las superficies podrían utilizarse para otro ciclo de unión. La concentración de proteína de fusión de GST-dominio I de  $\alpha 2$  humana más alta fue de 41 nM. La disolución de antígeno se hizo fluir sobre las superficies durante 2 minutos a 50  $\mu$ l/min y la disociación del antígeno de la superficie se controló durante seis minutos. Se determinaron las constantes de velocidad para la unión de proteína de fusión de GST-dominio I de  $\alpha 2$  humana a TMC-2206 y TMC-2206 humanizado y se encontró que eran similares (Tabla 37)

Los ensayos de unión competitiva y los análisis de RPS confirman ambos que el proceso de humanización no afectó a la afinidad de unión de TMC-2206 humanizado al dominio I de  $\alpha 2$  humana.

### 30 Ejemplo 18

Se evaluó la reactividad cruzada entre especies con TMC-2206 humanizado mediante técnicas analíticas bioquímicas. En el primer estudio, se determinaron las afinidades de unión (valores de  $K_i$ ) de TMC-2206, TMC-2206 humanizado, y las proteínas de fusión de GST- dominio I de  $\alpha 2$  derivadas de diferentes especies (valores de  $K_i$ ) mediante unión competitiva con TMC-2206 humanizado marcado con europio a placas recubiertas con  $\alpha 2\beta 1$  (Ejemplo 17). La clonación de dominios I de  $\alpha 2$  de ser humano, macaco rhesus, rata, y ratón se describen en el Ejemplo 12. Se clonaron los dominios I de  $\alpha 2$  de Cynomolgus y mono rhesus adicional a partir de ADNc derivado de ARN total extraído de tejido cutáneo (MediCorp, Inc., Montreal, QC). Hubo una disminución de 9 veces en  $K_i$  para la unión de I de  $\alpha 2$  de rata a TMC-2206 humanizado en comparación con el dominio I de  $\alpha 2$  humana, mientras que la proteína de fusión GST-I de  $\alpha 2$  murina mostró solo una ligera unión específica a la mayor concentración (4 M; Tabla 36). [Ni el control negativo de la proteína de fusión de GST ni el control negativo de isotipo IgG4/k mostraron ningún efecto de unión competitiva a concentraciones 0,4 M]. Las proteínas de fusión de I de  $\alpha 2$ -GST de rhesus, cynomolgus, y humanas mostraron una unión comparable. Por lo tanto, las cuatro especies demostraron reactividad cruzada con TMC-2206 humanizado.

Tabla 36

Competidor	$K_i$ (nM)
TMC-2206	0,14 $\pm$ 0,01
TMC-2206 Humanizado	0,34 $\pm$ 0,00
proteína de fusión de GST-dominio I de $\alpha 2$ humana	0,57 $\pm$ 0,06
proteína de fusión de GST-dominio I de $\alpha 2$ de cynomolgous	0,47 $\pm$ 0,00
proteína de fusión de GST-dominio I de $\alpha 2$ de rhesus	0,40 $\pm$ 0,02
proteína de fusión de GST-dominio I de $\alpha 2$ de rata	5,23 $\pm$ 0,14
proteína de fusión de GST-dominio I de $\alpha 2$ de ratón	No detectada a 4,0 $\mu$ M

Competidor	K <sub>i</sub> (nM)
proteína de fusión de GST (control negativo)	No detectada a 0,4 μM
IgG4/k Humana (control de isotipo negativo)	No detectada a 0,4 μM

En un segundo estudio, se evaluaron las constantes de velocidad y de equilibrio de unión de TMC-2206 y TMC-2206 humanizado, y proteínas de fusión de I de α2-GST seleccionadas mediante análisis de RPS (Tabla 37). Todas las constantes cinéticas y de equilibrio derivadas de TMC-2206 parental y humanizado para los dominios I de α2 humanos y ratas fueron similares. Además, las constantes de velocidad de TMC-2206 humanizado para los dominios I de α2 humanos y de cynomolgus fueron similares. TMC-2206 humanizado no se unió al dominio I de α2 de ratón a concentraciones 4,0 M de la proteína de fusión de I de α2 de ratón-GST. La unión comparable de la proteína de fusión de GST-dominio I de α2 de cynomolgus a TMC-2206 humanizado no era coherente con el resultado en el Ejemplo 12 - donde no se observó unión competitiva a concentraciones de hasta 1 μM (Tabla 29). Sin embargo, los análisis de la secuencia de ADN realizados sobre poblaciones de ADNc derivados de ARNm extraído de monos (Medicorp Inc.) reveló un polimorfismo en un solo aminoácido (posición 40) en comparación con el dominio I de α2 humana. Este polimorfismo no se conservó a través de los animales, ya que un cynomolgus y un mono rhesus mostraron un heteromorfismo mientras que los otros animales mostraron una homología de 100% para el dominio I de α2 humana. La GST-dominio I de α2 de cynomolgus estudiada en este ejemplo mediante la unión competitiva y análisis de RPS codificó la secuencia idéntica a la de dominio I de α2 humana. Estos estudios bioquímicos demostraron que TMC-2206 humanizado presentaba reacción cruzada con los dominios I de α2 derivados de ser humano, rhesus, cynomolgus, y rata, pero no con el dominio I de α2 de ratón. Se realizaron estudios celulares *in vitro* de reactividad cruzada (Ejemplo 20) para verificar que TMC-2206 humanizado presentaba reacción cruzada con las diferentes especies de células de la sangre.

Tabla 37

MAb	GST-Dominio I de α2	k <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (=k <sub>d</sub> /k <sub>a</sub> ;nM)
TMC-2206	Humano	(11,0 ± 0,5) × 10 <sup>-4</sup>	(3,8 ± 0,1) × 10 <sup>5</sup>	2,9 ± 0,1
	Rata	(8,2 ± 0,1) × 10 <sup>-4</sup>	(4,2 ± 0,1) × 10 <sup>5</sup>	2,0 ± 0,1
TMC-2206 humanizado	Humano	(8,2 ± 0,3) × 10 <sup>-4</sup>	(3,5 ± 0,0) × 10 <sup>5</sup>	2,3 ± 0,1
	Rata	(5,7 ± 0,4) × 10 <sup>-4</sup>	(3,3 ± 0,3) × 10 <sup>5</sup>	1,7 ± 0,1
	Humano	(2,4 ± 0,9) × 10 <sup>-4</sup>	(5,8 ± 0,6) × 10 <sup>5</sup>	4,0 ± 0,1
	Cynomolgus	(3,0 ± 0,1) × 10 <sup>-4</sup>	(5,0 ± 0,1) × 10 <sup>5</sup>	5,0 ± 0,1
	Ratón	No detectada a 4,0 μM	No detectada a 4,0 μM	No detectada a 4,0 μM

Se evaluó adicionalmente la reactividad cruzada entre especies mediante la unión de TMC-2206 humanizado a células de la sangre de diferentes especies mediante citometría de flujo. En el primer estudio, se evaluó la reactividad cruzada de TMC-2206 humanizado con plaquetas de diferentes especies. La sangre se obtuvo a través de veni-puntura de donantes humanos, ratas y monos rhesus/cynomolgus. La sangre humana se recogió en citrato de sodio al 3,8%; la sangre de rhesus y cynomolgus se recogió en EDTA 10 mM; y la sangre de las ratas se recogió en heparina. La sangre completa de los primates (humanos, rhesus, cynomolgus) se incubó con TMC-2206 humanizado a una concentración final de 140 μg/ml durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de una incubación de 10 minutos con el MAb de ratón anti-IgG4 humana conjugado con FITC (Clon HP6023; Southern Biotech), seguido de una incubación con anticuerpos marcadores de plaquetas específicos de especie conjugados con moléculas fluorescentes. Las plaquetas humanas se identificaron con anti-CD42b humano de ratón conjugado con PE (BD Biosciences) y las plaquetas de rhesus/cynomolgus se identificaron con anti-CD41a humano de ratón conjugado con PE (BD Biosciences). La sangre completa de rata se incubó con 500 μg/ml de TMC-2206 humanizado conjugado con Alexa-488 (kit Alexa Fluor 488 Protein Labeling, A10235, Molecular Probes) durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de incubación con el anti-CD61 de ratón de hámster conjugado con PE (marcador de plaquetas de rata; BD Biosciences). Todas las muestras se lavaron una vez, se suspendieron en

solución salina tamponada con fosfato, y a continuación se sometieron a análisis de citometría de flujo. [Los portales de dispersión frontal y de dispersión lateral se ajustaron a escalas logarítmicas para discriminar adicionalmente las plaquetas de los glóbulos rojos y leucocitos más grandes]. El TMC-2206 humanizado se unió a las plaquetas de las cuatro especies (Tabla 38).

5 En el segundo estudio, se evaluó la reactividad cruzada de TMC-2206 humanizado con diferentes especies de leucocitos. Se obtuvo sangre de las mismos cuatro especies, excepto que la sangre humana se recogió en EDTA 10 mM. Se añadió TMC-2206 humanizado conjugado con Alexa 488 a la sangre completa (concentraciones finales de 225-400 µg/ml) durante 10 minutos, seguido de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos marcadores. Los anticuerpos anti-CD45 se utilizaron para teñir todos los leucocitos [para los leucocitos humanos anticuerpo de ratón anti-humano conjugado con PE-Cy5 (clon H130, BD Biosciences); para los leucocitos de rhesus y cynomolgus anticuerpo de ratón anti-humano conjugado con PE-Cy5 (clon Tü116, BD Biosciences); y para los leucocitos de rata anticuerpo de ratón anti-rata conjugado con PE-Cy5 (BD Biosciences)]. Se utilizaron anticuerpos marcadores para teñir plaquetas: para las plaquetas humanas anticuerpo de ratón anti-humano conjugado con PE-Cy5-CD42b (BD Biosciences); para las plaquetas de rhesus y cynomolgus anticuerpo de ratón anti-humano conjugado con R-PE-CD41a (BD Biosciences); y para las plaquetas de rata anticuerpo de hámster anti-ratón conjugado con R-PE-CD61 (BD Biosciences). Se añadió 1 ml de agua a la mezcla de reacción (aproximadamente 250 µl), se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para lisar los glóbulos rojos, seguido de la adición de 2 ml de PBS (para llevar tonicidad a niveles que impidan la lisis de leucocitos), y se centrifugó. El sedimento celular se resuspendió en 0,5 ml de PBS y se sometió a análisis de citometría de flujo. [El canal de dispersión lateral se ajustó a escala lineal y el canal de CD45 se ajustó a escala log para discriminar granulocitos, monocitos y linfocitos.] Puesto que los diversos niveles de la activación plaquetaria endógena dará lugar a la formación de micro-agregados de plaquetas-leucocitos, fue fundamental identificar los leucocitos que no se unían a las plaquetas (que expresan constitutivamente la integrina  $\alpha 2\beta 1$ ). Por lo tanto solo se evaluaron aquellas células que fueron  $CD45^+/CD41a^-$ ,  $CD45^+/D42b^-$ , o  $CD45^+/CD61^-$  para la unión a TMC-2206 humanizado. El TMC-2206 humanizado se unió a los linfocitos, monocitos y granulocitos de las cuatro especies (Tabla 38).

Estos resultados son coherentes con los resultados del Ejemplo 19 en el que TMC-2206 humanizado reacciona de forma cruzada con las proteínas de fusión de GST-dominio I de  $\alpha 2$  de ser humano, rhesus, cynomolgus, y rata (mediante  $K_i$  y análisis de RPS). Había porcentajes relativamente bajos de células de la sangre de rata que se unían a TMC-2206 humanizado en comparación con las células de la sangre de primate. En tres estudios anteriores (Ejemplos 9, 19 y 12), se demostró que las afinidades de unión de los anticuerpos TMC-2206 parental y humanizado a la subunidad  $\alpha 2$  de la integrina  $\alpha 2$  de rata, eran de un orden de magnitud menor que las afinidades de unión a la subunidad  $\alpha 2$  humana. En el primer estudio, Ejemplo 9, los valores de  $CE_{50}$  para TMC-2206 que inhiben la unión de plaquetas de rata y plaquetas humanas a colágeno tipo I de rata fueron de 6,3 nM y 1,7 nM, respectivamente. En el segundo estudio, Ejemplo 19 (Tabla 38), los valores de  $K_i$  para la inhibición de la unión de TMC-2206 humanizado a  $\alpha 2\beta 1$  inmovilizada por los competidores GST-dominio I de  $\alpha 2$  humana y proteínas de fusión de GST-dominio I de  $\alpha 2$  de rata fueron de 0,57 nM y 5,23 nM, respectivamente. Del mismo modo, en el tercer estudio, Ejemplo 12 (Tabla 29), los valores de  $K_i$  para la inhibición de la unión de TMC-2206 a  $\alpha 2\beta 1$  por las proteínas de fusión de GST-dominio I de  $\alpha 2$  humana y de GST-dominio I de  $\alpha 2$  de rata fueron de 0,33 nM y 3,8 nM, respectivamente. Además, en ambos estudios de plaquetas y leucocitos, todas las muestras celulares se lavaron antes de ser sometida a análisis de citometría de flujo, retirando mediante lavado más TMC-2206 humanizado de la subunidad  $\alpha 2$  de rata de menor afinidad en comparación con las subunidades  $\alpha 2$  de primate. Combinados con los resultados anteriores, esto condujo a puntuar como "positivo" un porcentaje relativamente bajo de glóbulos rojos de rata en comparación con los glóbulos rojos de primate (suponiendo densidades de los receptores de  $\alpha 2\beta 1$  similares). En resumen, las plaquetas, linfocitos, monocitos y granulocitos de las cuatro especies sometidas a ensayo (humana, mono rhesus, mono cynomolgus, y rata) se unieron todas a TMC-2206 humanizado.

Tabla 38

Especie	N	Porcentaje de Unión Celular (Media $\pm$ ETM)			
		Plaquetas	Linfocitos	Monocitos	Granulocitos
Humana	3	94,5 $\pm$ 0,9	63,7 $\pm$ 8,9	78,6 $\pm$ 9,1	75,5 $\pm$ 9,3
Rhesus	4	97,2 $\pm$ 0,0	7,2,3 $\pm$ 9,7	90,4 $\pm$ 4,9	95,3 $\pm$ 2,2
Cynomolgus	4	96,5 $\pm$ 0,3	73,5 $\pm$ 12,1	87,4 $\pm$ 7,0	95,2 $\pm$ 3,0
Rata	3	21,5 $\pm$ 2,3	38,2 $\pm$ 1,7	37,4 $\pm$ 1,6	43,2 $\pm$ 2,1

Ejemplo 20

Otro estudio evaluó si la unión de TMC-2206 humanizado a  $\alpha 2\beta 1$  condujo a la activación de las plaquetas, medida mediante citometría de flujo. La activación de las plaquetas se midió como la regulación al alza de P-selectina o la activación de la integrina GPIIb/IIIa ( $\alpha IIb\beta 3$ ). Se recogieron muestras de sangre a través de venopunción de la vena antecubital en tubos de llenado de vacío que contenían citrato de sodio al 3,8% después de descartar los primeros 3,0 ml de sangre de flujo libre. La sangre se diluyó 1:10 en TBS (pH 7,4) y esto estuvo seguido de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con solución salina, control de isotipo IgG4/k (concentración final de 132  $\mu\text{g/ml}$ ), o TMC-2206 humanizado (concentración final de 144  $\text{mg/ml}$ ). Para la activación de las plaquetas se añadió, o péptido-6 activador del receptor de trombina (TRAP-6, concentración final 10  $\text{mM}$ ; AnaSpec Inc., San Jose, CA) o difosfato de adenosina (ADP Sigma, concentración final 20  $\text{mM}$ ) a las muestras, seguido de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se sometieron a tratamiento para la citometría de flujo mediante incubación con anticuerpos marcadores: anticuerpo de ratón anti-humano conjugado con PE-Cy5-CD42b (BD Biosciences) para teñir las plaquetas; anticuerpo de ratón anti-humano conjugado con PE-CD62P (BD Biosciences) para teñir P-selectina; y PAC-1 conjugado con FITC (BD Biosciences) para teñir GPIIb/IIIa activada (PAC-1 se une a la conformación activa de la integrina GPIIb/IIIa). El error de muestreo para cada muestra fue de menos de 5% (nivel de confianza del 95%).

Los primeros experimentos evaluaron si la unión de TMC-2206 humanizado conduce a la activación de plaquetas medida por la regulación al alza de P-selectina. La activación se puntuó como el porcentaje de plaquetas (CD42b+) que fueron teñidas por el marcador de P-selectina (CD62P) (Tabla 39). Mediante análisis ANOVA (una sola vía, intervalo de confianza de 95%), la expresión de P-selectina de plaquetas incubadas con solución salina, IgG4/k, y TMC-2206 humanizado no fue estadísticamente diferente ( $P = 0,96$ ). Por lo tanto, la unión de TMC-2206 humanizado a las plaquetas no indujo la activación de las plaquetas. En experimentos realizados paralelamente, TRAP-6 indujo aumentos significativos de la expresión de P-selectina. La adición de TMC-2206 humanizado no afectó estadísticamente la expresión de P-selectina inducida por TRAP-6 en comparación con solución salina o el control de isotipo ( $P = 0,96$ ; ANOVA de una vía, intervalo de confianza de 95%). Por lo tanto la unión de TMC-2206 humanizado no inhibió la activación plaquetaria inducida TRAP-6.

Tabla 39

Expt.	Artículos de Ensayo Incubados con Sangre Completa					
	Solución Salina	IgG4/k	huTMC-2206	TRAP-6	TRAP-6 + IgG4/k	TRAP-6 + huTMC-2206
1	2,44	1,21	0,85	76,60	80,35	79,50
2	8,40	9,10	5,29	97,01	86,73	83,32
3	29,54	30,08	25,70	92,71	95,63	96,88
Media $\pm$ ETM	13,5 $\pm$ 8,2	135 $\pm$ 8,6	10,6 $\pm$ 7,7	88,8 $\pm$ 6,2	87,6 $\pm$ 4,4	86,6 $\pm$ 5,3

El siguiente estudio evaluó la regulación al alza de P-selectina después de la incubación con/sin el agonista ADP (porcentaje de plaquetas que expresan P-selectina, Tabla 40). Como antes, la expresión de P-selectina sobre plaquetas incubadas con TMC-2206 humanizado, IgG4/k, y solución salina fueron comparables, por lo tanto TMC-2206 humanizado no indujo la activación de las plaquetas. La expresión de P-selectina inducida por ADP fue comparable a la inducción con TRAP-6. Parecía haber un aumento adicional en la expresión de P-selectina con las plaquetas incubadas con ADP y a continuación con IgG4/k o TMC-2206 humanizado. Sin embargo, el aumento de la regulación al alza de P-selectina fue similar tanto para el control de isotipo como para TMC-2206 humanizado; indicando de nuevo que la unión de TMC-2206 humanizado a las plaquetas no induce la activación plaquetaria. Al mismo tiempo, la expresión de P-selectina de plaquetas inducidas con ADP incubadas con IgG4/k o TMC-2206 humanizado no disminuyó. Por lo tanto la unión de TMC-2206 humanizado no inhibía la activación plaquetaria inducida por ADP.

Tabla 40

Agonista	Artículos de Ensayo Incubados con Sangre Completa		
	Solución Salina	IgG4/k	huTMC-2206
Solución Salina	29,54	30,08	25,70
ADP	79,90	96,24	96,87

El siguiente estudio evaluó la activación de GPIIb/IIIa después de la incubación con/sin agonistas TRAP-6 o ADP puntuando el porcentaje de plaquetas que se unían al anticuerpo marcador PAC-1 (que se une a la conformación activa de GPIIb/IIIa; Tabla 41). El nivel de expresión de GPIIb/IIIa activada sobre las plaquetas incubadas con TMC-2206 humanizado, IgG4/k, y solución salina fueron comparables-TMC-2206 humanizado no indujo la activación plaquetaria. IgG4/k y TMC-2206 humanizado no inhibieron la activación inducida por TRAP-6 ni por ADP.

Tabla 41

Agonista	Artículos de Ensayo Incubados con Sangre Completa		
	Solución Salina	IgG4/k	huTMC-2206
Solución Salina	26,5	24,3	18,6
TRAP-6	79,9	93,8	88,9
ADP	69,1	93,1	86,0

En resumen, TMC-2206 humanizado no indujo la activación de plaquetas (sin aumento de la regulación al alza de P-selectina o activación de GPIIb/IIIa), ni inhibió la activación plaquetaria inducida por agonistas (TRAP-6, ADP). Este dato complementa el estudio de la agregación plaquetaria (Ejemplo 15, Tabla 34) que mostró que TMC-2206 humanizado no indujo la agregación plaquetaria ni inhibió la agregación inducida por colágeno.

## Ejemplo 21

El TMC-2206 humanizado se evaluó para determinar su efecto tanto en las rutas de coagulación tanto extrínseca como intrínseca mediante la medición de tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa). Se utilizó una preparación liofilizada calificada de plasma humano (Citrex I, Bio/Data Corporation, Horsham, PA) para la medición tanto de TP como de TTPa. Se añadió TMC-2206 humanizado al plasma para alcanzar concentraciones finales de 179, 214, y 286 µg/mL (correspondientes a la  $C_{max}$  de una sola dosis de anticuerpo a 12,5, 15,0, y 20,0 mg/kg, respectivamente) antes de someter las muestras a los ensayos de coagulación. Se siguieron procedimientos convencionales para Tp y TTPa con los tiempos de coagulación medidos mediante un fibrómetro de BBL (BD, Franklin Lakes, NJ). La Tabla 42 resume los datos para una serie de seis experimentos (3 TP y TTPa) 3. Se ejecutó un control de solución salina para cada experimento. Los análisis estadísticos de la t de Student de cada par emparejado (TMC-2206 humanizado y solución salina) demostraron para cada experimento que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de coagulación medios para TMC-2206 humanizado en comparación con solución salina. (Las hipótesis de que los tiempos de coagulación eran diferentes sería rechazada con niveles de confianza de 95% si los valores de p calculados individuales fueran menores de 0,05). Por lo tanto TMC-2206 humanizado no afectó la coagulación medido mediante TP y TTPa.

Tabla 42

Parámetro de Coagulación	TMC-2206 Humanizado		Solución Salina	Valor p
	Concentración	Tiempo de Coagulación (segundos, media ± ETM)	Tiempo de Coagulación (segundos, media ± ETM)	
Tiempo de Protrombina	179 µg/mL	10,8 ± 0,1	10,8 ± 0,1	1,00
	214 µg/mL	11,3 ± 0,1	11,1 ± 0,1	0,67
	286 µg/mL	11,5 ± 0,2	11,6 ± 0,1	0,62
Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada	179 µg/mL	25,6 ± 0,7	24,8 ± 0,6	0,43
	214 µg/mL	24,1 ± 0,3	23,5 ± 0,5	0,30
	286 µg/mL	27,9 ± 0,2	27,9 ± 0,4	1,00

## Ejemplo 22

Se evaluaron los efectos de TMC-2206 humanizado sobre los tiempos de sangrado en rata. A ratas

5 Sprague-Dawley (190 - 200 g) se les inyectaron por vía intravenosa (vena de la cola) solución salina, heparina (0,6 mg/kg, control positivo), o TMC-2206 humanizado a dosis de 5 y 15 mg/kg una hora antes de la transección normalizada de la punta (0,5 mm) de cada cola. Las ratas no se anestesiaron y estuvieron conscientes durante la medición del tiempo de sangrado. La punta de la cola cortada de cada rata se sumergió de inmediato a 2 cm de profundidad en un tubo de ensayo que contenía solución salina a 37°C. Se puntuó el tiempo requerido para el inicio de un período de 15 segundos de cese de sangrado como tiempo de sangrado. Se utilizó un tiempo máximo de corte de 20 minutos. La pérdida de sangre se puntuó mediante la cantidad de hemoglobina liberada después de la hemólisis (espectrofotométricamente) a partir de la sangre recogida en el tubo de ensayo. El TMC-2206 humanizado presentó un efecto no estadísticamente significativo sobre el tiempo de sangrado en ambas dosis sometidas a ensayo en comparación con los controles no tratados previamente y de solución salina (Tabla 43; P = 0,08, análisis ANOVA de una vía). El TMC-2206 humanizado muestra ningún efecto estadísticamente significativo sobre la pérdida de sangre en ambas dosis sometidas a ensayo en comparación con los controles no tratados previamente y de solución salina (P = 0,22, análisis ANOVA de una sola vía. Por lo tanto TMC-2206 humanizado no afecta a los tiempos de sangrado o pérdidas de sangre *in vivo*.

15 Tabla 43

	Artículos de Ensayo Inyectados intravenosamente a ratas				
	Sin tratamiento previo	Solución Salina	TMC-2206 Humanizado		Heparina
			5 mg/kg	15 mg/kg	
n	10	10	10	10	10
Tiempo de Sangrado (minutos, media ± ETM)	35 ± 0,4	4,5 ± 0,4	5,2 ± 0,6	4,3 ± 0,3	17,8 ± 1,1
Pérdida de Sangre (mg de hemoglobina, media ± ETM)	10,3 ± 3,0	17,6 ± 2,0	20,5 ± 4,1	21,2 ± 5,9	115 ± 31

#### Ejemplo 23

Se realizó un estudio para determinar el efecto de una dosis única de TMC-2206 humanizado sobre los niveles circulantes de citoquinas en ratas como un medio para determinar si TMC-2206 humanizado causaba la activación *in vivo* detectable de los leucocitos. Se administraron a ratas por vía intravenosa solución salina (control negativo), control de isotipo IgG4/k humano (15 mg/kg), TMC-2206 humanizado (15 mg/kg) o lipopolisacárido (LPS, control de inflamación positivo; 0,75 mg/kg). Se utilizaron ratas no inyectadas como controles sin tratamiento previo. A las 2, 4, 6, y 8 horas de la inyección, se recogieron muestras de sangre a través de la vena safena y se procesaron para obtener plasma. Las muestras de plasma se sometieron a inmunoanálisis múltiple basado en cuentas (MIA; Linco Diagnostics, St. Charles, MO) para determinar los niveles de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , y TNF- $\alpha$  (Tabla 44; pg/ml, media ± ETM). El MIA implica la detección simultánea de analitos (hasta 100) en el mismo volumen de muestra (25  $\mu$ l) combinando varias reacciones de unión antígeno/anticuerpo individuales en conjuntos de microesferas espectralmente distintas. Dependiendo del antígeno, la sensibilidad del MIA está entre 1,5 y 50 pg/ml. Cada conjunto de datos de citoquinas fue sometido a análisis ANOVA de dos vías, intervalo de confianza de 95%, sometiendo a ensayo la hipótesis de que los niveles de citoquinas individuales para los cuatro puntos temporales y para las cuatro condiciones (sin tratamiento previo, vehículo, IgG4/k, y TMC-2206 humanizado) eran equivalentes. Las hipótesis serían rechazadas si los valores P fueran inferiores a 0,05. No hubo diferencias estadísticamente significativas en cada uno de los diez conjuntos (todos los valores P variaron de 0,18 a 1,0, Tabla 44) de niveles de citoquinas observados en ratas a las que se había inyectado vehículo, IgG4/k, TMC-2206 humanizado, o no inyectadas (sin tratamiento previo). Por lo tanto, la inyección intravenosa de una dosis única (15 mg/kg) de TMC-2206 humanizado no indujo un aumento en la expresión de citoquinas implicadas en la inflamación.

Tabla 44

Cit.	Tiempo	Sin tratamiento previo (n = 3)	Vehículo (n = 3)	IgG4 (15mg/kg) (n = 6)	huTMC-2206 (15mg/kg) (n = 6)	LPS (0,75 mg/kg) (n = 4)	Valores P, ANOVA de 2 vías
IL-1 $\alpha$	2-hr	61 ± 30	84 ± 37	75 ± 29	133 ± 66	788 ± 550	1,00

ES 2 541 302 T3

Cit.	Tiempo	Sin tratamiento previo (n = 3)	Vehículo (n = 3)	IgG4 (15mg/kg) (n =6)	huTMC-2206 (15mg/kg) (n = 6)	LPS (0,75 mg/kg) (n = 4)	Valores P, ANOVA de 2 vías
	4-hr	69 ±38	75 ± 22	101 ± 46	150 ± 63	806 ± 641	
	6-hr	58 ± 16	90 ± 54	57 ± 26	80 ± 53	640 ± 524	
	8-hr	36 ± 5	85 ± 11	57 ± 17	101 ± 48	591 ± 372	
<b>IL-1β</b>	2-hr	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	733 ± 277	0,17
	4-hr	45 ± 15	107 ± 70	44 ± 17	30 ± 4	527 ± 109	
	6-hr	153 ± 78	76 ± 27	61 ± 27	44 ± 14	282 ± 70	
	8-hr	24 ± 0	24 ± 0	53 ± 29	24 ± 0	525 ± 324	
<b>IL-6</b>	2-hr	118 ± 35	291 ± 136	300 ± 174	309 ± 155	31386 ± 7981	1,00
	4-hr	137 ± 58	271 ± 123	329 ± 207	362 ± 163	15971 ± 4334	
	6-hr	265 ± 125	359 ± 130	416 ± 209	364 ± 174	8966 ± 4379	
	8-hr	117 ± 40	341 ± 67	219 ± 133	3351 ± 63	3682 ± 2431	
<b>IL-12</b>	2-hr	54 ± 30	237 ± 62	159 ± 67	199 ± 106	950 ± 823	1,00
	4-hr	43 ± 19	201 ± 44	173 ± 79	219 ± 119	991 ± 876	
	6-hr	43 ± 17	205 ± 93	184 ± 108	169 ± 124	941 ± 812	
	8-hr	43 ± 19	212 ± 31	132 ± 55	214 ± 102	794 ± 685	
<b>IFN-γ</b>	2-hr	31 ± 7	82 ± 58	121 ± 72	156 ± 94	959 ± 453	1,00
	4-hr	24 ± 0	67 ± 43	127 ± 77	153 ± 994	7740 ± 629	
	6-hr	24 ± 0	57 ± 33	127 ± 103	115 ± 91	3288 ± 756	
	8-hr	24 ± 0	76 ± 52	99 ± 59	156 ± 102	1773 ± 757	
<b>TRF-α</b>	2-hr	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	1571 ± 633	1,00
	4-hr	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24±0	85 ± 38	
	6-hr	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24±0	48 ± 15	
	8-hr	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	27 ± 3	
<b>IL-2</b>	2-hr	49 ± 25	31 ± 7	47 ± 17	73 ± 49	93 ± 24	0,96
	4-hr	24 ± 0	33 ± 9	52 ± 23	90 ± 62	79 ± 14	
	6-hr	24 ± 0	47 ± 23	69 ± 36	33 ± 9	52 ± 16	
	8-hr	24±0	92 ± 31	47 ± 23	86 ± 39	39 ± 15	

ES 2 541 302 T3

Cit.	Tiempo	Sin tratamiento previo (n = 3)	Vehículo (n = 3)	IgG4 (15mg/kg) (n =6)	huTMC-2206 (15mg/kg) (n = 6)	LPS (0,75 mg/kg) (n = 4)	Valores P, ANOVA de 2 vías
<b>IL-4</b>	2-hr	24 ± 0	24 ± 0	24±0	24 ± 0	46 ± 22	0,85
	4-hr	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	25 ± 1	49 ± 25	
	6-hr	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	46 ± 22	
	8-hr	24 ± 0	24±0	24 ± 0	24 ± 0	41 ± 17	
<b>IL-5</b>	2-hr	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	1,00
	4-hr	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	
	6-hr	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	
	8-hr	24 ± 0	24±0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	
<b>GM-CSF</b>	2-hr	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	1,00
	4-hr	66 ± 0	66±0	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	
	6-hr	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	
	8-hr	66 ± 0	66±0	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	

Aunque la invención ha sido descrita en la presente memoria con referencia a realizaciones concretas, se debe entender que estas realizaciones son meramente ilustrativas de diversos aspectos de la invención.

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> CHROMOS MOLECULAR SYSTEMS INC.  
 LAZARIDES, Elias  
 WOODS, Catherine  
 5 BERNARD, Mark  
 <120> ANTICUERPOS ANTI-INTEGRINA ALFA 2 Y SUS USOS  
 <130> 14575.2  
 <150> US 60/738,303  
 <151> 2005-11-18  
 10 <160> 186  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> RASGO\_MISC  
 <223> hCDR1 [CDR1 de la región variable de cadena pesada]  
 <400> 1  
 20 Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Ile His  
 1 5 10  
 <210> 2  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 25 <220>  
 <221> RASGO\_MISC  
 <223> hCDR2 [CDR2 de la región variable de cadena pesada]  
 <400> 2  
 Val Ile Trp Ala Arg Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser  
 1 5 10 15  
 30 <210> 3  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 35 <221> RASGO\_MISC  
 <223> hCDR3 [CDR3 de la región variable de cadena pesada]  
 <400> 3  
 Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10  
 40 <210> 4  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens

<220>  
 <221> RASGO\_MISC  
 <223> 1CDR1 [CDR1 de la región variable de cadena ligera]  
 <400> 4  
 Ser Ala Asn Ser Ser Val Asn Tyr Ile His  
 5 1 5 10  
 <210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 10 <220>  
 <221> RASGO\_MISC  
 <223> 1CDR2 [CDR2 de la región variable de cadena ligera]  
 <400> 5  
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser  
 15 1 5  
 <210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 20 <220>  
 <221> RASGO\_MISC  
 <223> 1CDR3 [CDR3 de la región variable de cadena ligera]  
 <400> 6  
 Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr  
 25 1 5  
 <210> 7  
 <211> 5361  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 30 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> ADN de integrina alfa2 humana  
 <400> 7

ES 2 541 302 T3

ctgcaaacc agcgcaacta cggcccccg gtcagacca ggatggggcc agaacggaca 60  
 ggggccgcgc cgctgccgct gctgctgggt ttagcgctca gtcaaggcat tttaaattgt 120  
 tgtttggcct acaatgttgg tctcccagaa gcaaaaatat tttccggctc tccaagtga 180  
 cagtttgggt atgcagtga gcagtttata aatccaaaag gcaactgggt actggttgg 240  
 tcaccctgga gtggctttcc tgagaaccga atgggagatg tgtataaatg tctgttgac 300  
 ctatccactg ccacatgtga aaaactaaat ttgcaaactt caacaagcat tccaaatggt 360  
 actgagatga aaaccaacat gagcctcggc ttgatcctca ccaggaacat gggaaactgga 420  
 ggttttctca catgtggtcc tctgtgggca cagcaatgtg ggaatcagta ttacacaacg 480  
 ggtgtgtgtt ctgacatcag tctgtatttt cagctctcag ccagcttctc acctgcaact 540  
 cagccctgcc cttccctcat agatgttgtg gttgtgtgtg atgaatcaaa tagtatttat 600  
 ccttgggatg cagtaaagaa tttttggaa aaatttgtac aaggccttga tataggcccc 660  
 acaaagacac aggtgggggt aattcagtat gccataatc caagagttgt gtttaacttg 720  
 aacacatata aaaccaaga agaatgatt gtagcaacat ccagacatc ccaatatggt 780  
 ggggacctca caaacacatt cggagcaatt caatatgcaa gaaaatatgc ctattcagca 840  
 gcttctggtg ggcgacgaag tgctacgaaa gtaatggtag ttgtaactga cggatgaatca 900  
 catgatggtt caatgttgaa agctgtgatt gatcaatgca accatgacaa tatactgagg 960  
 tttggcatag cagttcttgg gtacttaaac agaaacgccc ttgatactaa aaatttaata 1020  
 aaagaaataa aagcgatcgc tagtattcca acagaaagat actttttcaa tgtgtctgat 1080  
 gaagcagctc tactagaaaa ggctgggaca ttaggagaac aaattttcag cattgaaggt 1140  
 actgttcaag gaggagacaa ctttcagatg gaaatgtcac aagtgggatt cagtgcagat 1200  
 tactcttctc aaaatgatat tctgatgctg ggtgcagtgg gagcttttgg ctggagtggg 1260  
 accattgtcc agaagacatc tcatggccat ttgatcttct ctaacaagc ctttgaccaa 1320  
 attctgcagg acagaaatca cagttcatat ttaggttact ctgtggctgc aatttctact 1380  
 ggagaaagca ctcactttgt tgctggtgct cctcgggcaa attataccgg ccagatagtg 1440  
 ctatatagtg tgaatgagaa tggcaatatc acggttatc aggctcaccg aggtgaccag 1500  
 attggctcct attttggtag tgtgctgtgt tcagttgatg tggataaaga caccattaca 1560  
 gacgtgctct tggtaggtgc accaatgtac atgagtgacc taaagaaaga ggaaggaaga 1620  
 gtctacctgt ttactatcaa aaagggcatt ttgggtcagc accaatttct tgaaggcccc 1680  
 gagggcattg aaaacactcg atttggttca gcaattgcag ctctttcaga catcaacatg 1740

ES 2 541 302 T3

gatggcttta atgatgtgat tgttggttca ccactagaaa atcagaattc tggagctgta 1800  
tacatttaca atggtcatca gggcactatc cgcacaaagt attcccagaa aatcttggga 1860  
tccgatggag cctttaggag ccatctccag tactttggga ggtccttga tggctatgga 1920  
gatttaaagtg gggattccat caccgatgtg tctattgggtg cctttggaca agtggttcaa 1980  
ctctggtcac aaagtattgc tgatgtagct atagaagctt cattcacacc agaaaaatc 2040  
actttggtea acaagaatgc tcagataatt ctcaaaactct gcttcagtgc aaagttcaga 2100  
cctactaagc aaaacaatca agtggccatt gtatataaca tcacacttga tgcagatgga 2160  
ttttcatcca gagtaacctc caggggttca tttaaagaaa acaatgaaag gtgcctgcag 2220  
aagaatatgg tagtaaatca agcacagagt tgccccgagc acatcattta tatacaggag 2280  
ccctctgatg ttgtcaactc tttggatttg cgtgtggaca tcagtctgga aaacctggc 2340  
actagccctg cccttgaagc ctattctgag actgccaagg tcttcagtat tcctttccac 2400  
aaagactgtg gtgaggatgg actttgcatt tctgatctag tcctagatgt ccgacaaata 2460  
ccagctgctc aagaacaacc ctttattgtc agcaaccaa acaaaagggt aacattttca 2520  
gtaacactga aaaataaaag gaaagtgc tacaacactg gaattggtgt tgatttttca 2580  
gaaaacttgt tttttgcatc attctcccta ccggttgatg ggacagaagt aacatgccag 2640  
gtggctgcat ctcagaagtc tgttgectgc gatgtaggct accctgcttt aaagagagaa 2700  
caacagtgga cttttactat taactttgac ttcaatcttc aaaaccttca gaatcaggcg 2760  
tctctcagtt tccaagcctt aagtgaaagc caagaagaaa acaaggctga taatttggtc 2820  
aacctcaaaa ttctctctct gtatgatgct gaaattcact taacaagatc taccaacata 2880  
aatttttatg aaatctcttc ggatgggaat gttccttcaa tcgtgcacag ttttgaagat 2940  
gttggcccaa aattcatctt ctccctgaag gtaacaacag gaagtgttcc agtaagcatg 3000  
gcaactgtaa tcatccacat cctcagat accaaagaaa agaaccctact gatgtaccta 3060  
actgggtgac aaacagacaa ggctgggtgac atcagttgta atgcagatat caatccactg 3120  
aaaataggac aaacatcttc ttctgtatct ttcaaaagtg aaaatttcag gcacaccaa 3180  
gaattgaact gcagaactgc ttctgtagt aatgttacct gctggttga agacgttcac 3240  
atgaaaggag aatctttgt taatgtgact accagaattt ggaacgggac tttcgcac 3300  
tcaacgttcc agacagtaca gctaacggca gctgcagaaa tcaacaccta taacctgag 3360  
atatatgtga ttgaagataa cactgttacg attcccctga tgataatgaa acctgatgag 3420  
aaagccgaag taccaacagg agttataata ggaagtataa ttgctggaat ccttttgc 3480  
ttagctctgg ttgcaatctt atggaagctc ggcttcttca aaagaaaata tgaaaagatg 3540  
accaaaaatc cagatgagat tgatgagacc acagagctca gtagctgaac cagcagacct 3600

ES 2 541 302 T3

acctgcagtg ggaaccggca gcatcccagc cagggtttgc tgtttgcgtg catggatttc 3660  
 tttttaaatc ccatattttt tttatcatgt cgtaggtaaa ctaacctggt attttaagag 3720  
 aaaactgcag gtcagtttgg atgaagaaat tgtggggggg gggggagggt cggggggcag 3780  
 gtagggaaat aatagggaaa atacctatnt tatatgatgg gggaaaaaaa gtaatcttta 3840  
 aactggctgg cccagagttt acattctaata ttgcattgtg tcagaaacat gaaatgcttc 3900  
 caagcatgac aacttttaaa gaaaaaatat atactctcag attttaaggg ggaaaactgt 3960  
 tctctttaa atatttgtct ttaaacagca actacagaag tggaagtgtc tgatatgtaa 4020  
 gtacttcac ttgtgtatat ttaaatgaat attgatgta acaagagggg aaaacaaaac 4080  
 acaggttttt tcaatttatg ctgctcatcc aaagttgcca cagatgatac ttccaagtga 4140  
 taattttatt tataaactag gtaaaatttg ttggtgttcc cttttatacc acggctgcc 4200  
 cttccacacc ccatcttgct ctaatgatca aaacatgctt gaataactga gcttagagta 4260  
 tacctoctat atgtccattt aagtaggag agggggcgat atagagacta aggcacaaaa 4320  
 ttttgtttaa aactcagaat ataacattta tgtaaaatcc catctgctag aagccccatcc 4380  
 tgtgccagag gaaggaaaag gaggaattt cctttctctt ttaggaggca caacagttct 4440  
 cttctaggat ttgtttggct gactggcagt aacctagtga atttttgaag gatgagtaat 4500  
 ttctttggca accttctcc tcccttactg aaccactctc ccacctctg gtggtaccat 4560  
 tattatagaa gccctctaca gcctgacttt ctctccagcg gtccaaagtt atccccctc 4620  
 ttacctca tccaaagttc ccactcctc aggacagctg ctgtgcatta gatattaggg 4680  
 gggaaagtca tctgtttaat ttacacactt gcatgaatta ctgtatataa actcctaac 4740  
 ttcaggagc tattttcatt tagtgctaaa caagtaagaa aaataagcta gagtgaattt 4800  
 ctaaagtgtg gaatgttatg ggatgtaaac aatgtaaagt aaaacactct caggatttca 4860  
 ccagaagtta cagatgaggc actggaacc accaccaaat tagcaggtgc accttctgtg 4920  
 gctgtcttgt ttctgaagta cttttcttc cacaagagtg aatttgacct aggcaagttt 4980  
 gttcaaaagg tagatcctga gatgatattg tcagattggg ataaggcca gcaatctgca 5040  
 ttttaacaag caccacagtc actaggatgc agatggacca cactttgaga aacaccacc 5100  
 atttctactt ttgacactt attttctctg ttctgagcc cccacattct ctaggagaaa 5160  
 cttagattaa aattcacaga cactacatat ctaaagctt gacaagtcct tgacctctat 5220  
 aaacttcaga gtcctcatta taaaatggga agactgagct ggagttcagc agtgatgctt 5280  
 tttagtttta aaagtctatg atctgatctg gacttctat aatacaata cacaatctc 5340  
 caagaatttg acttgaaaa g 5361

<210> 8

<211> 1181

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> Integrina alfa2 humana

5

ES 2 541 302 T3

<400> 8

Met Gly Pro Glu Arg Thr Gly Ala Ala Pro Leu Pro Leu Leu Leu Val  
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Ser Gln Gly Ile Leu Asn Cys Cys Leu Ala Tyr Asn Val  
 20 25 30

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

Gly Tyr Ala Val Gln Gln Phe Ile Asn Pro Lys Gly Asn Trp Leu Leu  
 50 55 60

Val Gly Ser Pro Trp Ser Gly Phe Pro Glu Asn Arg Met Gly Asp Val  
 65 70 75 80

Tyr Lys Cys Pro Val Asp Leu Ser Thr Ala Thr Cys Glu Lys Leu Asn  
 85 90 95

Leu Gln Thr Ser Thr Ser Ile Pro Asn Val Thr Glu Met Lys Thr Asn  
 100 105 110

Met Ser Leu Gly Leu Ile Leu Thr Arg Asn Met Gly Thr Gly Gly Phe  
 115 120 125

Leu Thr Cys Gly Pro Leu Trp Ala Gln Gln Cys Gly Asn Gln Tyr Tyr  
 130 135 140

Thr Thr Gly Val Cys Ser Asp Ile Ser Pro Asp Phe Gln Leu Ser Ala  
 145 150 155 160

Ser Phe Ser Pro Ala Thr Gln Pro Cys Pro Ser Leu Ile Asp Val Val  
 165 170 175

Val Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser Ile Tyr Pro Trp Asp Ala Val Lys  
 180 185 190

ES 2 541 302 T3

Asn Phe Leu Glu Lys Phe Val Gln Gly Leu Asp Ile Gly Pro Thr Lys  
 195 200 205

Thr Gln Val Gly Leu Ile Gln Tyr Ala Asn Asn Pro Arg Val Val Phe  
 210 215 220

Asn Leu Asn Thr Tyr Lys Thr Lys Glu Glu Met Ile Val Ala Thr Ser  
 225 230 235 240

Gln Thr Ser Gln Tyr Gly Gly Asp Leu Thr Asn Thr Phe Gly Ala Ile  
 245 250 255

Gln Tyr Ala Arg Lys Tyr Ala Tyr Ser Ala Ala Ser Gly Gly Arg Arg  
 260 265 270

Ser Ala Thr Lys Val Met Val Val Val Thr Asp Gly Glu Ser His Asp  
 275 280 285

Gly Ser Met Leu Lys Ala Val Ile Asp Gln Cys Asn His Asp Asn Ile  
 290 295 300

Leu Arg Phe Gly Ile Ala Val Leu Gly Tyr Leu Asn Arg Asn Ala Leu  
 305 310 315 320

Asp Thr Lys Asn Leu Ile Lys Glu Ile Lys Ala Ile Ala Ser Ile Pro  
 325 330 335

Thr Glu Arg Tyr Phe Phe Asn Val Ser Asp Glu Ala Ala Leu Leu Glu  
 340 345 350

Lys Ala Gly Thr Leu Gly Glu Gln Ile Phe Ser Ile Glu Gly Thr Val  
 355 360 365

Gln Gly Gly Asp Asn Phe Gln Met Glu Met Ser Gln Val Gly Phe Ser  
 370 375 380

Ala Asp Tyr Ser Ser Gln Asn Asp Ile Leu Met Leu Gly Ala Val Gly  
 385 390 395 400

Ala Phe Gly Trp Ser Gly Thr Ile Val Gln Lys Thr Ser His Gly His  
 405 410 415

Leu Ile Phe Pro Lys Gln Ala Phe Asp Gln Ile Leu Gln Asp Arg Asn  
 420 425 430

ES 2 541 302 T3

His Ser Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Val Ala Ala Ile Ser Thr Gly Glu  
 435 440 445  
 Ser Thr His Phe Val Ala Gly Ala Pro Arg Ala Asn Tyr Thr Gly Gln  
 450 455 460  
 Ile Val Leu Tyr Ser Val Asn Glu Asn Gly Asn Ile Thr Val Ile Gln  
 465 470 475 480  
 Ala His Arg Gly Asp Gln Ile Gly Ser Tyr Phe Gly Ser Val Leu Cys  
 485 490 495  
 Ser Val Asp Val Asp Lys Asp Thr Ile Thr Asp Val Leu Leu Val Gly  
 500 505 510  
 Ala Pro Met Tyr Met Ser Asp Leu Lys Lys Glu Glu Gly Arg Val Tyr  
 515 520 525  
 Leu Phe Thr Ile Lys Lys Gly Ile Leu Gly Gln His Gln Phe Leu Glu  
 530 535 540  
 Gly Pro Glu Gly Ile Glu Asn Thr Arg Phe Gly Ser Ala Ile Ala Ala  
 545 550 555 560  
 Leu Ser Asp Ile Asn Met Asp Gly Phe Asn Asp Val Ile Val Gly Ser  
 565 570 575  
 Pro Leu Glu Asn Gln Asn Ser Gly Ala Val Tyr Ile Tyr Asn Gly His  
 580 585 590  
 Gln Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Ile Leu Gly Ser Asp  
 595 600 605  
 Gly Ala Phe Arg Ser His Leu Gln Tyr Phe Gly Arg Ser Leu Asp Gly  
 610 615 620  
 Tyr Gly Asp Leu Asn Gly Asp Ser Ile Thr Asp Val Ser Ile Gly Ala  
 625 630 635 640  
 Phe Gly Gln Val Val Gln Leu Trp Ser Gln Ser Ile Ala Asp Val Ala  
 645 650 655  
 Ile Glu Ala Ser Phe Thr Pro Glu Lys Ile Thr Leu Val Asn Lys Asn  
 660 665 670

ES 2 541 302 T3

Ala Gln Ile Ile Leu Lys Leu Cys Phe Ser Ala Lys Phe Arg Pro Thr  
675 680 685

Lys Gln Asn Asn Gln Val Ala Ile Val Tyr Asn Ile Thr Leu Asp Ala  
690 695 700

Asp Gly Phe Ser Ser Arg Val Thr Ser Arg Gly Leu Phe Lys Glu Asn  
705 710 715 720

Asn Glu Arg Cys Leu Gln Lys Asn Met Val Val Asn Gln Ala Gln Ser  
725 730 735

Cys Pro Glu His Ile Ile Tyr Ile Gln Glu Pro Ser Asp Val Val Asn  
740 745 750

Ser Leu Asp Leu Arg Val Asp Ile Ser Leu Glu Asn Pro Gly Thr Ser  
755 760 765

Pro Ala Leu Glu Ala Tyr Ser Glu Thr Ala Lys Val Phe Ser Ile Pro  
770 775 780

Phe His Lys Asp Cys Gly Glu Asp Gly Leu Cys Ile Ser Asp Leu Val  
785 790 795 800

Leu Asp Val Arg Gln Ile Pro Ala Ala Gln Glu Gln Pro Phe Ile Val  
805 810 815

Ser Asn Gln Asn Lys Arg Leu Thr Phe Ser Val Thr Leu Lys Asn Lys  
820 825 830

Arg Glu Ser Ala Tyr Asn Thr Gly Ile Val Val Asp Phe Ser Glu Asn  
835 840 845

Leu Phe Phe Ala Ser Phe Ser Leu Pro Val Asp Gly Thr Glu Val Thr  
850 855 860

Cys Gln Val Ala Ala Ser Gln Lys Ser Val Ala Cys Asp Val Gly Tyr  
865 870 875 880

Pro Ala Leu Lys Arg Glu Gln Gln Val Thr Phe Thr Ile Asn Phe Asp  
885 890 895

Phe Asn Leu Gln Asn Leu Gln Asn Gln Ala Ser Leu Ser Phe Gln Ala  
900 905 910

ES 2 541 302 T3

Leu Ser Glu Ser Gln Glu Glu Asn Lys Ala Asp Asn Leu Val Asn Leu  
 915 920 925

Lys Ile Pro Leu Leu Tyr Asp Ala Glu Ile His Leu Thr Arg Ser Thr  
 930 935 940

Asn Ile Asn Phe Tyr Glu Ile Ser Ser Asp Gly Asn Val Pro Ser Ile  
 945 950 955 960

Val His Ser Phe Glu Asp Val Gly Pro Lys Phe Ile Phe Ser Leu Lys  
 965 970 975

Val Thr Thr Gly Ser Val Pro Val Ser Met Ala Thr Val Ile Ile His  
 980 985 990

Ile Pro Gln Tyr Thr Lys Glu Lys Asn Pro Leu Met Tyr Leu Thr Gly  
 995 1000 1005

Val Gln Thr Asp Lys Ala Gly Asp Ile Ser Cys Asn Ala Asp Ile  
 1010 1015 1020

Asn Pro Leu Lys Ile Gly Gln Thr Ser Ser Ser Val Ser Phe Lys  
 1025 1030 1035

Ser Glu Asn Phe Arg His Thr Lys Glu Leu Asn Cys Arg Thr Ala  
 1040 1045 1050

Ser Cys Ser Asn Val Thr Cys Trp Leu Lys Asp Val His Met Lys  
 1055 1060 1065

Gly Glu Tyr Phe Val Asn Val Thr Thr Arg Ile Trp Asn Gly Thr  
 1070 1075 1080

Phe Ala Ser Ser Thr Phe Gln Thr Val Gln Leu Thr Ala Ala Ala  
 1085 1090 1095

Glu Ile Asn Thr Tyr Asn Pro Glu Ile Tyr Val Ile Glu Asp Asn  
 1100 1105 1110

Thr Val Thr Ile Pro Leu Met Ile Met Lys Pro Asp Glu Lys Ala  
 1115 1120 1125

Glu Val Pro Thr Gly Val Ile Ile Gly Ser Ile Ile Ala Gly Ile  
 1130 1135 1140

Leu Leu Leu Leu Ala Leu Val Ala Ile Leu Trp Lys Leu Gly Phe  
 1145 1150 1155

Phe Lys Arg Lys Tyr Glu Lys Met Thr Lys Asn Pro Asp Glu Ile  
 1160 1165 1170

Asp Glu Thr Thr Glu Leu Ser Ser  
 1175 1180

<210> 9

<211> 3700

<212> ADN

ES 2 541 302 T3

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> rasgo\_misc

<223> ADN de integrina beta1 humana

5

<400> 9

```

agccgccc acccgccg cccgacacc gggaggcccc gccagcccg gggagaggcc 60
cagcgggagt cgcggaacag caggcccag cccaccgcg cgggccccg acgcccgcg 120
gaaaagatga atttacaacc aatcttctg attggactga tcagttcagt ttgctgtgtg 180
tttgctcaaa cagatgaaaa tagatgttta aaagcaaatg ccaaatcatg tggagaatgt 240
atacaagcag ggccaattg tgggtggtgc acaaatcaa catttttaca ggaaggaatg 300
cctacttctg cacgatgtga tgatttagaa gccttaaaaa agaagggttg ccctccagat 360
gacatagaaa atcccagagg ctccaagat ataaagaaaa ataaaaatgt acccaaccgt 420
agcaaaggaa cagcagagaa gctcaagcca gaggatatta ctcatgcca accacagcag 480
ttggttttgc gattaagatc aggggagcca cagacattta cattaataat caagagagct 540
gaagactatc ccattgacct ctactacctt atggacctgt cttactcaat gaaagacgat 600
ttggagaatg taaaaagtct tggaacagat ctgatgaatg aaatgaggag gattacttctg 660
gacttcagaa ttgatattgg ctcatattgtg gaaaagactg tgatgcetta cattagcaca 720
acaccagcta agctcaggaa cccttgaca agtgaacaga actgcaccag cccatttagc 780
tacaaaaatg tgctcagtct tactaataaa ggagaagtat ttaatgaact tgttgaaaa 840
cagcgcata ctggaattt ggattctcca gaagggtggt tcgatgcat catgcaagtt 900
gcagtttctg gatcactgat tggctggagg aatggttacac ggctgctggt gtttccaca 960
gatgccgggt ttcactttgc tggagatggg aaacttgggtg gcattgtttt accaaatgat 1020
ggacaatgtc acctggaaaa taatatgtac acaatgagcc attattatga ttatccttct 1080
attgctcacc ttgtccagaa actgagtgaa aataatattc agacaatttt tgcaagtact 1140
gaagaatttc agcctgttta caaggagctg aaaaacttga tccctaagtc agcagtagga 1200

```

ES 2 541 302 T3

acattatctg caaattctag caatgtaatt cagttgatca ttgatgcata caattccctt 1260  
 tcctcagaag tcattttgga aaacggcaaa ttgtcagaag gagtaacaat aagttacaaa 1320  
 tcttactgca agaacggggt gaatggaaca ggggaaaatg gaagaaaatg ttccaatatt 1380  
 tcattggag atgaggttca atttgaatt agcataactt caaataagtg tccaaaaaag 1440  
 gattctgaca gctttaaatt taggcctctg ggctttacgg aggaagtaga ggttattctt 1500  
 cagtacatct gtgaatgtga atgccaaagc gaaggcatcc ctgaaagtcc caagtgtcat 1560  
 gaaggaaatg ggacatttga gtgtggcgcg tgcagggtgca atgaagggcg tgttggtaga 1620  
 cattgtgaat gcagcacaga tgaagttaac agtgaagaca tggatgctta ctgcaggaaa 1680  
 gaaaacagtt cagaaatctg cagtaacaat ggagagtgcg tctgcggaca gtgtgtttgt 1740  
 aggaagaggg ataatacaaa tgaatttat tctggcaaat tctgcgagtg tgataatttc 1800  
 aactgtgata gatccaatgg cttaatattgt ggaggaaatg gtgtttgcaa gtgtcgtgtg 1860  
 tgtgagtgca accccaacta cactggcagt gcatgtgact gttctttgga tactagtact 1920  
 tgtgaagcca gcaacggaca gatctgcaat ggccggggca tctgcgagtg tgggtgtctgt 1980  
 aagtgtacag atccgaagtt tcaagggcaa acgtgtgaga tgtgtcagac ctgccttggt 2040  
 gtctgtgctg agcataaaga atgtgttcag tgcagagcct tcaataaagg agaaaagaaa 2100  
 gacacatgca cacaggaatg ttctatttt aacattacca aggtagaag tcgggacaaa 2160  
 ttaccccagc cggccaacc tgatcctgtg tcccattgta aggagaagga tgttgacgac 2220  
 tgttggttct attttacgta ttcagtgaat gggacaacg aggtcatggt tcatgttgtg 2280  
 gagaatccag agtgtcccac tggccagac atcattcaa ttgtagctgg tgtggttgct 2340  
 ggaattgttc ttattggcct tgcattactg ctgatatgga agcttttaat gataattcat 2400  
 gacagaaggg agtttgctaa atttgaaaag gagaaaatga atgccaaatg ggacacgggt 2460  
 gaaaatccta tttataagag tgccgtaaca actgtggtca atccgaagta tgagggaaaa 2520  
 tgagtactgc ccgtgcaaat cccacaacac tgaatgcaa gtagcaattt ccatagtcac 2580  
 agttaggtag ctttagggca atattgccaat ggttttactc atgtgcaggt tttgaaaatg 2640  
 tacaatatgt ataattttta aatgtttta ttattttgaa aataatgttg taattcatgc 2700  
 cagggactga caaaagactt gagacaggat ggttattctt gtcagctaag gtcacattgt 2760  
 gcctttttga ccttttcttc ctggactatt gaaatcaagc ttattggatt aagtgatatt 2820  
 tctatagcga ttgaaagggc aatagttaaa gtaatgagca tgatgagagt ttctgttaat 2880  
 catgtattaa aactgatatt tagctttaca aatatgtcag tttgcagtta tgcagaatcc 2940  
 aaagtaaatg tctgctagc tagttaagga ttgttttaaa tctgttattt tgctatttgc 3000

ES 2 541 302 T3

ctgtagaca tgactgatga catatctgaa agacaagtat gttgagagtt gctggtgtaa 3060  
aatagcttg aatagttga tctacaaagg ccatgggaaa aattcagaga gttaggaagg 3120  
aaaaaccaat agctttaaaa cctgtgtgcc attttaagag ttacttaatg tttggttaact 3180  
ttatgcctt cactttacaa attcaagcct tagataaaag aaccgagcaa tttctgcta 3240  
aaaagtcctt gatttagcac tatttacata caggccatac tttacaaagt atttctgtaa 3300  
tggggacctt ttgagttgaa tttattttat tatttttatt ttgtttaatg tctggtgctt 3360  
tctatcacct cttctaactt ttaaatgtat ttgtttgcaa ttttggggta agactttttt 3420  
atgagtactt tttctttgaa gtttttagcgg tcaatttgcc tttttaatga acatgtgaag 3480  
ttatactgtg gctatgcaac agctctcacc tacgcgagtc ttactttgag ttagtgccat 3540  
aacagaccac tgatgttta cttctcacca tttgagttgc ccatcttgtt tcacactagt 3600  
cacattcttg ttttaagtgc ctttagtttt aacagttcac tttttacagt gctatttact 3660  
gaagttattt attaaatatg cctaaaatac ttaaatcgga 3700

<210> 10

<211> 798

<212> PRT

5

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> Integrin beta1 humana

<400> 10

Met Asn Leu Gln Pro Ile Phe Trp Ile Gly Leu Ile Ser Ser Val Cys  
1 5 10 15

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

Lys Ser Cys Gly Glu Cys Ile Gln Ala Gly Pro Asn Cys Gly Trp Cys  
35 40 45

Thr Asn Ser Thr Phe Leu Gln Glu Gly Met Pro Thr Ser Ala Arg Cys  
50 55 60

Asp Asp Leu Glu Ala Leu Lys Lys Lys Gly Cys Pro Pro Asp Asp Ile  
65 70 75 80

10

Glu Asn Pro Arg Gly Ser Lys Asp Ile Lys Lys Asn Lys Asn Val Thr  
85 90 95

ES 2 541 302 T3

Asn Arg Ser Lys Gly Thr Ala Glu Lys Leu Lys Pro Glu Asp Ile Thr  
 100 105 110  
 Gln Ile Gln Pro Gln Gln Leu Val Leu Arg Leu Arg Ser Gly Glu Pro  
 115 120 125  
 Gln Thr Phe Thr Leu Lys Phe Lys Arg Ala Glu Asp Tyr Pro Ile Asp  
 130 135 140  
 Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Glu  
 145 150 155 160  
 Asn Val Lys Ser Leu Gly Thr Asp Leu Met Asn Glu Met Arg Arg Ile  
 165 170 175  
 Thr Ser Asp Phe Arg Ile Gly Phe Gly Ser Phe Val Glu Lys Thr Val  
 180 185 190  
 Met Pro Tyr Ile Ser Thr Thr Pro Ala Lys Leu Arg Asn Pro Cys Thr  
 195 200 205  
 Ser Glu Gln Asn Cys Thr Ser Pro Phe Ser Tyr Lys Asn Val Leu Ser  
 210 215 220  
 Leu Thr Asn Lys Gly Glu Val Phe Asn Glu Leu Val Gly Lys Gln Arg  
 225 230 235 240  
 Ile Ser Gly Asn Leu Asp Ser Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met  
 245 250 255  
 Gln Val Ala Val Cys Gly Ser Leu Ile Gly Trp Arg Asn Val Thr Arg  
 260 265 270  
 Leu Leu Val Phe Ser Thr Asp Ala Gly Phe His Phe Ala Gly Asp Gly  
 275 280 285  
 Lys Leu Gly Gly Ile Val Leu Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Leu Glu  
 290 295 300  
 Asn Asn Met Tyr Thr Met Ser His Tyr Tyr Asp Tyr Pro Ser Ile Ala  
 305 310 315 320  
 His Leu Val Gln Lys Leu Ser Glu Asn Asn Ile Gln Thr Ile Phe Ala  
 325 330 335  
 Val Thr Glu Glu Phe Gln Pro Val Tyr Lys Glu Leu Lys Asn Leu Ile



ES 2 541 302 T3

Arg Val Cys Glu Cys Asn Pro Asn Tyr Thr Gly Ser Ala Cys Asp Cys  
 580 585 590

Ser Leu Asp Thr Ser Thr Cys Glu Ala Ser Asn Gly Gln Ile Cys Asn  
 595 600 605

Gly Arg Gly Ile Cys Glu Cys Gly Val Cys Lys Cys Thr Asp Pro Lys  
 610 615 620

Phe Gln Gly Gln Thr Cys Glu Met Cys Gln Thr Cys Leu Gly Val Cys  
 625 630 635 640

Ala Glu His Lys Glu Cys Val Gln Cys Arg Ala Phe Asn Lys Gly Glu  
 645 650 655

Lys Lys Asp Thr Cys Thr Gln Glu Cys Ser Tyr Phe Asn Ile Thr Lys  
 660 665 670

Val Glu Ser Arg Asp Lys Leu Pro Gln Pro Val Gln Pro Asp Pro Val  
 675 680 685

Ser His Cys Lys Glu Lys Asp Val Asp Asp Cys Trp Phe Tyr Phe Thr  
 690 695 700

Tyr Ser Val Asn Gly Asn Asn Glu Val Met Val His Val Val Glu Asn  
 705 710 715 720

Pro Glu Cys Pro Thr Gly Pro Asp Ile Ile Pro Ile Val Ala Gly Val  
 725 730 735

Val Ala Gly Ile Val Leu Ile Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ile Trp Lys  
 740 745 750

Leu Leu Met Ile Ile His Asp Arg Arg Glu Phe Ala Lys Phe Glu Lys  
 755 760 765

Glu Lys Met Asn Ala Lys Trp Asp Thr Gly Glu Asn Pro Ile Tyr Lys  
 770 775 780

Ser Ala Val Thr Thr Val Val Asn Pro Lys Tyr Glu Gly Lys  
 785 790 795

<210> 11

<211> 226

<212> PRT

5

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> Dominio I alfa2 humano

<400> 11

ES 2 541 302 T3

Ser Pro Asp Phe Gln Leu Ser Ala Ser Phe Ser Pro Ala Thr Gln Pro  
 1 5 10 15  
 Cys Pro Ser Leu Ile Asp Val Val Val Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser  
 20 25 30  
 Ile Tyr Pro Trp Asp Ala Val Lys Asn Phe Leu Glu Lys Phe Val Gln  
 35 40 45  
 Gly Leu Asp Ile Gly Pro Thr Lys Thr Gln Val Gly Leu Ile Gln Tyr  
 50 55 60  
 Ala Asn Asn Pro Arg Val Val Phe Asn Leu Asn Thr Tyr Lys Thr Lys  
 65 70 75 80  
 Glu Glu Met Ile Val Ala Thr Ser Gln Thr Ser Gln Tyr Gly Gly Asp  
 85 90 95  
 Leu Thr Asn Thr Phe Gly Ala Ile Gln Tyr Ala Arg Lys Tyr Ala Tyr  
 100 105 110  
 Ser Ala Ala Ser Gly Gly Arg Arg Ser Ala Thr Lys Val Met Val Val  
 115 120 125  
 Val Thr Asp Gly Glu Ser His Asp Gly Ser Met Leu Lys Ala Val Ile  
 130 135 140  
 Asp Gln Cys Asn His Asp Asn Ile Leu Arg Phe Gly Ile Ala Val Leu  
 145 150 155 160  
 Gly Tyr Leu Asn Arg Asn Ala Leu Asp Thr Lys Asn Leu Ile Lys Glu  
 165 170 175  
 Ile Lys Ala Ile Ala Ser Ile Pro Thr Glu Arg Tyr Phe Phe Asn Val  
 180 185 190  
 Ser Asp Glu Ala Ala Leu Leu Glu Lys Ala Gly Thr Leu Gly Glu Gln  
 195 200 205  
 Ile Phe Ser Ile Glu Gly Thr Val Gln Gly Gly Asp Asn Phe Gln Met  
 210 215 220

Glu Met

225

<210> 12

5 <211> 71

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

10 <223> FW1-3 4-59 [FW=1-25; FW2=26-39; FW3=40-71]

<400> 12

ES 2 541 302 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly  
 20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser  
 35 40 45

Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr  
 50 55 60

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 65 70

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Homo Sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> FW4 4-59 [entrada NCBI gi/33583]

<400> 13

10 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 14

<211> 27

<212> ADN

15 <213> Homo Sapiens

<220>

<221> rasgo\_misc

<223> VHL-for [cebador directo]

<400> 14

20 ccatggctgt ctggggctg ctctct 27

<210> 15

<211> 17

<212> ADN

25 <213> Homo Sapiens

<220>

<221> rasgo\_misc

<223> HC-rev [cebador inverso]

<400> 15

30 ggggccagt gatagac 17

<210> 16

30 <211> 28

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<220>

ES 2 541 302 T3

```

<221> rasgo_misc
<223> VLL-for [cebador directo]
<400> 16
ccatggattt tcaagtcag attttcag      28
5
<210> 17
<211> 17
<212> ADN
<213> Homo Sapiens
<220>
10
<221> rasgo_misc
<223> LCKappa-rev [cebador inverso]
<400> 17
gttggtgcag catcagc      17
15
<210> 18
<211> 318
<212> ADN
<213> Homo Sapiens
<220>
20
<221> rasgo_misc
<223> TMC-2206 VL
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(318)
<400> 18
caa ttt gtt ctc acc cag tct cca gca ttc ttg tct gct tct cca ggg      48
Gln Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1                               5                               10                               15

gag aag gtc acc atg acc tgc agt gcc aac tca agt gtg aat tac att      96
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Asn Tyr Ile
                20                               25                               30

cac tgg tac cag cag aag tca ggc acc tcc ccc aaa aaa tgg att tat      144
His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Lys Trp Ile Tyr
                35                               40                               45

gac act tcc aaa ctg gct tct gga gtc cct gtt cgc ttc agt ggc agt      192
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
                50                               55                               60

gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc agc atg gag act gag      240
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Thr Glu
65                               70                               75                               80

gat gct gcc act tat tac tgc cag cag tgg act act aac cca ctc acg      288
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr
                85                               90                               95

ttc ggt gct ggg acc agg gtg gag ctg aaa      318
Phe Gly Ala Gly Thr Arg Val Glu Leu Lys
                100                               105

<210> 19
<211> 106
<212> PRT

```

ES 2 541 302 T3

<213> Homo Sapiens

<400> 19

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Asn Tyr Ile  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Lys Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Thr Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr  
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Arg Val Glu Leu Lys  
 100 105

5 <210> 20

<211> 357

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> CDS

<222> (1)..(357)

<220>

<221> rasgo\_misc

<222> (1)..(357)

15 <223> TMC-2206 VH

<400> 20

ES 2 541 302 T3

cag gtg cag ttg aag gag tca gga cct ggc ctg gtg gcg ccc tca cag 48  
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

agc ctg tcc atc act tgt act gtc tct gga ttt tca tta acc aac tat 96  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr  
 20 25 30

ggt att cac tgg gtt cgc cag cct cca gga aag ggt ctg gag tgg ctg 144  
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45

gga gtg ata tgg gct cgt gga ttc aca aat tat aat tcg gct ctc atg 192  
 Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met  
 50 55 60

tcc aga ctg atc atc aca aaa gac aat tcc cag agt caa gtc ttc tta 240  
 Ser Arg Leu Ile Ile Thr Lys Asp Asn Ser Gln Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80

aaa atg aac agt cta caa cct gat gac tca gcc act tac ttc tgt gcc 288  
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Pro Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala  
 85 90 95

aga gcg aac gac ggg gtc tat tat gct atg gac tac tgg ggt cag gga 336  
 Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

acc tca gtc acc gtc tcc tca 357  
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 21

<211> 119

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr  
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met  
 50 55 60

Ser Arg Leu Ile Ile Thr Lys Asp Asn Ser Gln Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Pro Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala  
 85 90 95

Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 22

<211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 5 <221> rasgo\_misc  
 <223> TMC-2206-r5' [cebador directo]  
 <400> 22  
 cccgaattca caggtgcagt tgaaggagtc a 31  
 <210> 23  
 10 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 15 <223> TMC-2206-r3' [cebador inverso]  
 <400> 23  
 cgggatcctt aggatcattt accaggagag tggga 35  
 <210> 24  
 <211> 31  
 20 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> TMC-2206-k5' [cebador directo]  
 25 <400> 24  
 cccgaattca caattgttc tcaccagtc t 31  
 <210> 25  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 30 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> TMC-2206-k3' [cebador inverso]  
 <400> 25  
 35 cgggatcctt atctctaaca ctcatcctg ttgaa 35  
 <210> 26  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 40 <220>  
 <221> RASGO\_MISC  
 <223> secuencia líder Igkappa (Igk)  
 <400> 26

ES 2 541 302 T3

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Thr Gly Asp  
 20

<210> 27  
 <211> 76  
 <212> ADN  
 5 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> Oligonucleótidos Igkappa-S [Cebador]  
 <400> 27  
 10 tcgagccacc atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg 60  
 ttccactgga gacgcg 76  
 <210> 28  
 <211> 76  
 <212> ADN  
 15 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> Oligonucleótidos Igkappa-AS [Cebador]  
 <400> 28  
 aattcgcgtc tccagtggaa cctggaaccc agagcagcag tacccatagc aggagtgtgt 60  
 20 ctgtctccat ggtggc 76  
 <210> 29  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 25 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> TMC2206VH-hlgG1/4Fc-Sall  
 <400> 29  
 ctggctgac gctgaggaga cgggtactga ggt 33  
 30 <210> 30  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 35 <221> rasgo\_misc  
 <223> hlgG1/4Fc-Sall-F [cebador directo]  
 <400> 30  
 tcagcgtcga ccaagggccc atcsgtcttc 30  
 <210> 31  
 40 <211> 48

ES 2 541 302 T3

<212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 5 <223> hlgG1/4Fc-NotI-R [cebador inverso]  
 <400> 31  
 aaggaagcg gccgcttacc atttaccocyg agacaggag aggtctt 48  
 <210> 32  
 <211> 39  
 10 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> TMC2206VL-hKc-Sall [cebador inverso]  
 15 <400> 32  
 tcgtttgatg tcgacctgg tcccagcacc gaactggag 39  
 <210> 33  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 20 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> hKc-Sall-F [cebador directo]  
 <400> 33  
 25 accaaggtcg acatcaaacg aactgtggct gcacc 35  
 <210> 34  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 30 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> hKc-NotI-R [cebador inverso]  
 <400> 34  
 aaggaagcg gccgcttacc arcactctcc cctgtgaag ctctt 45  
 35 <210> 35  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 40 <221> rasgo\_misc  
 <223> TMC-2206VLwt-hKc-F [cebador directo]  
 <400> 35  
 aggtggagc tgaacgaac tgtggctgc 29  
 <210> 36

ES 2 541 302 T3

<211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 5 <221> rasgo\_misc  
 <223> TMC-2206VLwt-hKc-R [cebador inverso]  
 <400> 36  
 tcgtttcagc tccaccctgg tccc 24  
 <210> 37  
 10 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> RASGO\_MISC  
 15 <223> proteína de la línea germinal A14 VL  
 <400> 37  
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Gly Ile Gly Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser 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 Glu Ala  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105  
 <210> 38  
 <211> 10  
 20 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> RASGO\_MISC  
 <223> FW 4 de la cadena ligera kappa madura  
 25 <400> 38  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 1 5 10  
 <210> 39  
 <211> 121

ES 2 541 302 T3

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

5 <223> proteína de la línea germinal 4-59 VH

<400> 39

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg His Asn Ser Ser Ser Trp Tyr Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 40

<211> 119

10 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> hVH1.0

15 <400> 40

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu



ES 2 541 302 T3

<213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVH3.0-F [cebador directo]  
 5 <400> 42  
 agcgtggaca ccagcaagaa ccagttcagc ctgaagctga gcagcgtg 48  
 <210> 43  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 10 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVH3.0-R [cebador inverso]  
 <400> 43  
 15 gttctgtctg gtgtccacgc tgatggtcac gcgggacatg agagcgtgt t 51  
 <210> 44  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 20 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVH4.0-F [cebador directo]  
 <400> 44  
 25 cctccaggca agggcctgga gtggatcggc gtgatatggg ctcgcggc 48  
 <210> 45  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 30 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVH4.0-R [cebador inverso]  
 <400> 45  
 ctccaggccc ftgcttgag gctggcgtat ccagtggatg ccatagtgg t 51  
 <210> 46  
 35 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 40 <223> hVL3.0-F [cebador directo]  
 <400> 46  
 cccaagctcc tgatctatga cactccaag ctg 33  
 <210> 47  
 <211> 42

<212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 5 <223> hVL3.0-R [cebador inverso]  
 <400> 47  
 agtgtcatag atcaggagct tggggcctg gtcgggcttc tg 42  
 <210> 48  
 <211> 45  
 10 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVL4.0-F [cebador directo]  
 15 <400> 48  
 gacgcgaatt cagacgtggt gatgaccag tctccagcat tctctg 45  
 <210> 49  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 20 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVH2.0-F [cebador directo]  
 <400> 49  
 25 gtgaccatca gcaaggacaa cagc 24  
 <210> 50  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 30 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVH2.0-R [cebador inverso]  
 <400> 50  
 gctgtgtcc ttgctgatgg tcacgcggga catgagagcg ctggt 45  
 35 <210> 51  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 40 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVH5.0-F [cebador directo]  
 <400> 51  
 atcggcgtga tatgggctcg cggttc 27  
 <210> 52

ES 2 541 302 T3

<211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 5 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVH5.0-R [cebador inverso]  
 <400> 52  
 gccgcgagcc catatcacgc cgatccactc caggcccttg cctgg 45  
 <210> 53  
 10 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 15 <223> hVH6.0-F [cebador directo]  
 <400> 53  
 atatgggctc gcggcttcac aaac 24  
 <210> 54  
 <211> 24  
 20 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVH6.0-R [cebador inverso]  
 25 <400> 54  
 gtttgtgaag ccgcgagccc atat 24  
 <210> 55  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 30 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVH7.0-F [cebador directo]  
 <400> 55  
 35 gccgcggaca ccgccgtgta ctactgcgcc agagccaacg acggg 45  
 <210> 56  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 40 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVH7.0-R [cebador inverso]  
 <400> 56  
 gtagtacacg gcggtgtccg cggcgggt 27

<210> 57  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 5 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVH8.0-F [cebador directo]  
 <400> 57  
 atatccaact atggcatcca ctgggtt 27  
 10 <210> 58  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 15 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVH8.0-R [cebador inverso]  
 <400> 58  
 ccagtggatg ccatagtgg atatgctaaa tccagagacg gtacaggt 48  
 <210> 59  
 20 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 25 <223> hVL2.0-R [cebador inverso]  
 <400> 59  
 cagcttgaa gtgcataga tcaattctt gggggcctgg tcggg 45  
 <210> 60  
 <211> 45  
 30 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVL5.0-F [cebador directo]  
 35 <400> 60  
 gacggaatt cagacttctg gctgaccag tctccagcat tcctg 45  
 <210> 61  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 40 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVL6.0-F [cebador directo]  
 <400> 61

ES 2 541 302 T3

gacgcgaatt cacagttcgt gatgaccag tctccagcat tctctg 45  
 <210> 62  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 5 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVL7.0-F [cebador directo]  
 <400> 62  
 10 gacgcgaatt cagacttcgt gatgaccag tctccagcat tctctg 45  
 <210> 63  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 15 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVL8.0-F [cebador directo]  
 <400> 63  
 20 ttcacctca ccatcagcag cctggag 27  
 <210> 64  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 25 <221> rasgo\_misc  
 <223> hVL8.0-R [cebador inverso]  
 <400> 64  
 ctccaggctg ctgatgtga aggtgaagtc ggtgccgctg ccgctgcc 48  
 <210> 65  
 30 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 35 <223> hLCQ3-F [cebador directo]  
 <400> 65  
 ccaatcaagc gtgaactaca ttactgg 28  
 <210> 66  
 <211> 48  
 40 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> hLCQ3-R [cebador inverso]

ES 2 541 302 T3

<400> 66  
 ccagtgatg tagttcacgc ttgattgggc gctgcaggtg atggtcac 48  
 <210> 67  
 <211> 23  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> Igk-For [cebador directo]  
 10 <400> 67  
 actcctgcta tgggtactgc tgc 23  
 <210> 68  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 15 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> hlgG1Fc-CH1-R [cebador inverso]  
 20 <400> 68  
 gaagtagtcc ttgaccaggc ag 22  
 <210> 69  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 25 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> CI-neo-msc3' [Cebador]  
 <400> 69  
 30 tttcactgca ttctagttgt gg 22  
 <210> 70  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 35 <221> RASGO\_MISC  
 <223> hVH2.0  
 <400> 70



ES 2 541 302 T3

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

<210> 72

<211> 119

<212> PRT

5

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> hVL4.0

<400> 72

ES 2 541 302 T3

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

<210> 73

<211> 119

<212> PRT

5

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> hVH5.0

<400> 73

10

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

ES 2 541 302 T3

<210> 74

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

5

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> hVH6.0

<400> 74

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr  
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala  
85 90 95

Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

10

<210> 75

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

15

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> hVH7.0

<400> 75

ES 2 541 302 T3

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

<210> 76

<211> 119

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

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

<210> 77

<211> 119

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<220>

ES 2 541 302 T3

<221> RASGO\_MISC

<223> hVH9.0

<400> 77

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

5

<210> 78

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

10

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> hVH10.0

<400> 78

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

15

<210> 79

ES 2 541 302 T3

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

5

<221> RASGO\_MISC

<223> hVH11.0

<400> 79

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

10

<210> 80

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

15

<221> RASGO\_MISC

<223> hVH2.0

<400> 80

ES 2 541 302 T3

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

<210> 81

<211> 106

<212> PRT

5

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> hVL3.0

<400> 81

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

<210> 82

<211> 106

<212> PRT

15

<213> Homo Sapiens

<220>

ES 2 541 302 T3

<221> RASGO\_MISC

<223> hVL4.0

<400> 82

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Asn Tyr Ile  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Trp Ile Tyr  
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr  
85 90 95

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

5

<210> 83

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

10

<221> RASGO\_MISC

<223> hVL5.0

<400> 83

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Asn Tyr Ile  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Trp Ile Tyr  
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr  
85 90 95

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

15

<210> 84

<211> 106

ES 2 541 302 T3

<212> PRT  
<213> Homo Sapiens  
<220>  
<221> RASGO\_MISC  
5 <223> hVL6.0  
<400> 84  
Gln Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Asn Tyr Ile  
20 25 30  
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Trp Ile Tyr  
35 40 45  
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60  
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu  
65 70 75 80  
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr  
85 90 95  
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105  
<210> 85  
10 <211> 106  
<212> PRT  
<213> Homo Sapiens  
<220>  
<221> RASGO\_MISC  
15 <223> hVL7.0  
<400> 85

ES 2 541 302 T3

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Asn Tyr Ile  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr  
 85 90 95

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

<210> 86

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Homo Sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> hVL8.0

<400> 86

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Asn Tyr Ile  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr  
 85 90 95

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

<210> 87

<211> 106

<212> PRT

15 <213> Homo Sapiens

<220>

ES 2 541 302 T3

<221> RASGO\_MISC

<223> hVL9.0

<400> 87

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Asn Tyr Ile  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Trp Ile Lys  
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr  
85 90 95

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

5

<210> 88

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

10

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> hVL10.0

<400> 88

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Asn Tyr Ile  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Leu Ile Tyr  
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr  
85 90 95

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

15

<210> 89

<211> 106

ES 2 541 302 T3

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

5

<223> hVL11.0

<400> 89

```

Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
1          5          10          15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Asn Tyr Ile
          20          25          30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Trp Ile Tyr
          35          40          45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu
65          70          75          80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr
          85          90          95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105
    
```

<210> 90

10

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

15

<223> hVL1.0Q

<400> 90

```

Gln Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
1          5          10          15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Gln Ser Ser Val Asn Tyr Ile
          20          25          30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Trp Ile Tyr
          35          40          45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu
65          70          75          80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr
          85          90          95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105
    
```

ES 2 541 302 T3

5  
 <210> 91  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> RASGO\_MISC  
 <223> hVL10.0Q  
 <400> 91  
 Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Gln Ser Ser Val Asn Tyr Ile  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Leu Ile Tyr  
 35 40 45  
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

10  
 <210> 92  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 15  
 <221> RASGO\_MISC  
 <223> hVL12.0Q  
 <400> 92  
 Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Gln Ser Ser Val Asn Tyr Ile

ES 2 541 302 T3

20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Leu Ile Tyr  
 35 40 45  
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105  
 <210> 93  
 <211> 222  
 <212> PRT  
 5 <213> Rattus rattus  
 <220>  
 <221> RASGO\_MISC  
 <223> Proteína del dominio I de integrina alfa2 de Rata  
 <400> 93  
 Ser Pro Asp Phe Gln Ser Leu Thr Ser Phe Ser Pro Ala Val Gln Asp  
 1 5 10 15  
 Val Val Val Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser Ile Tyr Pro Trp Glu Ala  
 20 25 30  
 Val Lys Asn Phe Leu Glu Lys Phe Val Gln Gly Leu Asp Ile Gly Pro  
 35 40 45  
 Lys Lys Thr Gln Val Ala Leu Ile Gln Tyr Ala Asn Asp Pro Arg Val  
 50 55 60  
 Val Phe Asn Leu Thr Thr Tyr Lys Asn Lys Glu Asp Met Val Gln Ala  
 65 70 75 80  
 Thr Ser Glu Thr Arg Gln Tyr Gly Gly Asp Leu Thr Asn Thr Phe Lys  
 85 90 95  
 Ala Ile Gln Phe Ala Arg Asp Ile Ala Tyr Leu Pro Glu Ser Gly Gly  
 100 105 110

5

10

ES 2 541 302 T3

Arg Pro Gly Ala Thr Lys Val Met Val Val Val Thr Asp Gly Glu Ser  
 115 120 125

His Asp Gly Ser Lys Leu Gln Thr Val Ile Gln Gln Cys Asn Asp Asp  
 130 135 140

Glu Ile Leu Arg Phe Gly Ile Ala Val Leu Gly Tyr Leu Asn Arg Asn  
 145 150 155 160

Ala Leu Asp Thr Lys Asn Leu Ile Lys Glu Ile Lys Ala Ile Ala Ser  
 165 170 175

Thr Pro Thr Glu Arg Tyr Phe Phe Asn Val Ala Asp Glu Ala Ala Leu  
 180 185 190

Leu Glu Lys Ala Gly Thr Leu Gly Glu His Ile Phe Ser Ile Glu Gly  
 195 200 205

Thr Val Gln Gly Gly Asp Asn Phe Gln Met Glu Met Ala Gln  
 210 215 220

<210> 94

<211> 228

<212> PRT

5

<213> Mus musculus

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> Proteína del dominio I de integrina alfa 2 de ratón

<400> 94

Ser Pro Asp Phe Gln Phe Leu Thr Ser Phe Ser Pro Ala Val Gln Ala  
 1 5 10 15

Cys Pro Ser Leu Val Asp Val Val Val Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser  
 20 25 30

Ile Tyr Pro Trp Glu Ala Val Lys Asn Phe Leu Val Lys Phe Val Thr  
 35 40 45

Gly Leu Asp Ile Gly Pro Lys Lys Thr Gln Val Ala Leu Ile Gln Tyr  
 50 55 60

10

Ala Asn Glu Pro Arg Ile Ile Phe Asn Leu Asn Asp Phe Glu Thr Lys  
 65 70 75 80

ES 2 541 302 T3

Glu Asp Met Val Gln Ala Thr Ser Glu Thr Arg Gln His Gly Gly Asp  
 85 90 95  
 Leu Thr Asn Thr Phe Arg Ala Ile Glu Phe Ala Arg Asp Tyr Ala Tyr  
 100 105 110  
 Ser Gln Thr Ser Gly Gly Arg Pro Gly Ala Thr Lys Val Met Val Val  
 115 120 125  
 Val Thr Asp Gly Glu Ser His Asp Gly Ser Lys Leu Lys Thr Val Ile  
 130 135 140  
 Gln Gln Cys Asn Asp Asp Glu Ile Leu Arg Phe Gly Ile Ala Val Leu  
 145 150 155 160  
 Gly Tyr Leu Asn Arg Asn Ala Leu Asp Thr Lys Asn Leu Ile Lys Glu  
 165 170 175  
 Ile Lys Ala Ile Ala Ser Thr Pro Thr Glu Arg Tyr Phe Phe Asn Val  
 180 185 190  
 Ser Asp Glu Ala Ala Leu Leu Glu Lys Ala Gly Thr Leu Gly Glu Gln  
 195 200 205  
 Ile Phe Ser Ile Glu Gly Thr Val Gln Gly Gly Asp Asn Phe Gln Met  
 210 215 220

Glu Met Ser Gln

225

<210> 95

5 <211> 26

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> rasgo\_misc

10 <223> Kappa-F

<400> 95

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtctt 26

<210> 96

<211> 41

15 <212> ADN

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> rasgo\_misc

<223> Kappa-BamHI-R

20 <400> 96

aattcggatc ctactaaca ctctcccctg ttgaagctct t 41

<210> 97

<211> 40

<212> ADN

<213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> VH12.0-(K71V)-F  
 5 <400> 97  
 gcctgacat cagcgtggac aacagcaaga accaggtgag 40  
 <210> 98  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 10 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> VH12.0(K71V)-R  
 <400> 98  
 15 ctcaactggt tcttgctgt gtccacgctg atggcaggc 40  
 <210> 99  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 20 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> VH13.0-(N73T)-F  
 <400> 99  
 25 ctgaccatca gcaaggacac cagcaagaac caggtgagcc 40  
 <210> 100  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 30 <221> rasgo\_misc  
 <223> VH13.0-(N73T)R  
 <400> 100  
 ggctcacctg gttctgctg gtgccttgc tgatggcag 40  
 <210> 101  
 35 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 40 <223> VH14.0-(V78F)-F  
 <400> 101  
 gcaaggacaa cagcaagaac cagtttagcc tgaagctgag c 41  
 <210> 102  
 <211> 41

ES 2 541 302 T3

<212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 5 <223> VH14.0 (V78F)-R  
 <400> 102  
 gctcagcttc aggctaaact ggttcttgct gttgtccttg c 41  
 <210> 103  
 <211> 648  
 10 <212> ADN  
 <213> Macaca fascicularis  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> Dominio I alfa2 de Cynomolgus  
 15 <400> 103  
 agtcctgatt ttcagctctc agccagcttc tcacctgcaa ctcagccctg cccttccttc 60  
 atagatggtg tgggtgtgtg tgatgaatca aatagatatt atccttgga tgcagtagac 120  
 aatTTTTTgg aaaaatttgt acaaggcctg gatataggcc ccacaaagac acaggtgggg 180  
 ttaattcagt atgccaataa tccaagagtt gtgtttaact tgaacacata taaaaccaa 240  
 gaagaaatga ttgtagcaac atcccagaca tccaatatg gtggggacct cacaaacaca 300  
 ttcggagcaa ttcaatatgc aagaaaatat gcctattcag cagcttctgg tgggagcga 360  
 agtgctacga aagtaatggt agttgtaact gacggtgaat cacatgatgg ttcaatggtg 420  
 aaagctgtga ttgatcaatg caaccatgac aatatactga ggtttggcat agcagttctt 480  
 gggacttaa acagaaacgc ccttgatact aaaaatttaa taaaagaaat aaaagcgatc 540  
 gctagtattc caacagaaag atacttttcc aatgtgtctg atgaagcagc tctactagaa 600  
 aaggctggga cattaggaga acaaatttcc agcattgaag gtactgtt 648  
 <210> 104  
 <211> 648  
 20 <212> ADN  
 <213> Macaca mulatta  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> Dominio I alfa2 de Rhesus  
 25 <400> 104

ES 2 541 302 T3

```

agtectgatt ttcagctctc agccagcttc tcacctgcaa ctgagcctg cccttcctc      60
atagatggtg tggttgtgtg tgatgaatca aatagtattt atccttggga tgcagtaaag    120
aatttttttg aaaaatttgt acaaggcctg gatataggcc ccacaaagac acaggtgggg    180
ttaattcagt atgccaataa tccaagagtt gtgtttaact tgaacacata taaaaccaa      240
gaagaaatga ttgtagcaac atcccagaca tccaatatg gtggggacct cacaaacaca    300
ttcggagcaa ttcaatatgc aagaaaatat gcctattcag cagcttctgg tgggcgacga    360
agtgctacga aagtaatggt agttgtaact gacggtgaat cacatgatgg ttcaatggtg    420
aaagctgtga ttgatcaatg caaccatgac aatatactga ggtttggcat agcagttctt    480
gggtacttaa acagaaacgc ccttgatact aaaaatttaa taaaagaaat aaaagcgatc    540
gctagtattc caacagaaag atactttttc aatgtgtctg atgaagcagc tctactagaa    600
aaggctggga cattaggaga acaaattttc agcattgaag gtactggt                    648

```

<210> 105

<211> 997

<212> ADN

5

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> rasgo\_misc

<223> Región constante de IgG4

<220>

10

<221> CDS

<222> (1)..(978)

<400> 105

```

tcc acc aag ggc cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg agc      48
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
1                    5                10                15

```

```

acc tcc gag agc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc      96
Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
                20                25                30

```

ES 2 541 302 T3

ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly	144
35 40 45	
gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu	192
50 55 60	
agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acg aag acc tac Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr	240
65 70 75 80	
acc tgc aac gta gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg	288
85 90 95	
gtt gag tcc aaa tat ggt ccc cca tgc cca tca tgc cca gca cct gag Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu	336
100 105 110	
ttc ctg ggg gga cca tca gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag gac Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp	384
115 120 125	
act ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp	432
130 135 140	
gtg agc cag gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat ggc Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly	480
145 150 155 160	
gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc aac Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn	528
165 170 175	
agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Thr Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp	576
180 185 190	
ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc ccg Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro	624
195 200 205	
tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gag Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu	672
210 215 220	
cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cag gag gag atg acc aag aac Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn	720
225 230 235 240	
cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile	768
245 250 255	
gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr	816
260 265 270	

ES 2 541 302 T3

acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc agg 864  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg  
 275 280 285

cta acc gtg gac aag agc agg tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca tgc 912  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 290 295 300

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac aca cag aag agc ctc 960  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 305 310 315 320

tcc ctg tct ctg ggt aaa tgataggatc cgcggccgc 997  
 Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

<210> 106  
 <211> 326  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 <400> 106

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser  
 1 5 10 15

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

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly  
 35 40 45

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu  
 50 55 60

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr  
 65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg  
 85 90 95

Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu  
 100 105 110

Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 130 135 140

5

ES 2 541 302 T3

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

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
 165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 180 185 190

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

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 260 265 270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg  
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

<210> 107

<211> 648

<212> ADN

5 <213> HOMO SAPIENS

<220>

<221> rasgo\_misc

<223> Dominio I alfa2 humano

<400> 107

10 agtctctgatt ttcagctctc agccagcttc tcacctgcaa ctcagccctg cccttcctc 60

ES 2 541 302 T3

atagatgttg tgggtgtg tgatgaatca aatagtattt atccttggga tgcagtaaag 120  
 aatTTTTTgg aaaaatttgt acaaggcctg gatataggcc ccacaaagac acagggtggg 180  
 ttaattcagt atgccaataa tccaagagtt gtgtttaact tgaacacata taaaaccaa 240  
 gaagaaatga ttgtagcaac atcccagaca tccaatatg gtggggacct cacaaacaca 300  
 ttcggagcaa ttcaatatgc aagaaaatat gcctattcag cagcttctgg tgggcgacga 360  
 agtgctacga aagtaatggt agttgtaact gacggtgaat cacatgatgg ttcaatggtg 420  
 aaagctgtga ttgatcaatg caaccatgac aatatactga ggtttggcat agcagttctt 480  
 gggacttaa acagaaacgc ccttgatact aaaaatttaa taaaagaat aaaagcgatc 540  
 gctagtattc caacagaaag atacttttc aatgtgtctg atgaagcagc tctactagaa 600  
 aaggctggga cattaggaga acaaatttcc agcattgaag gtactgtt 648

<210> 108

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Homo Sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> hVL12.0

<400> 108

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Asn Tyr Ile  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Leu Ile Tyr  
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr  
 85 90 95

10 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 109

<211> 119

<212> PRT

15 <213> Homo Sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> hVH12.0

<400> 109

ES 2 541 302 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr  
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met  
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 110

<211> 119

5

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> hvH13.0

10

<400> 110

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr  
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 111

ES 2 541 302 T3

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

5

<221> RASGO\_MISC

<223> hVH14.0

<400> 111

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

<210> 112

10

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

15

<223> LCDR1 [N26Q]

<400> 112

Ser Ala Gln Ser Ser Val Asn Tyr Ile His  
 1 5 10

<210> 113

<211> 681

20

<212> ADN

<213> Rattus rattus

<220>

<221> rasgo\_misc

<223> Dominio I alfa 2 de rata

25

<400> 113

ES 2 541 302 T3

```

agtccagact ttcagtcggt gacaagcttc tcacctgcag ttcaagcttg cccttcctc      60
gtagatgtcg tagttgtctg tgatgaatca aacagtattt atccctggga agcagtaaag     120
aattttttgg aaaagtttgt gcaaggcctg gatataggac ctaaaaagac acaggtggcg     180
ttaattcaat atgccaacga cccaagagtt gtctttaact tgaccactta caaaaacaaa     240
gaagatatgg ttcaggccac atccgagacg cgccagtatg gtggggacct cacaaacacc     300
ttcaaggcta tccaatttgc aagagacatt gcttatttac cggagtctgg cgggcgcca      360
ggtgctacaa aagtcatggt agttgtgact gatggggaat cccatgatgg gtcgaagctg     420
caaaactgtga tccagcaatg caatgatgac gagatactga ggtttgcat agcggttctt     480
ggatatttaa acagaaatgc tcttgatact aaaaatctaa tcaaagaaat taaagcaatc     540
gctagcactc caacggagag gtactttttc aatgtggccg atgaggcggc tcttctggag     600
aaagctggca ctctagggga gcatatattc agcattgaag gcaactgttca aggaggagac     660
aacttcaga  tggaaatggc a                                             681

```

<210> 114

<211> 648

5

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> rasgo\_misc

<223> Clon del dominio I alfa 2 de ratón

10

<400> 114

```

agtccagact ttcagttctt gaccagcttt tcacctgcag ttcaggcttg cccttcctc      60
gtggatgttg tagttgatg tgatgaatca aacagtattt atccttggga agcagtaaag     120
aactttttgg taaagtttgt gacaggcctg gatataggac ctaaaaagac acaggtggcg     180
ttaattcaat atgccaatga gccgagaatt atatttaact tgaacgattt cgaaacaaa     240
gaggatatgg tccagccac atctgagacg cgccaacatg gtggggacct cacaaacacc     300
ttcagagcta tcgaattcgc aagagactac gcttattcac agacttctgg cgggcgcccg     360
ggtgctacaa aagtcatggt agttgtgacc gatggcgagt cccatgatgg gtcgaagctg     420
aaaactgtga tccagcaatg caatgatgac gagatactga ggttcgcat agcagttctt     480
gggtatttaa acagaaatgc tcttgatact aaaaatttaa tcaaagaaat aaaagcaatt     540
gctagtactc caaccgagag atactttttc aatgtggccg acgaagcggc tcttctggag     600
aaggctggaa ctctagggga gcaaatattc agcattgaag gcaactgtt                    648

```

<210> 115

<211> 6

<212> ADN

15

<213> Homo sapiens

<220>

<221> rasgo\_misc

<223> Secuencia aguas arriba ilustrativa del comienzo de la transcripción del gen

<220>

20

<221> rasgo\_misc

<222> (2)..(2)  
 <223> n e s a, c, g, o t  
 <400> 115  
 cncaat        6  
 5        <210> 116  
          <211> 6  
          <212> ADN  
          <213> Homo sapiens  
          <220>  
 10       <221> rasgo\_misc  
          <223> Secuencia ilustrativa en el extremo 3' del gen  
          <400> 116  
          aataaa        6  
          <210> 117  
 15       <211> 31  
          <212> ADN  
          <213> Homo Sapiens  
          <220>  
          <221> rasgo\_misc  
 20       <223> halphal F  
          <400> 117  
          ggggatccag tcttgaattt tcagctctca g        31  
          <210> 118  
          <211> 27  
 25       <212> ADN  
          <213> Homo Sapiens  
          <220>  
          <221> rasgo\_misc  
          <223> halphal R  
 30       <400> 118  
          gggaattcaa cagtaccttc aatgctg        27  
          <210> 119  
          <211> 19  
          <212> ADN  
 35       <213> Homo sapiens  
          <220>  
          <221> rasgo\_misc  
          <223> Cebador directo de dominio I humano  
          <400> 119  
 40       ggggatccag tcttgatt        19  
          <210> 120  
          <211> 18  
          <212> ADN  
          <213> Homo sapiens

ES 2 541 302 T3

<220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> Cebador inverso del dominio I humano  
 <400> 120  
 5 ggaattcaac agtacctt 18  
 <210> 121  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 10 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> malphal F  
 <400> 121  
 15 ggggatccag tccagacttt cagttcttg 29  
 <210> 122  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 20 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> malphal R  
 <400> 122  
 25 tggaattca acagtgcctt caatgctg 28  
 <210> 123  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 30 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> ralphal F  
 <400> 123  
 35 ggggatccag tccagacttt cagtcgtga c 31  
 <210> 124  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 40 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> ralphal R  
 <400> 124  
 tggaattct gccattcca tctggaagt g 31  
 <210> 125  
 <211> 34  
 <212> ADN

ES 2 541 302 T3

<213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal I21V F  
 5 <400> 125  
 cagccctgcc cttccctcgt agatgttg gttg 34  
 <210> 126  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 10 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal I21V R  
 <400> 126  
 15 caaccacaac atctacgagg gaagggcagg gctg 34  
 <210> 127  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 20 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal E44V F  
 <400> 127  
 cagtaaagaa tttttggta aaattgtca agg 33  
 25 <210> 128  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 30 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal E44V R  
 <400> 128  
 ccttgacaaa ttttaccaaa aaattcttta ctg 33  
 <210> 129  
 35 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 40 <223> halphal Q48T F  
 <400> 129  
 ttttgaaaa atttgaaca ggcctggata taggc 35  
 <210> 130  
 <211> 35

<212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 5 <223> halphal Q48T R  
 <400> 130  
 gcctatatcc aggcctgta caaattttc cgggg 35  
 <210> 131  
 <211> 33  
 10 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal N67E F  
 15 <400> 131  
 cagtatgcca atgagccaag agttgtgttt aac 33  
 <210> 132  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 20 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal N67E R  
 <400> 132  
 25 gttaaacaca actcttggt cattggcata ctg 33  
 <210> 133  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> homo Sapiens  
 30 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal V70I F  
 <400> 133  
 tgccaataat ccaagaattg tgttaact gaac 34  
 35 <210> 134  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 40 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal V70I R  
 <400> 134  
 gttcaagtta acacaattct tggattattg gca 33  
 <210> 135

<211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 5 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal V711 F  
 <400> 135  
 ccaataatcc aagagttatc ttaactga acac 34  
 <210> 136  
 10 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 15 <223> halphal V711 R  
 <400> 136  
 ggttcaagt taaagataac tottgatta ttgg 34  
 <210> 137  
 <211> 33  
 20 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal T76D F  
 25 <400> 137  
 ggtttaact tgaacgacta taaaccaa gaa 33  
 <210> 138  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 30 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal T76D R  
 <400> 138  
 35 ttcttggt ttatagtcgt tcaagtaaa cac 33  
 <210> 139  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 40 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal Y77F F  
 <400> 139  
 ttaactga acacattaa aaccaagaa gaa 33

<210> 140  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 5 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal Y77F R  
 <400> 140  
 ttcttcttg gttttaaag tgtcaagtt aaa 33  
 10 <210> 141  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 15 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal K78E F  
 <400> 141  
 aacttgaaca catatgaaac caaagaagaa atg 33  
 20 <210> 142  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 25 <223> halphal K78E R  
 <400> 142  
 catttctct ttggttcat atgtgtcaa gtt 33  
 <210> 143  
 <211> 33  
 30 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal Y93H F  
 35 <400> 143  
 tccagacat cccaacatgg tggggacctc aca 33  
 <210> 144  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 40 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal Y93H R  
 <400> 144

5           tgtgagggcc ccaccatggt gggatgtctg gga           33  
             <210> 145  
             <211> 39  
             <212> ADN  
             <213> Homo Sapiens  
             <220>  
             <221> rasgo\_misc  
             <223> halphal Y93F F  
             <400> 145  
 10          acatgggaga catcccaatt tgggggggac ctcaaac           39  
             <210> 146  
             <211> 39  
             <212> ADN  
             <213> Homo Sapiens  
 15          <220>  
             <221> rasgo\_misc  
             <223> halphal Y93F R  
             <400> 146  
 20          gtttgtgagg tccccaccaa attgggatgt ctcccatgt           39  
             <210> 147  
             <211> 33  
             <212> ADN  
             <213> Homo Sapiens  
             <220>  
 25          <221> rasgo\_misc  
             <223> halphal Q105E F  
             <400> 147  
 30          ttcggagcaa ttgaatatgc aagaaaatat gcc           33  
             <210> 148  
             <211> 33  
             <212> ADN  
             <213> Homo Sapiens  
             <220>  
             <221> rasgo\_misc  
 35          <223> halphal Q105E R  
             <400> 148  
 40          ggcatatfff cttgcatatt caattgctcc gaa           33  
             <210> 149  
             <211> 39  
             <212> ADN  
             <213> Homo Sapiens  
             <220>  
             <221> rasgo\_misc  
             <223> halphal A114Q F

<400> 149  
 aaatatgcct attcacaagc ttctggtggg cgacgaagt 39  
 <210> 150  
 <211> 39  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal A114Q R  
 10 <400> 150  
 actctgctgc ccaccagaag ctgtgaata ggcataatt 39  
 <210> 151  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 15 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal A115T F  
 20 <400> 151  
 aaatatgcct attcagcaac ttctggtggg cgacgaagt 39  
 <210> 152  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 25 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal A115T R  
 <400> 152  
 actctgctgc ccaccagaag ttgctgaata ggcataatt 39  
 30 <210> 153  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 35 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal A115Q F  
 <400> 153  
 aaatatgcct attcagcaca gtctggtggg cgacgaagt 39  
 <210> 154  
 40 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc

<223> halphal A115Q R  
 <400> 154  
 acttcgtcgc ccaccagact gtgctgaata ggcataatt 39  
 <210> 155  
 5 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 10 <223> halphal R165D F  
 <400> 155  
 gttcttgggt acttaaacga caacgccctt gatactaaa 39  
 <210> 156  
 <211> 39  
 15 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal R165D R  
 20 <400> 156  
 tttagtatca agggcgttgt cgtttaagta cccaagaac 39  
 <210> 157  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 25 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal N166D F  
 <400> 157  
 30 ctgggtact taaacagga cggccttgat actaaaaat 39  
 <210> 158  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 35 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal N166D R  
 <400> 158  
 atttttagta tcaaggcgt ccctgttaa gtaccaag 39  
 40 <210> 159  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>

ES 2 541 302 T3

<221> rasgo\_misc  
 <223> halphal E195W F  
 <400> 159  
 ttcaatgtgt ctgattgggc agctctacta gaaaaggctg      40  
 5  
 <210> 160  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 10  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal E195W R  
 <400> 160  
 cagccttttc tagtagagct gcccaatcag acacattgaa      40  
 15  
 <210> 161  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 20  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal K40D F  
 <400> 161  
 atccttggga tgtagtagac aatttttgg aaaaattt      38  
 25  
 <210> 162  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 30  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal K40D R  
 <400> 162  
 aaatfttcc aaaaaattgt ctactgcatc ccaaggat      38  
 35  
 <210> 163  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal R69D F  
 <400> 163  
 40  
 cagtatgcca ataatccaga cggtgtgttt aactgaac      39  
 <210> 164  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens

<220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal R69D R  
 <400> 164  
 5 gttcaagtta aacacaacgt ctggattatt ggcatactg 39  
 <210> 165  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 10 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal N73D F  
 <400> 165  
 aatccaagag ttgtgttga cttgaacaca tataaa 36  
 15 <210> 166  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 20 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal N73D R  
 <400> 166  
 tttatatgtg ttcaagtcaa acacaactct tggatt 36  
 25 <210> 167  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 30 <223> halphal Q89H F  
 <400> 167  
 atgattgtag caacatccca cacatcccaa tatggtggg 39  
 <210> 168  
 <211> 39  
 35 <212> ADN  
 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> halphal Q89H R  
 40 <400> 168  
 atgattgtag caacatccca cacatcccaa tatggtggg 39  
 <210> 169  
 <211> 40  
 <212> ADN

ES 2 541 302 T3

<213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> malphal H93Y F  
 5 <400> 169  
 cacatctgag acgcgccaat atggtgggga cctcacaac 40  
 <210> 170  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 10 <213> Homo Sapiens  
 <220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> malphal H93Y R  
 <400> 170  
 15 gttgtgagg tcccacat attggcgcgt ctcatgtg 40  
 <210> 171  
 <211> 216  
 <212> PRT  
 <213> Macaca fascicularis  
 20 <220>  
 <221> RASGO\_MISC  
 <223> Cynomologus  
 <400> 171  
 Ser Pro Asp Phe Gln Leu Ser Ala Ser Phe Ser Pro Ala Thr Gln Pro  
 1 5 10 15  
 Cys Pro Ser Leu Ile Asp Val Val Val Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser  
 20 25 30  
 Ile Tyr Pro Trp Asp Ala Val Asp Asn Phe Leu Glu Lys Phe Val Gln  
 35 40 45  
 Gly Leu Asp Ile Gly Pro Thr Lys Thr Gln Val Gly Leu Ile Gln Tyr  
 50 55 60

ES 2 541 302 T3

Ala Asn Asn Pro Arg Val Val Phe Asn Leu Asn Thr Tyr Lys Thr Lys  
65 70 75 80

Glu Glu Met Ile Val Ala Thr Ser Gln Thr Ser Gln Tyr Gly Gly Asp  
85 90 95

Leu Thr Asn Thr Phe Gly Ala Ile Gln Tyr Ala Arg Lys Tyr Ala Tyr  
100 105 110

Ser Ala Ala Ser Gly Gly Arg Arg Ser Ala Thr Lys Val Met Val Val  
115 120 125

Val Thr Asp Gly Glu Ser His Asp Gly Ser Met Leu Lys Ala Val Ile  
130 135 140

Asp Gln Cys Asn His Asp Asn Ile Leu Arg Phe Gly Ile Ala Val Leu  
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Asn Arg Asn Ala Leu Asp Thr Lys Asn Leu Ile Lys Glu  
165 170 175

Ile Lys Ala Ile Ala Ser Ile Pro Thr Glu Arg Tyr Phe Phe Asn Val  
180 185 190

Ser Asp Glu Ala Ala Leu Leu Glu Lys Ala Gly Thr Leu Gly Glu Gln  
195 200 205

Ile Phe Ser Ile Glu Gly Thr Val  
210 215

<210> 172

<211> 216

<212> PRT

5

<213> Macaca mulatta

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> Rhesus

<400> 172

Ser Pro Asp Phe Gln Leu Ser Ala Ser Phe Ser Pro Ala Thr Gln Pro  
1 5 10 15

10

Cys Pro Ser Leu Ile Asp Val Val Val Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser  
20 25 30

ES 2 541 302 T3

Ile Tyr Pro Trp Asp Ala Val Lys Asn Phe Leu Glu Lys Phe Val Gln  
 35 40 45

Gly Leu Asp Ile Gly Pro Thr Lys Thr Gln Val Gly Leu Ile Gln Tyr  
 50 55 60

Ala Asn Asn Pro Arg Val Val Phe Asn Leu Asn Thr Tyr Lys Thr Lys  
 65 70 75 80

Glu Glu Met Ile Val Ala Thr Ser Gln Thr Ser Gln Tyr Gly Gly Asp  
 85 90 95

Leu Thr Asn Thr Phe Gly Ala Ile Gln Tyr Ala Arg Lys Tyr Ala Tyr  
 100 105 110

Ser Ala Ala Ser Gly Gly Arg Arg Ser Ala Thr Lys Val Met Val Val  
 115 120 125

Val Thr Asp Gly Glu Ser His Asp Gly Ser Met Leu Lys Ala Val Ile  
 130 135 140

Asp Gln Cys Asn His Asp Asn Ile Leu Arg Phe Gly Ile Ala Val Leu  
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Asn Arg Asn Ala Leu Asp Thr Lys Asn Leu Ile Lys Glu  
 165 170 175

Ile Lys Ala Ile Ala Ser Ile Pro Thr Glu Arg Tyr Phe Phe Asn Val  
 180 185 190

Ser Asp Glu Ala Ala Leu Leu Glu Lys Ala Gly Thr Leu Gly Glu Gln  
 195 200 205

Ile Phe Ser Ile Glu Gly Thr Val  
 210 215

<210> 173

<211> 1435

<212> ADN

5 <213> Homo Sapiens

<220>

<221> rasgo\_misc

<223> Cadena Pesada de hvH14.0 IgG4

<220>

10 <221> CDS

<222> (22)..(1416)

<400> 173

ES 2 541 302 T3

tctcgagaag cttccaccat g	gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg	51
	Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu	
	1 5 10	
ctg ctc tgg gtt cca ggt tcc act gga cag gtg cag ttg cag gag tca	99	
Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser		
	15 20 25	
ggc cct ggc ctg gtg aag ccc agc gag acc ctg agc ctg acc tgt acc	147	
Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr		
	30 35 40	
gtc tct gga ttt agc tta acc aac tat ggc atc cac tgg ata cgc cag	195	
Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Ile His Trp Ile Arg Gln		
	45 50 55	
cct cca ggc aag ggc ctg gag tgg ctg ggc gtg ata tgg gct cgc ggc	243	
Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly		
	60 65 70	
ttc aca aac tat aac agc gct ctc atg tcc cgc gtg acc atc agc aag	291	
Phe Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys		
	75 80 85 90	
gac aac agc aag aac cag gtg agc ctg aag ctg agc agc gtg acc gcc	339	
Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala		
	95 100 105	
gcg gac acc gcc gtg tac tac tgc gcc aga gcc aac gac ggg gtc tac	387	
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr		
	110 115 120	
tat gcc atg gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc agc tca	435	
Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	125 130 135	
gcg tcc acc aag ggc cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg	483	
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg		
	140 145 150	
agc acc tcc gag agc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac	531	
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
	155 160 165 170	
ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc	579	
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
	175 180 185	
ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc	627	
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
	190 195 200	
ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acg aag acc	675	
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr		
	205 210 215	
tac acc tgc aac gta gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag	723	
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
	220 225 230	

ES 2 541 302 T3

aga gtt gag tcc aaa tat ggt ccc cca tgc cca tca tgc cca gca cct 771  
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
 235 240 245 250

gag ttc ctg ggg gga cca tca gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag 819  
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 255 260 265

gac act ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg 867  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 270 275 280

gac gtg agc cag gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat 915  
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 285 290 295

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc 963  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 300 305 310

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac 1011  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 315 320 325 330

tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc 1059  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 335 340 345

ccg tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga 1107  
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 350 355 360

gag cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cag gag gag atg acc aag 1155  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 365 370 375

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac 1203  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 380 385 390

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag 1251  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 395 400 405 410

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc 1299  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 415 420 425

agg cta acc gtg gac aag agc agg tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca 1347  
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 430 435 440

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac aca cag aag agc 1395  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 445 450 455

ctc tcc ctg tct ctg ggt aaa tgataggatc cgcgccgc 1435  
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 460 465

<210> 174

<211> 465

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 174

ES 2 541 302 T3

Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys  
 20 25 30  
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu  
 35 40 45  
 Thr Asn Tyr Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60  
 Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Ala Leu Met Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln  
 85 90 95  
 Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr  
 100 105 110  
 Tyr Cys Ala Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp  
 115 120 125  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 130 135 140  
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr  
 145 150 155 160  
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 165 170 175  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 180 185 190  
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 195 200 205

ES 2 541 302 T3

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp  
 210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr  
 225 230 235 240

Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro  
 245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp  
 275 280 285

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
 305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys  
 340 345 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 355 360 365

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys  
 420 425 430

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
 450 455 460

Lys  
 465

<210> 175

<211> 1435

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

ES 2 541 302 T3

<220>  
 <221> rasgo\_misc  
 <223> Cadena Pesada de hvH12.0 IgG4  
 <220>  
 5 <221> CDS  
 <222> (22)..(1416)  
 <400> 175

tctc	gagaag	cttccac	cat	g	gag	aca	gac	aca	ctc	ctg	cta	tgg	gta	ctg	51	
					Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu		
					1				5					10		
ctg	ctc	tgg	ggt	cca	ggt	tcc	act	gga	cag	gtg	cag	ttg	cag	gag	tca	99
Leu	Leu	Trp	Val	Pro	Gly	Ser	Thr	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	
				15					20					25		
ggc	cct	ggc	ctg	gtg	aag	ccc	agc	gag	acc	ctg	agc	ctg	acc	tgt	acc	147
Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	
			30					35					40			
gtc	tct	gga	ttt	agc	tta	acc	aac	tat	ggc	atc	cac	tgg	ata	cgc	cag	195
Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Tyr	Gly	Ile	His	Trp	Ile	Arg	Gln	
		45					50					55				
cct	cca	ggc	aag	ggc	ctg	gag	tgg	ctg	ggc	gtg	ata	tgg	gct	cgc	ggc	243
Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Arg	Gly	
		60				65					70					
ttc	aca	aac	tat	aac	agc	gct	ctc	atg	tcc	cgc	ctg	acc	atc	agc	aag	291
Phe	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	
		75			80					85					90	
gac	aac	agc	aag	aac	cag	gtg	agc	ctg	aag	ctg	agc	agc	gtg	acc	gcc	339
Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	
				95					100					105		
gcg	gac	acc	gcc	gtg	tac	tac	tgc	gcc	aga	gcc	aac	gac	ggg	gtc	tac	387
Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ala	Asn	Asp	Gly	Val	Tyr	
			110					115					120			
tat	gcc	atg	gac	tac	tgg	ggc	cag	gga	acc	ctg	gtc	acc	gtc	agc	tca	435
Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
		125					130					135				

ES 2 541 302 T3

gcg tcc acc aag ggc cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg 140 145 150	483
agc acc tcc gag agc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr 155 160 165 170	531
ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser 175 180 185	579
ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 190 195 200	627
ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acg aag acc Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr 205 210 215	675
tac acc tgc aac gta gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 220 225 230	723
aga gtt gag tcc aaa tat ggt ccc cca tgc cca tca tgc cca gca cct Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro 235 240 245 250	771
gag ttc ctg ggg gga cca tca gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 255 260 265	819
gac act ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 270 275 280	867
gac gtg agc cag gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp 285 290 295	915
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 300 305 310	963
aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 315 320 325 330	1011
tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu 335 340 345	1059
ccg tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 350 355 360	1107
gag cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cag gag gag atg acc aag Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys 365 370 375	1155

ES 2 541 302 T3

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac 1203  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 380 385 390

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag 1251  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 395 400 405 410

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc 1299  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 415 420 425

agg cta acc gtg gac aag agc agg tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca 1347  
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 430 435 440

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac aca cag aag agc 1395  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 445 450 455

ctc tcc ctg tct ctg ggt aaa tgataggatc cgcggccgc 1435  
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 460 465

<210> 176

<211> 465

<212> PRT

5 <213> Homo Sapiens

<400> 176

Glu Thr Asp Thr Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly  
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys  
 20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu  
 35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Ser  
 65 70 75 80

Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln  
 85 90 95

Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr  
 100 105 110

ES 2 541 302 T3

Tyr Cys Ala Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp  
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr  
 145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp  
 210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr  
 225 230 235 240

Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro  
 245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp  
 275 280 285

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
 305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys  
 340 345 350

ES 2 541 302 T3

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 355 360 365

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys  
 420 425 430

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
 450 455 460

Lys  
 465

<210> 177

<211> 744

<212> ADN

5 <213> Homo Sapiens

<220>

<221> rasgo\_misc

<223> Cadena ligera de VL10.0Q

<220>

10 <221> CDS

<222> (22)..(720)

<400> 177

ctatctcgag aagcttcac c atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta	51
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val	
1 5 10	
ctg ctg ctc tgg gtt cca ggt tcc act gga gac ttc gtg atg acc cag	99
Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Phe Val Met Thr Gln	
15 20 25	
tct cca gca ttc ctg agc gtg acc ccc ggc gag aag gtg acc atc acc	147
Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr	
30 35 40	

ES 2 541 302 T3

tgc agc gcc caa tca agc gtg aac tac att cac tgg tac cag cag aag	195
Cys Ser Ala Gln Ser Ser Val Asn Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys	
45 50 55	
ccc gac cag gcc ccc aag aaa ttg atc tat gac act tcc aag ctg gcc	243
Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala	
60 65 70	
agc ggc gtg ccc agc cgc ttc agc ggc agc ggc agc ggc acc gac tac	291
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr	
75 80 85 90	
acc ttc acc atc agc agc ctg gag gcc gag gac gct gcc acc tat tac	339
Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr	
95 100 105	
tgc cag cag tgg acc act aac cca ctg acc ttc ggc cag ggc acc aag	387
Cys Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gln Thr Lys	
110 115 120	
gtc gaa atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg	435
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	
125 130 135	
cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg	483
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	
140 145 150	
ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat	531
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp	
155 160 165 170	
aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac	579
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp	
175 180 185	
agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa	627
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys	
190 195 200	
gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag	675
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln	
205 210 215	
ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt	720
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
220 225 230	
tgataggatc cgcggccgca tagg	744
<210> 178	
<211> 233	
<212> PRT	
<213> Homo Sapiens	
<400> 178	
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro	
1 5 10 15	

5

ES 2 541 302 T3

Gly Ser Thr Gly Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser  
 20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Gln Ser Ser  
 35 40 45

Val Asn Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys  
 50 55 60

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

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser  
 85 90 95

Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Thr  
 100 105 110

Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
 145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
 195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
 210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 179

<211> 1460

<212> ADN

5 <213> Homo Sapiens

<220>

<221> rasgo\_misc

<223> Cadena Pesada de h2206-VH19 IgG1 (DANS); Posiciones -24 a -5 es la secuencia líder; Posición -4 a -1 son aminoácidos extra; DANS en las posiciones -4 a -1 es suprimido preferiblemente

10 <220>

<221> CDS

<222> (22)..(1440)

ES 2 541 302 T3

<220>

<221> mat\_péptido

<222> (94)..(1440)

<400> 179

ataggctagc ctcgagccac c	atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta	51
	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val	
	-20 -15	
ctg ctg ctc tgg gtt cca ggt tcc act gga gac gcg aat tca cag gtg	99	
Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ala Asn Ser Ser Gln Val		
-10 -5 -1 1		
cag ttg cag gag tca ggc cct ggc ctg gtg aag ccc agc gag acc ctg	147	
Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu		
5 10 15		
agc ctg acc tgt acc gtc tct gga ttt agc tta acc aac tat ggc atc	195	
Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Ile		
20 25 30		
cac tgg ata cgc cag cct cca ggc aag ggc ctg gag tgg ctg ggc gtg	243	
His Trp Ile Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val		
35 40 45 50		
ata tgg gct cgc ggc ttc aca aac tat aac agc gct ctc atg tcc cgc	291	
Ile Trp Ala Arg Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg		
55 60 65		
gtg acc atc agc aag gac aac agc aag aac cag gtg agc ctg aag ctg	339	
Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu		
70 75 80		
agc agc gtg acc gcc gcg gac acc gcc gtg tac tac tgc gcc aga gcc	387	
Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala		
85 90 95		
aac gac ggg gtc tac tat gcc atg gac tac tgg ggc cag gga acc ctg	435	
Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
100 105 110		
gtc acc gtc agc tca gcg tcg acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg	483	
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu		
115 120 125 130		

5

ES 2 541 302 T3

gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys 135 140 145	531
ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tca tgg aac tca Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser 150 155 160	579
ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser 165 170 175	627
tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser 180 185 190	675
ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn 195 200 205 210	723
acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His 215 220 225	771
aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val 230 235 240	819
ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr 245 250 255	867
cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu 260 265 270	915
gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys 275 280 285 290	963
aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser 295 300 305	1011
gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys 310 315 320	1059
tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile 325 330 335	1107
tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro 340 345 350	1155
cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu 355 360 365 370	1203

ES 2 541 302 T3

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat 1251  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 375 380 385  
 ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc 1299  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 390 395 400  
 gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg 1347  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 405 410 415  
 tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg 1395  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 420 425 430  
 cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa 1440  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445  
 tgataagcgg ccgcttcct 1460  
 <210> 180  
 <211> 473  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 <400> 180  
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 -20 -15 -10  
 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Asn Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly  
 -5 -1 1 5  
 Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val  
 10 15 20  
 Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Pro  
 25 30 35 40  
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly Phe  
 45 50 55  
 Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp  
 60 65 70  
 Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala  
 75 80 85  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr  
 90 95 100

5

ES 2 541 302 T3

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
 105 110 115 120

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser  
 125 130 135

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
 140 145 150

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly  
 155 160 165

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu  
 170 175 180

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr  
 185 190 195 200

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys  
 205 210 215

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 220 225 230

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 235 240 245

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 250 255 260

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 265 270 275 280

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 285 290 295

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 300 305 310

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 315 320 325

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 330 335 340

ES 2 541 302 T3

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
345 350 355 360

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
365 370 375

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
380 385 390

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
395 400 405

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
410 415 420

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
425 430 435 440

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
445

<210> 181

<211> 469

<212> PRT

5

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> Cadena Pesada de hVH14.0 IgG1 [DANS-Suprimido]

<400> 181

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val  
20 25 30

Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser  
35 40 45

Leu Thr Asn Tyr Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly  
50 55 60

10

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly Phe Thr Asn Tyr Asn  
65 70 75 80

ES 2 541 302 T3

Ser Ala Leu Met Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn  
85 90 95

Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
305 310 315 320

ES 2 541 302 T3

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys  
 465

<210> 182

<211> 469

<212> PRT

5 <213> Homo Sapiens

<220>

<221> RASGO\_MISC

<223> Cadena Pesada de hVH12.0 IgG1 [DANS-suprimido]

<400> 182

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val  
 20 25 30

10 Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser



ES 2 541 302 T3

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys  
 465

<210> 183

<211> 24

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 183

His Asn Ser Ser Ser Trp Tyr Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 1 5 10 15

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 20

<210> 184

10 <211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 184



ES 2 541 302 T3

<223> Xaa en la posición 94 puede ser Phe o Tyr

<400> 185

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Xaa Xaa Tyr  
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met  
50 55 60

Ser Arg Xaa Thr Ile Ser Xaa Asp Xaa Ser Lys Asn Gln Xaa Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Xaa Cys Ala  
85 90 95

Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 186

5 <211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región VL humanizada

10 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> Xaa en la posición 1 puede ser Gin o Asp

<220>

15 <221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> Xaa en la posición 2 puede ser Phe o Val

<220>

<221> VARIANT

20 <222> (4)..(4)

<223> xaa en la posición 4 puede ser Leu o Met

<220>

<221> VARIANT

<222> (45)..(45)

25 <223> xaa en la posición 45 puede ser Lys o Leu

<220>

<221> VARIANT

<222> (46)..(46)

<223> xaa en la posición 46 puede ser Trp o Leu

<220>

<221> VARIANT

5

<222> (48)..(48)

<223> Xaa en la posición 48 puede ser Tyr o Lys

<220>

<221> VARIANT

<222> (70)..(70)

10

<223> Xaa en la posición 70 puede ser Tyr o Phe

<400> 186

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

15

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado que comprende:

(i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de (a) HCDR1 (GFSLTNYGIH, SEQ ID NO: 1), (b) HCDR2 (VIWARGFTNYNSALMS, SEQ ID NO: 2) y (c) HCDR3 (ANDGVYYAMDY, SEQ ID NO: 3); y

(ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de (a) una LCDR1 seleccionada entre SANSSVNYIH (SEQ ID NO: 4) o SAQSSVNYIH (SEQ ID NO: 112), (b) LCDR2 (DTSKLAS; SEQ ID NO: 5) y (c) LCDR3 (QQWTTNPLT, SEQ ID NO: 6).

2. El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 1, en donde (a) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 185, (b) la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 186, o (c) tanto (a) como (b).

3. El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 1, en donde (i) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 185 en la que (a) la posición 71 es Lys, (b) la posición 73 es Asn, (c) la posición 78 es Val, o (d) cualquier combinación de (a) - (c); (ii) la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 186 en la que (a) la posición 2 es Phe, (b) la posición 45 es Lys, (c) la posición 48 es Tyr, o (d) cualquier combinación de (a) - (c); o (iii) tanto (i) como (ii).

4. El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 1, en donde (a) la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre los SEQ ID NO: 70-79 y los SEQ ID NO: 109-111; (b) la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el SEQ ID NO: 41, los SEQ ID NO: 80-92 y el SEQ ID NO: 108; o (c) tanto (a) como (b).

5. El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 1, en donde la región variable de cadena pesada comprende adicionalmente una región FW4 que comprende la secuencia de aminoácidos WGQGTLVTSS (SEQ ID NO: 13).

6. El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 1, en donde la región variable de cadena ligera comprende adicionalmente una región FW4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 38).

7. El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo reconoce el dominio I de la integrina  $\alpha 2$  humana.

8. El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une a la integrina  $\alpha 2\beta 1$ .

9. El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une a un epítipo de la integrina  $\alpha 2$ , comprendiendo el epítipo:

(a) un residuo de Lys correspondiente a la posición 192 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 8 o la posición 40 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 11;

(b) un residuo de Asn correspondiente a la posición 225 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 8 o la posición 73 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 11;

(c) un residuo de Gln correspondiente a la posición 241 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 8 o la posición 89 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 11;

(d) un residuo de Tyr correspondiente a la posición 245 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 8 o la posición 93 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 11;

(e) un residuo de Arg correspondiente a la posición 317 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 8 o la posición 165 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 11;

(f) un residuo de Asn correspondiente a la posición 318 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 8 o la posición 166 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 11; o

(g) cualquier combinación de (a) a (f).

10. Un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado, en donde el anticuerpo se une a un epítipo de la integrina  $\alpha 2$ , comprendiendo el epítipo:
- (a) un residuo de Lys correspondiente a la posición 192 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 8 o la posición 40 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 11;
  - (b) un residuo de Asn correspondiente a la posición 225 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 8 o la posición 73 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 11;
  - (c) un residuo de Gln correspondiente a la posición 241 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 8 o la posición 89 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 11;
  - (d) un residuo Tyr correspondiente a la posición 245 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 8 o la posición 93 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 11;
  - (e) un residuo de Arg correspondiente a la posición 317 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 8 o la posición 165 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 11; y
  - (f) un residuo de Asn correspondiente a la posición 318 de la secuencia de aminoácidos de la integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 8 o la posición 166 de la secuencia de aminoácidos del dominio I de integrina  $\alpha 2$  mostrada en el SEQ ID NO: 11.
11. El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 1, que es un anticuerpo completo.
12. El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 1, que es un fragmento de anticuerpo.
13. El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 1 unido a una marca detectable.
14. El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 1 inmovilizado sobre una fase sólida.
15. El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo inhibe la unión de la integrina  $\alpha 2$  o  $\alpha 2\beta 1$  a un ligando de la integrina  $\alpha 2\beta 1$ .
16. El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 15, en donde el ligando de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  se selecciona entre colágeno, laminina, Ecovirus-1, decorina, E-cadherina, metaloproteínasa I de la matriz (MMP-I), endorrepelinas, colectina y proteína del complemento Clq.
17. Un método para determinar si una muestra contiene integrina  $\alpha 2$ , integrina  $\alpha 2\beta 1$ , o ambas, que comprende poner en contacto la muestra con el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 1, y determinar si el anticuerpo se une a la muestra, siendo dicha unión una indicación de que la muestra contiene integrina  $\alpha 2$ , integrina  $\alpha 2\beta 1$ , o ambas.
18. Un kit que comprende el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 1 e instrucciones para su uso para detectar la proteína integrina  $\alpha 2$  o  $\alpha 2\beta 1$ .
19. Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2\beta 1$  humanizado de la reivindicación 1.
20. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 19.
21. Una célula anfitriona que comprende:
- (a) el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 19;
  - (b) el vector de acuerdo con la reivindicación 20; o
  - (c) cualquier combinación de (a) y (b).
22. Un procedimiento para producir un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado que comprende cultivar la célula anfitriona de la reivindicación 21 en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo.
23. El procedimiento de la reivindicación 22 que comprende adicionalmente recuperar el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la célula anfitriona.
24. El procedimiento de la reivindicación 23, en donde el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2\beta 1$  humanizado se

recupera del medio de cultivo de células anfitrionas.

25. Un método de escrutinio que comprende:

(a) detectar la unión de integrina  $\alpha 2$  o  $\alpha 2\beta 1$  a un anticuerpo que comprende la región VL del SEQ ID NO: 19 y la región VH del SEQ ID NO: 21 en presencia frente a ausencia de un anticuerpo de ensayo; y

(b) seleccionar el anticuerpo de ensayo si su presencia se correlaciona con la disminución de la unión de la integrina  $\alpha 2$  o  $\alpha 2\beta 1$  al anticuerpo que comprende la región VL del SEQ ID NO: 19 y la región VH del SEQ ID NO: 21.

26. El método de la reivindicación 25, en donde la integrina  $\alpha 2$  o  $\alpha 2\beta 1$  se inmoviliza sobre un soporte sólido.

27. Un método de escrutinio que comprende:

(a) detectar la unión de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  a colágeno en presencia de un anticuerpo de ensayo, en donde el anticuerpo de ensayo es un anticuerpo que se une a un dominio I de  $\alpha 2$ ;

(b) detectar la unión del anticuerpo de ensayo al dominio I de  $\alpha 2$  en presencia de iones  $Mg^{++}$ ;

(c) detectar la unión del anticuerpo de ensayo al dominio I de  $\alpha 2$  en presencia de iones  $Ca^{++}$ ;

(d) detectar la unión del anticuerpo de ensayo al dominio I de  $\alpha 2$  en presencia de los medios libres de cationes; y

(e) seleccionar el anticuerpo de ensayo si éste inhibe la unión de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  al colágeno y se une al dominio I de  $\alpha 2$  en presencia de iones  $Mg^{++}$  e iones  $Ca^{++}$  y medios libres de cationes.

28. Una composición que comprende el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

29. El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 10 para su uso en un método *in vivo* para inhibir la unión de leucocitos a colágeno que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de dicho anticuerpo para inhibir la unión de los leucocitos al colágeno.

30. Un método para dirigir una molécula, una composición o un complejo a un sitio **que se caracteriza por** la presencia de un ligando de integrina  $\alpha 2\beta 1$ , comprendiendo el método anclar o unir la molécula, composición o complejo al anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de la reivindicación 1.

31. El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 para su uso como medicamento.

32. El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 o la composición de la reivindicación 28 para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno asociado con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  seleccionado entre enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, una enfermedad asociada con angiogénesis anormal o mayor que la normal, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, reacciones a trasplantes, neuritis óptica, traumatismo de la médula espinal, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES), diabetes mellitus, esclerosis múltiple, síndrome de Reynaud, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, síndrome de Sjorgen, esclerodermia, diabetes de inicio juvenil, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedades cardiovasculares, psoriasis, cáncer, así como infecciones que inducen una respuesta inflamatoria.

33. El uso del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  seleccionado entre enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, una enfermedad asociada con angiogénesis anormal o mayor que la normal, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, reacciones a trasplantes, neuritis óptica, traumatismo de la médula espinal, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES), diabetes mellitus, esclerosis múltiple, síndrome de Reynaud, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, síndrome de Sjorgen, esclerodermia, diabetes de inicio juvenil, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedades cardiovasculares, psoriasis, cáncer, así como infecciones que inducen una respuesta inflamatoria.

34. El uso de acuerdo con la reivindicación 33, en donde el trastorno asociado a la integrina  $\alpha 2\beta 1$  se selecciona entre esclerosis múltiple, artritis reumatoide, neuritis óptica y traumatismo de la médula espinal.

35. El uso de acuerdo con la reivindicación 33, en donde el trastorno asociado a la integrina  $\alpha 2\beta 1$  no está asociado con (a) activación plaquetaria, (b) la agregación plaquetaria, (c) una disminución en el recuento de plaquetas circulantes, (d) complicaciones de sangrado, o (e) cualquier combinación de (a) a (d).

36. El uso de acuerdo con la reivindicación 33, donde el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  comprende una cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 174 o el SEQ ID NO: 176 y una cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 178.

5 37. El uso de acuerdo con la reivindicación 33, en donde el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo que comprende la región VL del SEQ ID NO: 19 y la región VH del SEQ ID NO: 21 a la integrina  $\alpha 2\beta 1$  humana o el dominio I de la misma.

38. El uso de acuerdo con la reivindicación 34, en donde la esclerosis múltiple se **caracteriza por** la recaída.

10 39. El uso de acuerdo con la reivindicación 33, en donde el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  inhibe la unión de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  a colágeno y no es un mimético de ligando.

15 40. Una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  seleccionado entre enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, una enfermedad asociada con angiogénesis anormal o mayor que la normal, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, reacciones a trasplantes, neuritis óptica, traumatismo de la médula espinal, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES), diabetes mellitus, esclerosis múltiple, síndrome de Reynaud, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, síndrome de Sjorgen, esclerodermia, diabetes de inicio juvenil, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedades cardiovasculares, psoriasis, cáncer así como infecciones que inducen una respuesta inflamatoria, comprendiendo la composición el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables.

20 41. La composición para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 40, en donde el trastorno asociado a integrina  $\alpha 2\beta 1$  se selecciona entre esclerosis múltiple, artritis reumatoide, neuritis óptica y traumatismo de la médula espinal.

25 42. Un paquete que comprende el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 2$  humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 o la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 40 o 41 junto con instrucciones para el tratamiento de un trastorno asociado a integrina  $\alpha 2\beta 1$ .



