

19
α



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 277**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.12.2008** **E 08867627 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016** **EP 2236605**

54 Título: **Anticuerpo anti-integrina α9 de ser humano**

30 Prioridad:

28.12.2007 JP 2007340203

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

12.09.2016

73 Titular/es:

**THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH
INSTITUTE (100.0%)
1-6-1 Okubo, Kita-ku
Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8568, JP**

72 Inventor/es:

**TORIKAI, MASAHARU;
ISHIKAWA, DAISUKE;
NAKASHIMA, TOSHIHIRO;
HIGUCHI, HIROFUMI;
SAKAI, FUMIHIKO;
YAMAMOTO, NOBUCHIKA;
FUJITA, HIROTADA y
TAGUCHI, KATSUNARI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 582 277 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano y una aplicación de este. Específicamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano que se une a una región de bucle de proteína integrina $\alpha 9$ de ser humano y ratón designada LI para inhibir la adhesión celular dependiente de integrina $\alpha 9$, y para exhibir la acción supresora sobre artritis, y un fragmento del anticuerpo, así como en el diagnóstico, prevención o tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, enfermedades inmunes tales como alergias y rechazo de injertos, y otras varias enfermedades implicadas por integrina $\alpha 9$ en su patogénesis, usando el anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Técnica previa

15 Integrina, una glicoproteína de superficie celular, es una molécula de adhesión que funciona principalmente como un receptor para la adhesión celular a matrices extracelulares (colágeno, laminina y similares) y miembros de la familia de inmunoglobulinas (ICAM-1, VCAM-1 y similares), y media la transducción de señales desde matrices extracelulares. Por lo tanto, las células reciben señales de las matrices extracelulares, y se induce proliferación, proliferación, muerte celular y similar. La integrina es un heterodímero que consiste en dos subunidades cadena α y cadena β ; existen diferentes cadenas α y cadenas β que aparecen en una amplia variedad de combinaciones, y existen 24 miembros de la superfamilia de integrina. Los ratones con inactivación de integrina son mortales o están enfermos sin considerar qué subunidad falta, lo que sugiere que las integrinas individuales son necesarias para el mantenimiento de la vida. Entonces, la integrina, que transmite información o condiciones ambientales a las células para estimular sus respuestas, se cree que funciona en todas las situaciones de fenómenos biológicos, y para mediar un amplio espectro de condiciones patológicas.

25 Como tal, la integrina es indispensable para la supervivencia de organismos, y se cree que cumple una función aun en estados enfermos; se reportaron algunos casos en los que su inhibición ayuda a mejorar las condiciones patológicas. Por ejemplo, un inhibidor de integrina específica de plaquetas $\alpha 11b\beta 3$ fue aprobado como un fármaco terapéutico para restenosis PCTA conocido como abciximab (nombre comercial: ReoPro; Eli Lilly). Natalizumab (nombre comercial: Antegren; ELAN Company), un inhibidor $\alpha 4\beta 1$ (VLA4), fue aprobado como un fármaco terapéutico para esclerosis múltiple.

30 El inhibidor $\alpha 4\beta 3$ Vitaxin (MEDIMMUNE Company) está en desarrollo en estudios clínicos para su acción inhibidora de neovascularización, acción inhibidora de activación de osteoclastos y similares.

35 La integrina $\alpha 4\beta 1$ se expresa en macrófagos, células NKT, células dendríticas, y neutrófilos, y según se dice cumple funciones importantes en la infiltración y adhesión de estas células inflamatorias, resorción ósea y similares. Recientemente, se ha reportado que la integrina $\alpha 4\beta 1$ está implicada en la formación de osteoclastos, y se sugirió su implicancia en la destrucción ósea (Documento no patentado 1). Ligandos conocidos de estos incluyen osteopontina truncada (OPN de extremo N), VCAM-1, Tenascina-C y similares. Clínicamente, los niveles elevados significativamente de integrina $\alpha 4\beta 1$ se observaron en los tejidos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide (Documento no patentado 2).

40 Entonces, un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a proteína integrina $\alpha 9$ para actuar para inhibir la adhesión celular dependiente de integrina $\alpha 9$, si se desarrolla, sería útil en el diagnóstico, prevención o tratamiento de varias enfermedades implicadas por la integrina $\alpha 9$ en su patogénesis.

45 Anticuerpos que se ha dado a conocer que exhiben acción inhibidora de función sobre integrina $\alpha 9$ de ser humano son el anticuerpo monoclonal de ratón Y9A2 (Documento no patentado 3), y 1K11, 24111, 21C5 y 25B6, que también son anticuerpos monoclonales de ratón (Documento de patente 1). Aunque los resultados experimentales in vitro mostraron que estos anticuerpos son capaces de suprimir la adhesión celular dependiente de integrina $\alpha 9$ de ser humano, no son adecuados para su uso en experimentos para evaluaciones in vivo de efectos farmacológicos y similares porque no exhiben reactividad cruzada con integrina $\alpha 9$ de ratón y rata.

50 Anticuerpos que se ha dado a conocer que exhiben acción inhibidora de función sobre integrina $\alpha 9$ de ratón son anticuerpos monoclonales de hámster 11L2B, 12C4'58, 18R18D y 55A2C (Documento de patente 1). Los resultados experimentales in vitro mostraron que estos anticuerpos son capaces de suprimir funciones de $\alpha 9$ de ratón, tal como adhesión celular, y los resultados experimentales in vivo mostraron que 11L2B tiene un efecto terapéutico sobre hepatitis; sin embargo, su reactividad contra integrina $\alpha 9$ de ser humano no se confirmó, por lo que es imposible aplicar estos anticuerpos al tratamiento o prevención de enfermedades humanas.

55 En función de esta situación, aun si se adquiere un anticuerpo de integrina $\alpha 9$ anti-humano y se evalúa funcionalmente in vitro, es difícil evaluar el efecto farmacológico del anticuerpo salvo que exhiba reactividad cruzada con integrina $\alpha 9$ de ratón o rata, dado que los modelos patológicos disponibles de varias enfermedades inflamatorias son para la mayoría sistemas que usan un ratón o rata. Aun si un anticuerpo de integrina $\alpha 9$ anti-ratón se adquiere y

evalúa farmacológicamente usando un sistema de modelo patológico in vivo, y se sabe que es terapéutica o profilácticamente eficaz, es imposible aplicar el anticuerpo como un anticuerpo farmacéutico para condiciones patológicas humanas salvo que exhiba reactividad cruzada contra integrina $\alpha 9$ humana.

5 Siempre que un anticuerpo monoclonal $\alpha 9$ anti-humano tal como Y9A2 se desarrolla como un anticuerpo farmacéutico en función de datos de efecto farmacológico obtenidos usando un anticuerpo de integrina $\alpha 9$ anti-ratón, es necesario mucho trabajo para demostrar la equivalencia del anticuerpo usado para adquirir los datos farmacológicos y el anticuerpo en desarrollo. Por esta razón, se exige, por ejemplo, un anticuerpo que exhibe acción inhibidora sobre la función de integrina $\alpha 9$ de ratón e integrina $\alpha 9$ de ser humano; a juzgar por los principios, sin embargo, es difícil adquirir dicho anticuerpo cuando se usa un método convencional tal como uno que implica inmunización de ratón.

10 Aun si se desarrolla un anticuerpo monoclonal $\alpha 9$ anti-humano preparado por cualquier técnica que supera esta dificultad como un anticuerpo farmacéutico, el anticuerpo se reconoce y elimina como una materia extraña dada la alta inmunogenicidad de este cuando se administra a humanos, siempre que el anticuerpo sea un anticuerpo derivado de animal ni humano. Entonces, es difícil usar dicho anticuerpo como un fármaco terapéutico para una enfermedad.

15 Como una posible solución a este problema, un anticuerpo derivado no humano se puede humanizar usando una técnica de ingeniería de proteína; sin embargo, dado que contiene una porción de la secuencia derivada no humana, administración de múltiples dosis o administración a largo plazo puede provocar que un anticuerpo inhibe la actividad del anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ humanizado administrado para debilitar considerablemente su efecto, y aun provocar una seria reacción adversa. Además, la humanización por lo general resulta en actividad reducida, y un anticuerpo humanizado requiere un gran esfuerzo y costo para su construcción.

20 En función de esta situación para integrina $\alpha 9$, no hay casi información estructural sobre la estructura estérica, sitio de unión al ligando, epítipo de neutralización y similares; dicha información, si se obtiene, se espera que abra una vía de investigación de la integrina $\alpha 9$ y su aplicación en la práctica médica, y potencialmente genera un gran aparto.

25 Además, EP1840135 describe i.a. anticuerpos α humanizados que reconocen integrina $\alpha 9$ de ser humano o de murino. US2002/039745 describe anticuerpos de integrina $\alpha 9$ antagonística.

Documento de patente 1: WO 2006/075784 Documento no patentado 1: Journal of Bone and Mineral Research, 2006, 21: 1657-1665

Documento no patentado 2: The Journal of Clinical Investigation, 2005, 115: 1060-1067

30 Documento no patentado 3: Am. J. Respir. Cel.1 Mol. Biol., 1996, 15: 664-672

Descripción de la invención

Problemas a ser resueltos por la invención

35 Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ que exhibe reactividad específica para integrina $\alpha 9$ de ser humano e integrina $\alpha 9$ de ratón, y reconcilia seguridad y eficacia terapéutica, y proporcionar un medio profiláctico o terapéutico novedoso de varias enfermedades implicadas por integrina $\alpha 9$ en su patogénesis, por medio de acción antiinflamatoria potente y acción supresora de destrucción ósea del anticuerpo de integrina $\alpha 9$ de ser humano en función del bloqueo de la interacción entre integrina $\alpha 9$ y una pluralidad de ligandos de esta.

Medios para resolver los problemas

40 Los inventores de la presente triunfaron en la preparación de anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano y fragmento de anticuerpo que exhiben reactividad específica contra integrina $\alpha 9$ de ratón e integrina $\alpha 9$ de ser humano preparando una célula de expresión de integrina $\alpha 9$, y reacción de la célula directamente con una biblioteca de fago anticuerpo sobre la cual se muestra un anticuerpo humano. Además, los inventores descubrieron que el anticuerpo y fragmento de anticuerpo inhiben la adhesión celular dependiente de integrina $\alpha 9$, exhiben un efecto terapéutico sobre la pluralidad de modelos de artritis, y suprimen la diferenciación de osteoclastos en los modelos. Entonces los inventores demostraron que el anticuerpo y fragmento de anticuerpo reconcilian seguridad y eficacia terapéutica, y desarrollaron la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención comprende los siguientes aspectos 1) a 16) como métodos y sustancias útiles médica e industrialmente.

50 1) Un anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano o fragmento de anticuerpo que reconoce integrina $\alpha 9$ de ser humano e integrina $\alpha 9$ de ratón e inhibe la interacción entre los ligandos e integrinas $\alpha 9$.

2) El anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en 1) anteriormente, que reconoce un epítipo configurado principalmente por la región desde 104 Arg a 122 Asp de integrina $\alpha 9$ de ser humano (SEQ ID NO:36), y un epítipo

configurado principalmente por la región desde 105 Arg a 123 Asp de integrina $\alpha 9$ de ratón (SEQ ID NO:37).

- 3) El anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en 1) o 2) anteriormente, que tiene (a) regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada y (b) regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (CDR1, CDR2, CDR3), dichas regiones consisten en las secuencias de aminoácidos mostradas por los siguientes números de identificación de secuencias, respectivamente.
- 5 (a) Regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada CDR1 , CDR2, CDR3
 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4;
 SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15;
 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21;
 10 SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27; o
 SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33;
- (b) Regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera CDR1 , CDR2, CDR3
 SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9
- 4) El anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en 3) anteriormente, que tiene regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada CDR1 , CDR2, CDR3, dichas regiones consisten en las secuencias de aminoácidos mostradas por SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, y SEQ ID NO:33, respectivamente.
- 15 5) El anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en 1) o 2) anteriormente, que tiene una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por cualquiera de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:24, y SEQ ID NO:30, y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO:6.
- 20 6) El anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en 5) anteriormente, que tiene una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO:30.
- 7) El anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano descrito en cualquiera de 1) a 6) anteriormente, donde el anticuerpo es un anticuerpo completo.
- 25 8) El fragmento de anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano descrito en cualquiera de 1) a 6) anteriormente, donde el fragmento de anticuerpo es scFv o scFv-Fc.
- 9) Un gen que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en cualquiera de 1) a 8) anteriormente.
- 10) Un vector de expresión recombinante que comprende el gen descrito en 9) anteriormente.
- 11) Un transformante que incorpora el gen descrito en 9) anteriormente.
- 30 12) Un método para producir un anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano o fragmento de anticuerpo que permite el gen descrito en 9) anteriormente se exprese en un hospedador.
- 13) Un agente profiláctico o terapéutico para artritis reumatoide que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en cualquiera de 1) a 8) anteriormente.
- 35 14) Un método para prevenir o tratar artritis reumatoide en un sujeto, que comprende el paso de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en cualquiera de 1) a 8) anteriormente al sujeto.
- 15) Un uso del anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en cualquiera de 1) a 8) anteriormente en la producción de un agente profiláctico o terapéutico par artritis reumatoide.
- 16) El anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en cualquiera de
- 40 1) a 8) anteriormente para prevenir o tratar artritis reumatoide.

Efecto de la invención

45 El anticuerpo monoclonal humano de la presente invención y el fragmento de anticuerpo de este tiene una región variable de anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ derivado de ser humano y posee reactividad específica para integrina $\alpha 9$ de ser humano y ratón, actividad inhibidora contra adhesión celular dependiente de integrina $\alpha 9$, y acción supresora sobre artritis. Se descubrió que el epitopo de este es una región de bucle que no fue reportada en ninguna otra

familia de integrina (designada LI). Dado que el anticuerpo y fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente invención son anticuerpos humanos completos, se espera que encuentren nuevas aplicaciones como fármacos de diagnóstico, profilácticos o terapéuticos para varias enfermedades implicadas por la integrina $\alpha 9$.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La FIG. 1 es una representación gráfica que muestra la reactividad de un fago de expresión de scFc con $\alpha 9$ de ratón.
La FIG. 2 es una representación gráfica que muestra la reactividad de MA9-413 scFv con $\alpha 9$ de ratón.
La FIG. 3 es una representación gráfica que muestra el potencial inhibitor de MA9-413 scFv contra adhesión celular dependiente de $\alpha 9$ de ratón.
La FIG. 4 es una ilustración que muestra la estructura de un vector de expresión de scFv-Fc.
- 10 La FIG. 5 es una representación gráfica que muestra resultados de un análisis de la reactividad de MA9-413 scFv-Fc con $\alpha 9$ de ratón y $\alpha 9$ de ser humano por ELISA.
La FIG. 6 es una representación gráfica que muestra resultados de un análisis de la reactividad y especificidad de MA9-413 scFv-Fc con $\alpha 9$ de ratón y $\alpha 9$ de ser humano por citometría de flujo.
La FIG. 7 es una representación gráfica que muestra el potencial inhibitor de MA9-413 scFv-Fc contra adhesión celular dependiente de $\alpha 9$ de ratón y humana.
- 15 La FIG. 8 es una ilustración que muestra las secuencias de aminoácidos de los dominios de propelente β de regiones $\alpha 9$ y bucle estimados por modelado.
La FIG. 9 es una representación gráfica que muestra resultados de un análisis de la reactividad de MA9-413 scFv-Fc con regiones de bucle $\alpha 9$ alteradas y dominios de propelente β de $\alpha 9$ por citometría de flujo.
- 20 La FIG. 10 es una representación gráfica que muestra resultados de un análisis de la reactividad de MA9-413 scFv-Fc con regiones de bucle $\alpha 9$ alteradas y dominios de propelente β de $\alpha 9$ por ELISA.
La FIG. 11 es una representación gráfica que muestra el efecto supresor de MA9-413 scFv-Fc sobre artritis inducida por anticuerpo de colágeno de ratón.
- 25 La FIG. 12 es una representación gráfica que muestra el efecto supresor de MA9-413 scFv-Fc sobre artritis inducida por colágeno de ratón. ANM-2 es un nombre alternativo de MA9-413.
La FIG. 13 es una representación gráfica que muestra la supresión de diferenciación de osteoclastos por MA9-413 scFv-Fc en artritis inducida por anticuerpo de colágeno de ratón.
La FIG. 14 es una ilustración que muestra las secuencias de aminoácidos de MA9-413 alterado.
- 30 La FIG. 15 es una representación gráfica que muestra la reactividad de MA9-413 scFv alterado con $\alpha 9$ de ratón y $\alpha 9$ de ser humano.
La FIG. 16 es una representación gráfica que muestra la reactividad de MA9-413 scFv-Fc alterado con $\alpha 9$ de ratón y $\alpha 9$ de ser humano.
La FIG. 17 es una representación gráfica que muestra la acción inhibitor de competencia de MA9-413 alterado en la reactividad de MA9-413 con $\alpha 9$.
- 35 La FIG. 18 es una representación gráfica que muestra la reactividad de MA9-413 IgG alterado con $\alpha 9$ de ratón y $\alpha 9$ de ser humano.

Mejor forma para poner en práctica la invención

La presente invención se describe aquí en detalle.

- 40 Una biblioteca de fago de expresión de scFv se puede preparar como se describe a continuación. ADNc de cadena pesada (H) y cadena ligera (L) de inmunoglobulina se sintetiza por un método RT-PCR de linfocitos B de sangre periférica recogidos desde una pluralidad de voluntarios sanos. A continuación, amplificando las regiones variables de cadena H (VH) y regiones variables de cadena L (VL) con el uso de una combinación de de varios cebadores, y uniendo ambos con ADN enlazador, se prepara una biblioteca de genes scFv en función de una combinación aleatoria de VH ay VL derivada de linfocitos de los voluntarios sanos. Este gen scFv se puede integrar en un vector de fagémidos (por ejemplo, pCANTAB5E) para construir una biblioteca de fago de expresión de scFv que consiste en alrededor de 10^8 a 10^{11} clones de voluntarios sanos.
- 45

La preparación de integrina $\alpha 9$ que es un antígeno, se puede realizar como se describe a continuación.

Dado que la integrina $\alpha 9$ (de aquí en adelante, también se denomina simplemente " $\alpha 9$ ") es una proteína de membrana, es posible clonar el gen $\alpha 9$ y transfectar una célula cultivada con eso para expresar artificialmente el gen e la superficie de la célula cultivada. Se recomienda usar la biblioteca de ADNc o similar como plantilla para la clonación génica. Para expresar el gen en la superficie celular, una secuencia de señales debe estar presente normalmente en la porción de extremo N; por lo tanto, la secuencia de señales poseída intrínsecamente por $\alpha 9$ se puede usar, y una región génica que codifica $\alpha 9$ madura se puede unir con otra secuencia de señales. Con respecto al anticuerpo preparado, es necesario evaluar la especificidad de especie y similares para evaluar la aplicabilidad y potencial del anticuerpo, por lo que es conveniente que el gen sea adquirido para $\alpha 9$ de ser humano y $\alpha 9$ de ratón.

El gen $\alpha 9$ así adquirido, que comprende una secuencia de señales,

10 se clona en un vector de expresión, por ejemplo, el vector pcDNA3.1(-) (Invitrogen) y similares. Aquí, de las cadenas α de la familia de integrina, se sabe que $\alpha 4$ es más altamente homólogo a $\alpha 9$. Por esta razón, convenientemente, se recomienda que integrina $\alpha 4$, para su uso como control de $\alpha 9$, se someta a la misma operación y se clone en el vector de expresión.

15 El vector de expresión construido se transfiere a una célula cultivada tal como una célula CHO o célula SW480 por transfección usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y similares. Las células de expresión se pueden seleccionar por medio de un marcador de vector de expresión (neomicina y similares) y las células así obtenidas se pueden usar para posterior análisis y evaluaciones. Para las células de expresión, se recomienda que las células que exhiben alta expresión más establemente se obtengan realizando clonación tal como limitando dilución para proporcionar población celular homogénea.

20 A continuación se describe cómo preparar un anticuerpo. Cuando se pretende preparar un anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ y dirigir validación diana de $\alpha 9$, se recomienda que un anticuerpo monoclonal que posee actividad inhibidora de función sea adquirido primero con $\alpha 9$ de ratón como una diana y luego el anticuerpo se examine par determinar la presencia o ausencia de un efecto farmacológico usando un sistema de modelo patológico de ratón.

25 Primero, se describe la separación de un clon específico de una biblioteca de fago de expresión de scFv. Por ejemplo, esto se puede alcanzar mediante procedimientos que se muestran a continuación. Después de que la biblioteca anterior se hace reaccionar con células CHO y se hace la resta, se une a células CHO de expresión de $\alpha 9$ de ratón, recuperadas y concentradas, y se analiza un clon de fago de expresión de scFv anti- $\alpha 9$. El antígeno usado puede no ser la célula tal cual es, pero se puede preparar y usar una fracción de membrana o se puede purificar un antígeno a partir de una fracción de membrana y usarse.

30 Un scFv del clon así obtenido se prepara, y se verificar su reactividad con células que expresan $\alpha 9$. Como un método la expresión de scFv, scFv se puede expresar en, por ejemplo, Escherichia coli. En el caso de Escherichia coli, el scFv se puede expresar en un estado funcionalmente unido con un promotor útil de uso común, una secuencia de señales para secreción de anticuerpo y similares. Como ejemplos de los promotores, el promotor lacZ, promotor araB y similares se pueden mencionar. Como una secuencia de señales para secreción de scFv, se recomienda que la secuencia de señales pelB (J. Bacterio. R1987, 169: 4379-4383) se use cuando el scFv se expresa en el periplasma de Escherichia coli. Para la secreción en el sobrenadante de cultivo, la secuencia de señales de la proteína g3 de fago M13 también se puede usar.

35 El scFv expresado fuera de la célula se puede separar del hospedador y se puede purificar hasta homogeneidad. Por ejemplo, el scFv expresado usando el sistema pCANTABSE se puede purificar fácilmente en un corto período de tiempo por cromatografía de afinidad usando un anticuerpo anti-Etag porque tiene una secuencia Etag agregada a un extremo C de este. Además, el scFv también se puede purificar usando una combinación de métodos de separación de purificación de proteínas de uso común. Por ejemplo, combinando ultrafiltración, precipitación por sales, y cromatografías en columna tales como filtración por gel/intercambio de iones/cromatografía hidrofóbica, el anticuerpo se puede separar y purificar. El producto purificado se puede analizar para determinar la forma molecular por análisis de filtración por gel HPLC y similares.

45 Métodos para medir la actividad de unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo obtenidos para integrina $\alpha 9$, ELISA, FACS y similares están disponibles. Al usar ELISA por ejemplo, una muestra que contiene el anticuerpo o fragmento de anticuerpo deseado, por ejemplo, un sobrenadante de cultivo de Escherichia coli o anticuerpo purificado se agrega a una placa de 96 pocillos sobre la cual se inmovilizaron células de expresión de integrina $\alpha 9$ directamente o mediante un anticuerpo de captura. A continuación, un anticuerpo secundario como un anticuerpo anti-Etag, previamente marcado con una enzima tal como peroxidasa de rábano picante (HRP) o fosfatasa alcalina (AP), una sustancia fluorescente tal como isocianato de fluoresceína o rodamina, una sustancia radioactiva tal como ^{32}P o ^{125}I , una sustancia quimioluminiscente o similar, se agrega y se hace reaccionar, y la placa se lava, después de lo cual se agrega un reactivo de detección (en el caso de marcado de HRP, por ejemplo, sustrato de desarrollo de color TMB y similar) según sea necesario, y se mide la absorbancia, fluorescencia, intensidad, radioactividad, la cantidad de luminiscencia y similares, donde la actividad de unión al antígeno se puede evaluar.

Las secuencias base de ADN de VH y VL de los genes scFv del clon aislado se pueden determinar por el método de didesoxi y similar, y sus secuencias de aminoácidos se pueden estimar a partir de información de secuencia base de

ADN obtenida.

Además, está disponible, como un método para determinar si el clon separado posee actividad inhibidora de función contra $\alpha 9$, el siguiente método con adhesión celular dependiente de $\alpha 9$ como un índice, por ejemplo. La forma alterada de RAA (la secuencia RGD remplazada con RAA para suprimir la reacción con otras integrinas) de un OPN de extremo N (un fragmento de extremo N que resulta de truncar osteopontina con trombina), que es un ligando de $\alpha 9$, se inmoviliza en una placa, y se bloquea. Después de agregar varios anticuerpos, se agregan las células que expresan $\alpha 9$ y se incuban a 37°C durante 1 hora. Después de fijar las células y teñirlas usando violeta cristal y metanol, y lavarlas, el tinte en las células adheridas se extrae con Triton X-100, y su absorbancia de determina a una longitud de onda de 595 nm. Si se confirma así la acción supresora, se entiende que el anticuerpo posee actividad inhibidora contra $\alpha 9$.

Aquí, scFv es un fragmento de anticuerpo monovalente; se sabe que en algunos casos la afinidad o efecto inhibidor se mejora ampliamente por un efecto de avididad cuando scFv se reemplaza con un anticuerpo divalente de tipo IgG o de tipo scFv-Fc. Otro hecho conocido es que las formas moleculares de pesos moleculares relativamente grandes, tales como el tipo IgG o tipo scFv-Fc, tienen mejor estabilidad en el cuerpo y mayor semivida que las formas moleculares de pesos moleculares relativamente pequeños, tales como scFv.

Por esta razón, se recomienda, por ejemplo, que el clon separado se convierta en la forma molecular del tipo scFv-Fc y se evalúe como se describe a continuación. La región de gen scFv del clon separado se amplifica por PCR, y se inserta en un vector de expresión de proteína de fusión Fc de ratón o humano, por el cual se construye un vector de expresión scFv-Fc.

Como un ejemplo de dicho vector de expresión de proteína de fusión Fc de ratón o humano, se puede usar pFUSE-hlgI-Fc o pFUSE-hlgI-Fc (InvivoGen Company). En el vector, una secuencia líder que promueve la expresión secretora extracelular, el gen scFv, y la región de gen Fc de ratón o humano, se unieron y la expresión de estos se controla con varios promotores.

El vector de expresión scFv-Fc construido se transfecta a una célula cultivada tal como una célula CHO que usa Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y similares. Es posible realizar un cultivo de expansión usando un medio de selección que contiene un marcador de vector de expresión (neomicina y similares), recupera el sobrenadante de cultivo, y lo purifica por cromatografía de columna de Proteína A y similares. Se recomienda que el estándar de referencia purificado de scFv-Fc obtenido, como scFv, se analice por filtración en gen HPLC, ELISA, FACS o prueba de inhibición de adhesión celular dependiente de $\alpha 9$ y similares. En ELISA, la detección se puede realizar usando un anticuerpo IgG anti-ratón marcado con HRP y similares; en FACS, se puede realizar la detección usando un anticuerpo IgG anti-ratón marcado con FITC y similares. Se recomienda usar como anticuerpo de control Y9A2 (CHEMICON), un anticuerpo monoclonal de ratón contra $\alpha 9$ de ser humano.

Luego, se describe el análisis de epítipo de anticuerpo.

Si se identifica un epítipo de un clon de anticuerpo que posee actividad inhibidora de función, será posible aclarar un epítipo neutralizante de $\alpha 9$. El análisis de epítipo se puede realizar, por ejemplo, como se describe a continuación. Se construye una forma sustituida con aminoácido de $\alpha 9$, y se analiza la reactividad con el anticuerpo. Si se revela un cambio en la reactividad con el anticuerpo debido a sustitución de aminoácidos, se recomienda que el sitio sustituido pueda ser un epítipo del anticuerpo. Como ejemplos de métodos de sustitución de aminoácidos, están disponibles el intercambio de secuencias $\alpha 9$ de ser humano y $\alpha 9$ de ratón, el intercambio de secuencias $\alpha 9$ y $\alpha 4$, el remplazo de la secuencia $\alpha 9$ con Ala, y similares.

Dado que el dominio propelente β ubicado en el resto de extremo N de una región extracelular es, según se dice, el sitio de interacción con el ligando, que es un rasgo común de las cadenas α de la familia integrina (Science, 296, 151-155, 2002), parece probable que un epítipo neutralizante esté presente en esta región. Entonces, el dominio propelente β puede ser el sujeto de análisis.

Un documento de referencia que analiza el sitio de unión al ligando y epítipo neutralizante de cx4 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 7198-7203, 1997) presenta resultados que muestran que R2 y R4, de los restos de repetición denominados R1 a R5 en el dominio propelente β (que corresponden a la región bucle), son importantes para la unión al ligando, y que R2, R3a y R3c pueden convertirse en epítopos neutralizantes. A juzgar por estos hechos, parece probable que la región bucle sea un epítipo neutralizante.

Entonces, se puede realizar el análisis mientras se reduce la cobertura de dianas con regiones bucle en el dominio propelente β .

Si se encuentran disponibles a partir de los resultados del análisis finalizado, se pueden usar los datos sobre la especificidad del anticuerpo. Por ejemplo, si se observa una diferencia en la fuerza de reactividad contra $\alpha 9$ de ser humano y $\alpha 9$ de ratón, se cree que la secuencia de aminoácidos de la región de epítipo puede diferir en alguna medida entre humanos y ratones. Dado que $\alpha 9$ de ser humano y $\alpha 9$ de ratón son altamente homólogos entre sí, la cobertura de sitios candidato se puede reducir además para permitir un análisis eficaz, siempre que un sitio cuya secuencia de aminoácidos difiere entre $\alpha 9$ de ser humano y $\alpha 9$ de ratón, se seleccione entre diferentes sitios

candidato a ser analizados.

5 También se recomienda que una proteína fluorescente tal como EGFP se use como marcador para confirmar la expresión de un $\alpha 9$ de ser humano alterado. Por ejemplo, siempre que se construya un conjugado $\alpha 9$ -EGFP con EGFP fusionado con el extremo C (región citoplasmática) de $\alpha 9$, la expresión de $\alpha 9$ se puede confirmar por fluorescencia, y se puede evaluar la reactividad del anticuerpo en proporción con la cantidad expresada, para que sea posible una evaluación más cuantitativa.

10 Dicha forma sustituida de aminoácido de $\alpha 9$ o conjugado $\alpha 9$ -EGFP se construye por mutagénesis dirigida al sitio y similar. Se clonan en un vector de expresión, y cada uno se transfiere a una célula cultivada tal como una célula CHO. Para una población celular expresada de forma transitoria o expresada de forma estable, la expresión de $\alpha 9$ de tipo salvaje o de tipo alterado (o $\alpha 9$ -EGFP) y la reactividad de esta con el anticuerpo se puede evaluar usando ELISA o FACS y similares. Por ejemplo, cuando varias formas sustituidas de aminoácido se construyen en función de $\alpha 9$ -EGFP, y sus reactividades con el anticuerpo se analizan por FACS, las reactividades con el anticuerpo por cantidad unitaria expresada se puede discutir en términos de la expresión de $\alpha 9$ -EGFP indicada en el eje lateral, y la reactividad con el anticuerpo indicado en el eje vertical.

15 Si el análisis revela un cambio en la reactividad con el anticuerpo debido a una sustitución de aminoácido $\alpha 9$, el sitio sustituido se puede estimar como un epítipo del anticuerpo (o una parte del epítipo).

Luego, se describe una evaluación del efecto farmacológico de un anticuerpo.

20 Dado que se ha sugerido mucho que $\alpha 9$ esté implicado en inflamación, se recomienda usar artritis inducida por anticuerpo de colágeno de ratón, que es un modelo representativo de artritis, o similares, como un sistema de modelo patológico de ratón. Por ejemplo, el efecto farmacológico de cada clon de anticuerpo sobre artritis inducida por anticuerpo de colágeno de ratón se puede evaluar por los procedimientos que se muestran a continuación.

25 Un cocktail de anticuerpo anti-colágeno se administra a ratones, y 3 días después, se administra LPS, con el cual se induce el comienzo de artritis. El día de la administración de LPS y 3 días después, el scFv-Fc del clon se administra por vía intraperitoneal a 500, 170, y 56 pg/cabeza. El grado de hinchazón en las extremidades de cada ratón se examina y valora en el tiempo, y se grafican cambios en el tiempo en el valor promedio para cada grupo. Como resultado, si se observa un efecto supresor dependiente de dosis de scFv-Fc sobre artritis, se cree que el clon tiene un efecto farmacológico sobre artritis.

30 De manera alternativa, se recomienda evaluar el efecto supresor sobre artritis inducida por colágeno de ratón, otro modelo representativo de artritis. Se cree que en artritis inducida por anticuerpo de colágeno, se provoca una reacción inflamatoria en la etapa aguda, mientras en artritis inducida por colágeno,

se provoca una respuesta inflamatoria crónica mediada por una reacción inmunitaria. Por ejemplo, el efecto farmacológico del clon de anticuerpo sobre artritis inducida por colágeno de ratón se puede evaluar por los procedimientos que se muestran a continuación.

35 Mediante la administración de colágeno de tipo II bovino a ratones con un intervalo de 3 semanas, se induce el comienzo de artritis. 4 días, 6 días, 8 días, 10 días y 12 días después de la segunda administración, el scFv-Fc del clon se administra por vía intraperitoneal a 500, 170, y 56 pg/cabeza. El grado de hinchazón en todas las extremidades de cada ratón se examina y valora en el tiempo para determinar si se observa un efecto supresor dependiente de dosis de scFv-Fc sobre artritis.

40 La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica acompañada de destrucción articular, y la destrucción articular priva al paciente de libertad, lo que resulta en un deterioro importante de su QOL. Ninguno de los agentes terapéuticos de artritis reumatoide usados hasta ahora suprimen de manera eficaz la destrucción articular, aunque poseen acción antiinflamatoria; se espera desarrollar un agente terapéutico de artritis reumatoide tenga acción potente antiinflamatoria y acción supresora de destrucción articular. Por lo tanto, por ejemplo, el efecto supresor del clon sobre diferenciación de osteoclastos se puede evaluar como se describe a continuación.

45 Se recogen células de la médula ósea del ratón artificialmente artrítico descrito anteriormente, y se cultivan en un medio aMEM que contiene RANKL y M-CSF, junto con el scFv-Fc de clon, después de lo cual se cuentan los osteoclastos (células de TRAP positivo), y se evalúa el efecto supresor sobre diferenciación en los osteoclastos. En otro método, el scFv-Fc se administra simultáneamente con inducción de artritis, se recogen células de la médula ósea del ratón al otro día, las células se cultivan en un medio aMEM que contiene RANKL y M-CSF, se cuentan los osteoclastos, y se evalúa el efecto.

50 Luego, se describe la mejora de afinidad de anticuerpo.

55 Se reportaron muchos casos donde las alteraciones tales como sustituciones de aminoácidos se realizan en la región variable de un anticuerpo, por la cual la afinidad o especificidad se mejoró o cambió. Aun si el anticuerpo obtenido no posee suficiente afinidad o especificidad, parece posible mejorar la afinidad o especificidad del anticuerpo, por ejemplo, como se describe a continuación.

Como métodos de alteraciones, hay varios métodos comúnmente conocidos en la técnica; por ejemplo, hay un método donde un sitio especificado se sustituye con un aminoácido particular tal como Ala (por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology edit. 1987, 5: Sección 8, 1-8), un método donde se introducen aminoácidos aleatorios (se pueden realizar por mutagénesis dirigida al sitio), un método donde las sustituciones de aminoácidos se introducen aleatoriamente a la región variable del anticuerpo sin especificar un sitio (se puede realizar por mutagénesis aleatoria) (por ejemplo, métodos PCR y Aplicaciones, 1992, 2: 28-33) y similares.

En muchos casos, de las varias regiones variables de anticuerpo, la región CDR3 de VH es el mayor contribuyente al reconocimiento de antígeno, por lo que esta región puede ser sometida al sitio para alteración.

También es posible preparar una biblioteca de fago de expresión de scFv alterada, y analizar un clon alterado con afinidad o especificidad mejorada en comparación con el clon original.

Con respecto al clon alterado adquirido, se recomienda preparar un estándar de referencia en la forma molecular de, por ejemplo, scFv o scFv-Fc, como con el clon original, y evaluar su reactividad, actividad inhibidora de función, y efecto farmacológico. Como resultado, si se confirma una propiedad mejor que el clon original, reactividad a $\alpha 9$ de ser humano, y un efecto farmacológico, se espera que el clon alterado se convierta en un fármaco profiláctico o terapéutico para una enfermedad donde $\alpha 9$ contribuye a la patogénesis.

Los presentes inventores trataron de adquirir scFv de integrina anti- $\alpha 9$ por el método antes descrito y, como un resultado, lograron adquirir MA9-413, un clon scFv que posee reactividad específica a integrina $\alpha 9$. Como un resultado de una evaluación después de cambiar la forma molecular de scFv a scFv-Fc, se confirmó que este clon tiene una propiedad que nunca fue reportada hasta la fecha en cuanto exhibe reactividad con $\alpha 9$ de ser humano y $\alpha 9$ de ratón y actividad inhibidora de función contra ambos.

Además, los presentes inventores dirigieron análisis de epítipo en clon MA9-413, y descubrieron que este clon reconoce un epítipo configurado principalmente por la región de 104 Arg a 122 Asp de integrina $\alpha 9$ de ser humano (SEQ ID NO:36: una integrina $\alpha 9$ de ser humano mostrado por Swiss-Prot AC: Q137 97; el extremo N de la secuencia de aminoácidos se enumera 1), y un epítipo configurado principalmente por la región de 105 Arg a 123 Asp de integrina $\alpha 9$ de ratón (SEQ ID NO: 37: una integrina $\alpha 9$ de ratón mostrado por GenBank ACCESSION: AJ344342; el extremo N de la secuencia de aminoácidos se enumera 1). Estas regiones son regiones bucle cuyas funciones y roles no se reportaron en estudios anteriores de otras familias de integrinas, y los presentes inventores las denominaron regiones LI.

Como un resultado de un examen de los efectos farmacológicos del anticuerpo o fragmento de anticuerpo con estas características, se confirmó un efecto para suprimir significativamente inflamación e hinchazón de articulaciones en un modelo de artritis de ratón.

Por lo tanto, el anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano y fragmento de anticuerpo de la presente invención tienen una propiedad que no se ha dado a conocer que hasta la fecha en cuanto reconocen un epítipo formado por la región LI de integrina $\alpha 9$ y poseen reactividad a integrina $\alpha 9$ de ratón e integrina $\alpha 9$ de ser humano. Como tal, se espera que el anticuerpo y fragmento de anticuerpo de la presente invención se pueda aplicar industrialmente como fármacos profilácticos o terapéuticos de diagnóstico novedosos para varias enfermedades implicadas por integrina $\alpha 9$.

Dado que el anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano y fragmento de anticuerpo de la presente invención poseen reactividad con integrina $\alpha 9$ de ratón e integrina $\alpha 9$ de ser humano, es posible adquirir datos sobre estudios farmacológicos usando ratones con el mismo anticuerpo y dirigir otros estudios clínicos en sujetos humanos para promover el desarrollo de un anticuerpo farmacéutico, como se menciona anteriormente; esto puede ser una ventaja importante en vista de la aplicación industrial.

La presente invención también ofrece un nuevo potencial de aplicaciones de investigación o industriales con relación a integrina $\alpha 9$ y aun la familia de integrina en su totalidad, como un resultado del descubrimiento de un nuevo epítipo neutralizante denominado región LI.

Además, los presentes inventores realizaron alteraciones moleculares al anterior clon MA9-413, y lograron obtener una pluralidad de clones con reactividad mejorada extraordinariamente a integrina $\alpha 9$ de ser humano. MA9-418, HA9-107, HA9-143 y HA9-212. Se espera que estos clones se conviertan en fármacos más eficaces que MA9-413.

Las secuencias de aminoácidos de las cadenas VH y cadenas VL de los clones scFv adquiridas por los presentes inventores, que tienen las propiedades descritas anteriormente, y las secuencias base que las codifican, se muestran a continuación.

(1) Clon MA9-413

La secuencia de aminoácidos de la cadena VH del clon MA9-413 se muestra por la SEQ ID NO:1. Las secuencias de aminoácidos de la CDR1 a 3 de la cadena VH se muestran por la SEQ ID NO: 2 a 4. Entonces, en la secuencia de aminoácidos de la cadena VH del clon MA9-413 que se muestra por la SEQ ID NO:1, la secuencia de los

aminoácidos 31 a 35 corresponde a la CDR1 (SEQ ID NO:2), la secuencia de los aminoácidos 50 a 66 corresponde a la CDR2 (SEQ ID NO:3), y la secuencia de los aminoácidos 99 a 115 corresponde a la CDR3 (SEQ ID NO:4) . La secuencia base del gen que codifica la cadena VH se muestra por la SEQ ID NO: 5.

5 La secuencia de aminoácidos de la cadena VL del clon MA9-413 se muestra por la SEQ ID NO:6. Las secuencias de aminoácidos de la CDR1 a 3 de la cadena VL se muestran por la SEQ ID No: 7 a 9. Entonces, en la secuencia de aminoácidos de la cadena VL del clon MA9-413 que se muestra por la SEQ ID NO:6, la secuencia de los aminoácidos 23 a 35 corresponde a la CDR1 (SEQ ID NO:7), la secuencia de los aminoácidos 51 a 57 corresponde a la CDR2 (SEQ ID NO:8), y la secuencia de los aminoácidos 90 a 96 corresponde a la CDR3 (SEQ ID NO:9) . La secuencia base del gen que codifica la cadena VL se muestra por la SEQ ID NO: 10.

10 (2) Clon MA9-418

La secuencia de aminoácidos de la cadena VH del clon MA9-418 se muestra por la SEQ ID NO:12. Las secuencias de aminoácidos de la CDR1 a 3 de la cadena VH se muestran por la SEQ ID No: 13 a 15. Entonces, en la secuencia de aminoácidos de la cadena VH que se muestra por SEQ ID NO:12, la secuencia de aminoácidos 31 a 35 corresponde a la CDR1 (SEQ ID NO:13), la secuencia de los aminoácidos 50 a 66 corresponde a la CDR2 (SEQ ID NO:14), y la secuencia de los aminoácidos 99 a 115 corresponde a la CDR3 (SEQ ID NO: 15) . La secuencia base del gen que codifica la cadena VH se muestra por la SEQ ID No:16.

15

La secuencia de aminoácidos de la cadena VL del clon MA9-418 es la misma que la de la cadena VL del clon MA9-413 (SEQ ID NO:6).

(3) Clon HA9-107

20 La secuencia de aminoácidos de la cadena VH del clon MA9-107 se muestra por la SEQ ID NO:18. Las secuencias de aminoácidos de la CDR1 a 3 de la cadenaVH se muestran por SEQ ID NO:19 a 21. Entonces, en la secuencia de aminoácidos de la cadena VH que se muestra por la SEQ ID NO:18, la secuencia de los aminoácidos 31 a 35 corresponde a la CDR1 (SEQ ID NO:19), la secuencia de los aminoácidos 50 a 66 corresponde a la CDR2 (SEQ ID NO:20), y la secuencia de los aminoácidos 99 a 115 corresponde a la CDR3 (SEQ ID NO: 21) . La secuencia base del gen que codifica la cadena VH se muestra por la SEQ ID No:22.

25

La secuencia de aminoácidos de la cadena VL del clon MA9-107 es la misma que la de la cadena VL del clon MA9-413 (SEQ ID NO:6).

(4) Clon HA9-143

30 La secuencia de aminoácidos de la cadena VH del clon HA9-143 se muestra por la SEQ ID NO:24. Las secuencias de aminoácidos de la CDR1 a 3 de la cadenaVH se muestran por SEQ ID NO:25 a 27. Entonces, en la secuencia de aminoácidos de la cadena VH que se muestra por la SEQ ID NO:24, la secuencia de los aminoácidos 31 a 35 corresponde a la CDR1 (SEQ ID NO:25), la secuencia de los aminoácidos 50 a 66 corresponde a la CDR2 (SEQ ID NO:26), y la secuencia de los aminoácidos 99 a 115 corresponde a la CDR3 (SEQ ID NO: 27) . La secuencia base del gen que codifica la cadena VH se muestra por la SEQ ID No:28.

35 La secuencia de aminoácidos de la cadena VL del clon HA9-143 es la misma que la de la cadena VL del clon MA9-413 (SEQ ID NO:6).

(5) Clon HA9-212

40 La secuencia de aminoácidos de la cadena VH del clon HA9-212 se muestra por la SEQ ID NO:30. Las secuencias de aminoácidos de la CDR1 a 3 de la cadena VH se muestran por la SEQ ID No: 31 a 33. Entonces, en la secuencia de aminoácidos de la cadena VH que se muestra por la SEQ ID NO:30, la secuencia de los aminoácidos 31 a 35 corresponde a la CDR1 (SEQ ID NO:31), la secuencia de los aminoácidos 50 a 66 corresponde a la CDR2 (SEQ ID NO:32), y la secuencia de los aminoácidos 99 a 115 corresponde a la CDR3 (SEQ ID NO: 33) . La secuencia base del gen que codifica la cadena VH se muestra por la SEQ ID No:34.

45 La secuencia de aminoácidos de la cadena VL del clon HA9-212 es la misma que la de la cadena VL del clon MA9-413 (SEQ ID NO:6).

En una realización preferida, el anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano o fragmento de anticuerpo de la presente invención tiene regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada que consisten en las secuencias de aminoácidos mostradas por la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15; SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27; o SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, y SEQ ID NO:33, respectivamente (CDR1, CDR2, CDR3), y regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera que consisten en las secuencias de aminoácidos mostradas por la SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, y SEQ ID NO:9, respectivamente (CDR1, CDR2, CDR3). En una realización más preferida, el anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano o fragmento de anticuerpo tiene regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada que consisten en las secuencias de aminoácidos mostradas por la SEQ ID

50

NO:31, SEQ ID NO:32, y SEQ ID NO:33, respectivamente (CDR1, CDR2, CDR3).

5 En una realización aun más preferida, el anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano o fragmento de anticuerpo de la presente invención tiene una región variable de cadena pesada (VH) que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por cualquiera de las SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:24, y SEQ ID NO:30, y una región variable de cadena ligera (VL) que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO:6. En una realización más preferida, el anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano o fragmento de anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada (VH) que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO:30.

10 Las cadenas VH y/o las cadenas VL descritas en la presente invención fueron obtenidas en la forma de scFv usando el método de anticuerpo fago, y se evaluaron en la forma molecular de scFv o scFv-Fc; como regla, sin embargo, el anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano o fragmento de anticuerpo de la presente invención no se limita a estas formas moleculares. Por ejemplo, una forma molecular completa preparada uniendo una cadena VH y/o cadena VL descritas con la región constante de inmunoglobulina humana, como un anticuerpo completo, y no solo scFv y scFv-Fc, sino también Fab, Fab' o F (ab')₂ combinado con una porción de la región constante de inmunoglobulina humana, y otros fragmentos de anticuerpo tales como anticuerpos de cadena simple preparados por unión de scFv con la región constante de la cadena L de inmunoglobulina humana (scAb), como fragmentos de anticuerpo, también son parte de la presente invención.

20 Además del anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano antes descrito de la presente invención o fragmento de anticuerpo de este, la presente invención también comprende anticuerpos de fusión preparados fusionando el anticuerpo o fragmento de anticuerpo con otro péptido o proteína, y anticuerpos modificados preparados uniendo el anticuerpo o fragmento de anticuerpo con un modificador polimérico tal como polietilenglicol.

Al preparar un scFv con los Fv de una cadena H y cadena L

unidos por un enlazador apropiado, por ejemplo, un péptido de cadena simple opcionalmente elegido que consiste en 10 a 25 residuos de aminoácido, se usa como enlazador peptídico.

25 El anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano o un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo fusionado que resulta de fusión de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo con otro péptido o proteína, o un anticuerpo modificado que consiste en dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo y un agente modificador unido a este (en lo sucesivo denominado "anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano etc.") de la presente invención así obtenido, después de purificarse según es necesario, se puede preparar como una preparación farmacéutica de acuerdo con un método convencional, y se puede usar para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, enfermedades inmunitarias tales como alergia, rechazo a injertos, etc., o enfermedades en las que la integrina $\alpha 9$ está implicada en patogénesis tales como osteoartritis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cáncer y similares.

35 El anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano etc. de la presente invención se puede usar preferentemente como un agente terapéutico para artritis reumatoide. Como ejemplos de formas de dosificación para dicho agente terapéutico, se puede preparar una preparación parenteral tal como una inyección o infusión por goteo, y preferentemente se administra por administración intravenosa, administración subcutánea y similares (lo mismo se aplica en el caso de un agente terapéutico de enfermedad autoinmunitaria). Al preparar una preparación farmacéutica, portadores y aditivos que concuerdan con estas formas de dosificación se pueden usar dentro de un intervalo farmacéuticamente aceptable.

La cantidad de anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano etc. agregada en la preparación descrita anteriormente varía depende de los síntomas, gravedad y edad del paciente, la forma de dosificación de la preparación usada o la titulación de unión el anticuerpo y similares; por ejemplo, se puede usar alrededor de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg.

45 La presente invención también proporciona un gen que codifica el anticuerpo de la presente invención o un fragmento de este, y un vector de expresión que comprende el mismo. El vector de expresión de la presente invención no se somete a limitación, siempre que sea capaz de expresar un gen que codifica el anticuerpo de la presente invención o un fragmento de este en varias células hospedadoras de células procariotas y/o células eucariotas, y producir estos polipéptidos. Por ejemplo, se pueden mencionar vectores de plásmido, vectores virales (por ejemplo, adenovirus, retrovirus) y similares.

50 El vector de expresión de la presente invención también puede comprender un gen que codifica el anticuerpo de la presente invención o un fragmento de este, y un promotor unido funcionalmente al gen. Como el promotor para expresar el polipéptido de la presente invención en una bacteria, cuando es hospedador es una bacteria del género Escherichia, se puede mencionar, por ejemplo, el promotor Trp, promotor lac, promotor recA, promotor A-PL, promotor lpp, promotor tac y similares. Como el promotor para expresar el anticuerpo de la presente invención o un fragmento de esto en levadura, por ejemplo, se puede mencionar promotor PH05, promotor PGK, promotor GAP, y promotor ADH; cuando se puede mencionar el hospedador es una bacteria del género Bacillus, el promotor SL01, promotor SP02, promotor penP y similares. Cuando el hospedador es una célula eucariota tal como una célula de mamífero, se puede mencionar promotor CAG (Niwa H. et ál., Gene, 108, 193- 200, 1991), promotor derivado de

SV40, promotor de retrovirus, promotor de choque térmico y similares.

5 Cuando una bacteria, particularmente *Escherichia coli*, se usa como la célula hospedadora, el vector de expresión de la presente invención puede comprender además un codón de inicio, un codón de detención, una región de terminación y una unidad replicable. Cuando una levadura, célula de animal o célula de insecto se usa como el

10 La presente invención también proporciona un transformante que incorpora el gen de la presente invención. Dicho transformante se puede preparar mediante, por ejemplo, la transformación de una célula hospedadora con el vector de expresión de la presente invención. La célula hospedadora usada para preparar un transformante no se somete a limitación, siempre que concuerde con el vector de expresión antes mencionado, y se puede transformar; varias células tales como células naturales o líneas artificialmente establecidas de células de uso común en el campo

15 técnico de la presente invención (por ejemplo, bacterias (bacterias del género *Escherichia*, bacterias del género *Bacillus*), levaduras (el género *Saccharomyces*, el género *Pichia* y similares), células de animales o células de insectos (por ejemplo, Sf9) y similares) pueden ser mencionados como ejemplos. La transformación se puede realizar por un método conocido propiamente dicho.

20 La presente invención también proporciona un método para producir el anticuerpo de la presente invención o un fragmento de este, que comprende dejar que una célula hospedadora exprese el gen de la presente invención, es decir, usando dicho transformante.

25 Al producir el anticuerpo de la presente invención o un fragmento de este, el transformante se puede cultivar en un medio nutritivo. El medio nutritivo contiene preferentemente una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno inorgánica o fuente de nitrógeno orgánica necesaria para el crecimiento del transformante. Como ejemplos de la fuente de carbono, se puede mencionar glucosa, dextrano, almidón soluble, sucrosa y similares; como ejemplos de la fuente de nitrógeno inorgánica o fuente de nitrógeno orgánica, se puede mencionar sales de amonio, nitratos, aminoácidos, licor de maíz, peptona, caseína, extracto de carne, torta de soja, extracto de papa y similares. Si se desea, puede contener otros nutrientes (por ejemplo, sales inorgánicas (por ejemplo, cloruro de calcio, fosfato dihidrógeno de sodio, cloruro de magnesio), vitaminas, antibióticos (por ejemplo, tetraciclina, neomicina, ampicilina, kanamicina y similares) y similares).

30

35 El cultivo del transformante se puede realizar por un método conocido propiamente dicho. Las condiciones de cultivo, por ejemplo, temperatura, pH del medio, y tiempo de cultivo se seleccionan según sea apropiado. Por ejemplo, cuando el hospedador es una célula de animal, un medio MEM que contiene alrededor de 5 a 20% de suero bovino fetal (*Science*, Vol.122, p.501, 1952), medio DMEM (*Virology*, Vol.8, p.396, 1959), medio RPMI1640 (*J. Am. Med. Assoc.*, Vol.199, p.519, 1967), medio 199 (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Vol.73, p.1, 1950) y similares se pueden usar como el medio. El pH del medio es preferentemente alrededor de 6 a 8, el cultivo se realiza normalmente a alrededor de 30 a 40°C durante alrededor de 15 a 72 horas, y el cultivo se puede airear o agitar según sea necesario. Cuando el hospedador es una célula de insecto, se puede mencionar por ejemplo medio de Grace que comprende suero bovino fetal (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.82, p.8404, 1985) y similares, y el pH de este es preferentemente alrededor de 5 a 8. El cultivo se realiza normalmente a alrededor de 20 a 40°C durante 15 a 100 horas, y el cultivo se puede airear o agitar según sea necesario. Cuando el hospedador es una bacteria, un actinomyces, levadura, o un hongo filamentoso, por ejemplo, es apropiado un medio líquido que comprende las fuentes de nutriente antes mencionadas. Se prefiere un medio con un pH de 5 a 8. Cuando el hospedador es *E. coli*, se puede mencionar medio LB, medio M9 (Miller et ál., *Exp. Mol. Genet*, Cold Spring Harbor Laboratory, p.431, 1972) y similares como medio preferente.

40

45

50 En este caso, el cultivo se puede realizar normalmente a 14 a 43°C durante alrededor de 3 a 24 horas, mientras se airea o agita el cultivo según sea necesario. Cuando el hospedador es una bacteria del género *Bacillus*, el cultivo se puede realizar normalmente a 30 a 40°C durante alrededor de 16 a 96 horas, mientras se airea o agita el cultivo según sea necesario. Cuando el hospedador es levadura, el medio mínimo de Burkholder (*Bostian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.77, p.4505, 1980) se puede mencionar como ejemplos del medio, y el pH es convenientemente 5 a 8. El cultivo se realiza normalmente a alrededor de 20 a 35°C durante alrededor de 14 a 144 horas, y el cultivo se puede airear o agitar según sea necesario.

55 El anticuerpo de la presente invención o un fragmento de este se puede recuperar, preferentemente se puede aislar y purificar, de un transformante cultivado como se describe anteriormente. Como ejemplos del método de aislamiento y purificación, se pueden mencionar métodos basados en diferencias en solubilidad, tales como precipitación por sales y precipitación por solvente; métodos basados en diferencias en peso molecular, tales como diálisis, ultrafiltración, filtración por gel, y electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida; métodos basados en diferencias de carga eléctrica, tales como cromatografía por intercambio de iones y cromatografía de hidroxil apatita; métodos basados en afinidad específica, tales como cromatografía de afinidad; métodos basados en diferencias de hidrofobicidad, tales como cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa basada en

60

diferencias de punto isoeléctrico, tales como enfoque isoeléctrico; y similares.

La presente invención se explica en detalle a continuación en función de los Ejemplos, que no son taxativos.

Ejemplos

«Ejemplo 1: Preparación de antígeno»

5 Usando la biblioteca de ADNc humano como plantilla, la región de dominio principal del gen de la integrina $\alpha 9$ de ser humano y la región de secuencia de señal del gen de la integrina $\alpha 5$ humana se clonaron. La región de secuencia de señal del gen de la integrina $\alpha 5$ humana y la región de dominio principal del gen de la integrina $\alpha 9$ de ser humano se conectaron e incorporaron en el vector pcDNA3.1 (-) (Invitrogen) para construir un vector de expresión $\alpha 9$ humano.

10 Usando la biblioteca de ADNc de ratón como plantilla, el gen de la integrina $\alpha 9$ de ratón de longitud completa se clonó e incorporó en el vector pcDNA3.1(+) (Invitrogen) para construir un vector de expresión $\alpha 9$ de ratón.

Además, para su uso como control, la integrina $\alpha 4$ de ser humano y la integrina $\alpha 4$ de ratón también se clonaron según el siguiente procedimiento.

Usando la biblioteca de ADNc humana como plantilla, el gen de la integrina $\alpha 4$ humano de longitud completa se clonó e incorporó en el vector pcDNA3.1(+) (Invitrogen) para construir un vector de expresión $\alpha 4$ humano.

15 Usando ADNc derivado del bazo como plantilla, el gen de la integrina $\alpha 4$ de ratón de longitud completa se clonó e incorporó en el vector pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) para construir un vector de expresión $\alpha 4$ de ratón.

20 En primer lugar, el vector de expresión de integrina $\alpha 9$ de ratón y el vector de expresión de integrina $\alpha 4$ de ratón se introdujeron respectivamente en células CHO, y una célula que expresa integrina $\alpha 9$ de ratón (a la que se hará referencia en lo sucesivo como CHO/ $\alpha 9$) y una célula que expresa integrina $\alpha 4$ de ratón (a la que se hará referencia en lo sucesivo como CHO/ $\alpha 4$) se establecieron respectivamente.

Luego, el vector de expresión de integrina $\alpha 9$ de ser humano y el vector de expresión de integrina $\alpha 9$ de ratón se introdujeron respectivamente en células SW480 y una célula que expresa integrina $\alpha 9$ de ser humano (a la que se hará referencia en lo sucesivo como SW480/ $\alpha 9$) y una célula que expresa integrina $\alpha 9$ de ratón (a la que se hará referencia en lo sucesivo como SW480/ $\alpha 9$) se establecieron respectivamente.

25 Estas diversas células que expresan integrina se usaron para el siguiente análisis y evaluación.

<<Ejemplo 2: Construcción de biblioteca de fago de voluntarios saludables»

30 Por referencia al método informado por J. D. Marks et ál. (J. Mol. Biol., 222: 581-597, 1991) y mediante el uso de linfocitos derivados de sangre periférica de veinte voluntarios saludables como material de partida, se construyó una biblioteca de fago. Las sub bibliotecas construidas VH(γ)-Vk, VH(γ)-V λ , VH(μ)-Vk y VH(μ)-V λ se evaluaron para tener una diversidad de $1,1 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $8,4 \times 10^7$ y $5,3 \times 10^7$ clones, respectivamente.

«Ejemplo 3: Análisis mediante el uso de una célula que expresa integrina $\alpha 9$ »

Un anticuerpo específico para $\alpha 9$ se produjo según los siguientes procedimientos. En primer lugar, se construyó un anticuerpo monoclonal con una actividad inhibidora de función con $\alpha 9$ de ratón como diana y se evaluó la presencia o ausencia de eficacia mediante el uso de un sistema de modelo de patología de ratón.

35 Mediante el uso de la célula CHO de cepa original, la biblioteca de expresión en fagos se sustrajo y se hizo reaccionar con CHO/ $\alpha 9$. La reacción se realizó durante 1 h y las células se lavaron 3 veces con 1% de BSA/PBS.

La fracción celular después de lavar se suspendió en HCl (10 mM) y se incubó durante 10 min para eluir el fago. El eluido se neutralizó mediante mezcla con 1M Tris-HCl (pH 7,5) y se infectó con TGI para amplificar el fago.

Como resultado de 4 rondas de cribado, se aisló un clon de fago MA9-413 específicamente reactivo con $\alpha 9$ de ratón.

40 <<Ejemplo 4: Análisis de reactividad de anticuerpo de fago por ELISA»

La reactividad del anticuerpo de fago MA9-413 a $\alpha 9$ se analizó mediante Cell ELISA.

45 CHO/ $\alpha 9$ y CHO se sembraron en una placa de 96 pocillos (costar) a 2×10^4 células/100 μ L/pocillo y se incubó durante la noche a 37 °C, 5% de CO₂. El medio se succionó y las células se lavaron con PBS y se hicieron reaccionar con anticuerpo de fago diluido con 1% de BSA/PBS. La detección se llevó a cabo mediante el uso de anticuerpo anti-M13 etiquetado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Amersham) y TMB (SIGMA) en combinación. La absorbancia a longitudes de onda de 450 nm y 650 nm se midió por un lector de microplacas (Molecular Devices). Los resultados se muestran en la Figura 1. Debido a que se confirmó la reactividad específica de $\alpha 9$ de MA9-413, se realizaron otros análisis.

«Ejemplo 5: Análisis de secuencia de clon»

Las secuencias base de ADN de VH y VL del gen scFv de clon aislado se determinaron mediante el uso de un kit CEQ DTCS Quick Start (BECKMAN COULTER). La secuencia de aminoácidos se dedujo en función de la información de las secuencias base de ADN obtenidas.

5 «Ejemplo 6: Expresión y purificación de scFv»

El ADN plásmido se recuperó del clon específico MA9-413 y *Escherichia coli* JM83 se transformó según un método convencional. *Escherichia coli* se precultivó durante la noche en medio 2xYT que contiene 2% de glucosa y 100 µg/mL de ampicilina y se transfirió parcialmente a medio SB que contiene 2% de glucosa y 100 µg/mL de ampicilina para realizar el cultivo principal. Se agregó IPTG en la fase logarítmica a una concentración final de 1 mM y la mezcla se cultivó durante 3 h para inducir la expresión de scFv. Luego de que se completó el cultivo, las células bacterianas se recuperaron por centrifugación, se suspendieron en 100 mM de solución Tris-HCl (pH 7,4) que contenía 20% de sucrosa y 10 mM de EDTA y las células bacterianas se dejaron en reposo sobre hielo durante 30 min. Luego, las células se centrifugaron a 8.900xg durante 30 min, el sobrenadante se recuperó y la fracción obtenida por filtración a través de un filtro de 0,45 µm se tomó como fracción periplásmica. Usando la fracción como material de partida, scFv se purificó según un método convencional por cromatografía en columna SP (Amersham) o módulo de purificación RPAS (Amersham) y la fracción de elución obtenida se dializó contra PBS para dar un producto estándar de purificación de scFv.

«Ejemplo 7: análisis de reactividad de scFv por ELISA»

La reactividad del producto de purificación de scFv preparado en el Ejemplo 6 a α9 se analizó por Cell ELISA para detección, se usó un anticuerpo anti-Etag etiquetado con HRP (Amersham) y el resto se realizó en las mismas condiciones que en el Ejemplo 4. Como resultado, se confirmó una reactividad dependiente de la concentración y específica como se muestra en la Fig. 2.

<<Ejemplo 8: evaluación de actividad inhibidora de la adhesión celular dependiente de α9 de scFv»

Si MA9-413 scFv puede inhibir la adhesión celular dependiente de α9 o no se evaluó por el siguiente método.

25 Variante OPN de extremo N (variante OPN con secuencia RGD alterada a RAA) se inmovilizó en una placa y se sometió a bloqueo. Se agregó producto de purificación MA9-413 scFv, luego se agregó SW480/α9 y la mezcla se incubó a 37 °C durante 1 h. Las células se fijaron y tiñeron con violeta Crystal y metanol y se lavaron. El tinte en las células adheridas se extrajo con Triton X-100 y se midió la absorbancia a longitud de onda 595 nm.

30 Como resultado, se observó una acción supresora dependiente de la concentración como se muestra en la Fig. 3 y se confirmó que MA9-413 tenía una actividad inhibidora contra α9 de ratón.

<<Ejemplo 9: construcción del vector de expresión scFv-Fc»

35 Con la esperanza de mejorar la actividad inhibidora de función al cambiar el clon por un anticuerpo divalente, el clon se convirtió en una forma molecular de scFv-Fc. La región de gen MA9-413 scFv se amplificó por PCR y se insertó en el sitio Sall y el sitio BamHI del vector de expresión de proteína de fusión Fc de ratón para construir el vector de expresión scFv-Fc que se muestra en la Fig. 4. En este vector, una secuencia líder que promueve la expresión secretora extracelular, gen scFv y un gen que codifica la región Fc de IgG1 de ratón se conectan y la expresión de estos se regula por un promotor CAG. Además, este vector contiene un gen de resistencia a la neomicina y un gen de resistencia a la ampicilina como genes de resistencia al fármaco.

<<Ejemplo 10: expresión y purificación de scFv-Fc»

40 Mediante el uso de Lipofectamina 2000 (Invitrogen), el vector de expresión scFv-Fc construido se transfectó a la cepa CHO-DG44. Las células se cultivaron en un medio α-MEM (Invitrogen) o medio EX-CELL302 (Nichirei Biosciences) que contiene 500 µg/mL de neomicina y 10% de suero bovino y el sobrenadante de cultivo se recuperó. La purificación por afinidad se realizó por cromatografía en columna de proteína A según un método convencional y se realizó diálisis con PBS. La solución scFv-Fc obtenida se tomó como el producto purificado.

45 «Ejemplo 11: análisis de reactividad de scFv-Fc por ELISA»

50 La reactividad de MA9-413 scFv-Fc con α9 de ratón y α9 de ser humano se analizó por Cell ELISA. SW480/α9, SW480/α9 y SW480 se usaron como antígenos, 1% de BSA/PBS que contiene 5% de FBS se usó como solución de dilución, un anticuerpo IgG anti-ratón etiquetado con HRP (ZYMED) se usó para detección y el resto se realizó en las mismas condiciones que en el Ejemplo 4. Como resultado, se confirmó una reactividad dependiente de la concentración y específica con α9 de ratón y α9 de ser humano como se muestra en la Fig. 5. Por otro lado, anticuerpo Y9A2 evaluado como control reaccionó con α9 de ser humano pero no mostró reactividad alguna con α9 de ratón. A partir de estos resultados, se aclaró que MA9-413 es un clon de anticuerpo que tiene reactividad novedosa no informada antes, que es capaz de reconocer tanto α9 de ratón como α9 de ser humano.

«Ejemplo 12: análisis de reactividad de scFv-Fc por citometría de flujo»

Además, la reactividad de MA9-413 scFv-Fc se evaluó por citometría de flujo.

5 MA9-413 scFv-Fc se hizo reaccionar con cada uno de SW480, SW480/ma9 y SW480/ha9 y se realizó análisis de citometría de flujo. Como resultado, la reactividad con $\alpha 9$ de ratón y $\alpha 9$ de ser humano se confirmó. Pese a que la reactividad con cada uno de CHO y CHO/ma4 también se evaluó de la misma forma, la reactividad con $\alpha 4$ de ratón no se observó (Fig. 6). A partir de estos resultados, se confirmó que MA9-413 scFv-Fc reacciona con $\alpha 4$ de ratón y humana con alta especificidad.

<<Ejemplo 13: evaluación de actividad inhibidora de la adhesión celular dependiente de $\alpha 9$ de scFv-Fc»

Se evaluó si MA9-413 scFv-Fc puede inhibir la adhesión celular dependiente de $\alpha 9$ de ratón y $\alpha 9$ de ser humano.

10 En cuanto a la adhesión celular cuando el ligando es OPN, se usó SW480/ma9 o SW480/ha9 y el resto se llevó a cabo en las mismas condiciones que en el Ejemplo 8.

La adhesión celular cuando el ligando es VCAM-1 se evaluó por el siguiente método.

VCAM-1/Fc de ratón se inmovilizó en una placa y se sometió a bloqueo. SW480/ma9 se usó como la célula y el resto se llevó a cabo en las mismas condiciones que en el Ejemplo 8.

15 Como resultado, una acción supresora dependiente de concentración se observó en todos los casos como se muestra en la Fig. 7 y se confirmó que MA9-413 tiene actividad inhibidora contra $\alpha 9$ de ratón y $\alpha 9$ de ser humano y una acción similar se observó incluso cuando el ligando es OPN o VCAM-1.

«Ejemplo 14: análisis de epítipo MA9-413»

20 MA9-413 con propiedades no informadas antes en el sentido de que muestra reactividad tanto con $\alpha 9$ de ratón como $\alpha 9$ de ser humano así como actividad inhibidora en ambos se sometió al siguiente análisis en un intento por identificar un epítipo.

Como un rasgo común a las cadenas α de familia de integrina, se dice que el dominio propelente β presente en la porción de extremo N de región extracelular es un sitio de intersección con ligando (Science, 296, 151-155, 2002). Por lo tanto, se planteó una hipótesis de que hay un epítipo neutralizante en esta región.

25 Luego, por referencia al modelo estructural estérico del dominio propelente β de $\alpha 4$ informado en una publicación (Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 94, 65-72, 1997), se preparó un modelo estructural estérico de dominio propelente β de $\alpha 9$ de ser humano. La región de lámina β y la región de bucle se dedujeron del modelo (para mencionarse posteriormente).

30 Además, una publicación que analiza un sitio de unión al ligando $\alpha 4$ y que neutraliza epítipos informa los resultados que, entre los sitios de repetición (que corresponden a la región bucle) denominados R1 a R5 en el dominio propelente β , R2 y R4 son importantes para la unión a ligando y R2, R3a y R3c pueden ser epítipos neutralizantes (Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 94, 7198-7203, 1997). A partir de esto se consideró que el epítipo MA9-413 es muy posiblemente una región de bucle.

35 Para aplicar el hallazgo obtenido sobre $\alpha 4$ a $\alpha 9$, por lo tanto, alineamos secuencias de aminoácidos de los dominios propelentes β de $\alpha 4$ de ser humano, $\alpha 9$ de ser humano y $\alpha 9$ de ratón clonados por nosotros, y comparamos las secuencias (Fig. 8). Las secuencias de aminoácidos de los dominios propelentes β respectivos de $\alpha 4$ de ser humano, $\alpha 9$ de ser humano y $\alpha 9$ de ratón mostrada en la Fig. 8 se muestran en SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40. Entre las regiones de bucle deducidas del modelo, cuatro regiones que no corresponden a R1 a R5 se denominaron L1 a L4. Los resultados del estudio anterior sugieren una reactividad más fuerte de MA9-413 con $\alpha 9$ de ratón que $\alpha 9$ de ser humano, lo que sugiere la posible presencia de una pequeña diferencia en las secuencias de aminoácidos de la región de epítipo entre humano y ratón. Por lo tanto, las regiones de bucle con diferentes secuencias de aminoácidos entre $\alpha 9$ de ser humano y $\alpha 9$ de ratón se seleccionaron para dar cuatro regiones de R1, R4, R5 y L1.

45 Luego, en función de $\alpha 9$ de ser humano, los aminoácidos en cada una de las cuatro regiones de bucle mencionadas anteriormente se sustituyó para construir una variante y la reactividad con MA9-413 se evaluó. En primer lugar, se usó EGFP como marcador para la confirmación de la expresión de la variante $\alpha 9$ de ser humano y se construyó un gen de la proteína de fusión de $\alpha 9$ de ser humano y EGFP (al que se hará referencia en lo sucesivo como ha9-EGFP) donde EGFP se fusionó con el extremo C (región citoplasmática) de $\alpha 9$ humana. El gen EGFP se amplificó por PCR usando un vector de pEGFP-N1 (Clontech) como plantilla y además se conectó a gen $\alpha 9$ de ser humano por PCR de ensamblaje. Al usar el sitio de escisión de enzima de restricción, el gen se incorporó en el vector de expresión $\alpha 9$ de ser humano descrito en el Ejemplo 1 para construir el vector de expresión ha9-EGFP.

50 Usando el vector de expresión de proteína de fusión de $\alpha 9$ de ser humano-EGFP antes mencionado como base, se produjeron vectores de expresión de las variantes de las cuatro regiones de bucle. Para R1, se construyó una

variante donde la 47^a Pro (siguiendo la numeración de la Fig. 8, en lo sucesivo la misma) se substituyó por Ala (al que se hará referencia en lo sucesivo como $\alpha 9/mR1$ -EGFP), para R4 se construyó una variante donde el 243^o Lys se substituyó por Glu (al que se hará referencia en lo sucesivo como $\alpha 9/mR4$ -EGFP), para R5 se construyó una variante donde el 286^o Gly se substituyó por Ala (al que se hará referencia en lo sucesivo como $\alpha 9/mR5$ -EGFP) y para L1, se construyó una variante donde el 77^o Lys se substituyó por Arg, el 78^o Asn se substituyó por Thr, el 81^o Thr se substituyó por Ala, el 82^o Ser se substituyó por Pro y el 89^o Glu se substituyó por Gly (al que se hará referencia en lo sucesivo como $\alpha 9/mL1$ -EGFP) cada uno por mutagénesis dirigida al sitio.

Además, para la confirmación de que el dominio propelente β es sin dudas un epítipo, una variante donde todo el dominio propelente β se substituyó por dominio propelente β de $\alpha 4$ de ser humano (al que se hará referencia en lo sucesivo como $\alpha 4/9$ -EGFP) se construyó de la siguiente manera. Debido a que la región entre el sitio B1p1 y el sitio Stul de enzimas de restricción del gen $\alpha 9$ de ser humano corresponde exactamente al dominio propelente β , la región de tipo $\alpha 4$ de ser humano que corresponde a la región se amplificó por PCR usando un cebador unido al sitio B1p1 y el sitio Stul y vector de expresión de $\alpha 4$ de ser humano como una plantilla, se escindió con B1p1 y Stul, y se intercambió con la región antes mencionada entre el sitio B1p1 y el sitio Stul del vector de expresión de proteína de fusión de $\alpha 9$ de ser humano-EGFP.

Los vectores de expresión de los tipos antes mencionados de tipo salvaje y 5 de variantes se introdujeron respectivamente en células CHO para dar poblaciones de células expresadas transitoriamente. La expresión del $\alpha 9$ -EGFP de tipo salvaje o variante y la reactividad con anticuerpos de este se evaluaron en primera instancia usando FACScan (BECTON DICKINSON).

La poblaciones de células que expresan $\alpha 9$ respectivas se hicieron reaccionar con anticuerpo de control o MA9-413 scFv-Fc diluido con 1% de BSA/PBS que contiene 2% de suero de conejo normal y 0,05% de NaN_3 sobre hielo durante 30 min. Después del lavado, las poblaciones de células se hicieron reaccionar con anticuerpo IgG1 anti-ratón etiquetado con PerCP (BECTON DICKINSON) sobre hielo durante 30 min, se lavaron adicionalmente y se analizaron por FACScan. Los resultados se muestran en la Fig. 9. El eje horizontal muestra la expresión de $\alpha 9$ -EGFP de tipo salvaje o variante y el eje vertical muestra reactividad con varios anticuerpos. El patrón de reacción de MA9-413 scFv-Fc difiere solo en $\alpha 9/mL1$ -EGFP, y la reactividad por cantidad de expresión es alta en comparación con otras variantes como $\alpha 9$ -EGFP. $\alpha 9/mL1$ -EGFP es una variante donde la región L1 se substituye de una secuencia de ser humano a una secuencia de ratón. Debido a que MA9-413 reacciona más sólidamente con $\alpha 9$ de ratón que con $\alpha 9$ de ser humano, los resultados muestran claramente que el epítipo de MA9-413 es una región L1.

Luego, se llevó a cabo el análisis por Cell ELISA. Varias células después de aproximadamente 24 h desde la transfección genética se recogieron y se sembraron en una placa de 96 pocillos a 2×10^4 célula/100 μL /pocillo. El resto se llevó a cabo en las mismas condiciones que en el Ejemplo 11. Como resultado, como se muestra en la Fig. 10, solo $\alpha 9/mL1$ -EGFP tendía a reaccionar más con MA9-413 scFv-Fc que con $\alpha 9$ -EGFP de tipo salvaje. Los resultados aquí también sugieren que la región L1 es un epítipo de MA9-413.

Como se mencionó anteriormente, debido a que la información estructural respecto de la integrina $\alpha 9$ es muy pobre, la importancia de aclarar para la primera vez de un epítipo neutralizante es alta. Además, el impacto de los resultados en este momento que indican la posibilidad de que la región denominada L1, que no atrajo atención en la cadena de otras familias de integrina, cumpla una función importante o sea capaz de volverse un objetivo para la inhibición funcional se considera muy grande.

<<Ejemplo 15: Evaluación de eficacia de scFv-Fc para modelo de artritis de ratón - 1>>

scFv-Fc de MA9-413, para el cual se encontró que no solo el patrón de reacción sino también el epítipo eran regiones novedosas, se examinó respecto de si puede mostrar eficacia para el modelo de artritis en ratón o no.

En primer lugar, se examinó el efecto sobre la artritis inducida por anticuerpo de colágeno de ratón, que es uno de los modelos de artritis representativo. Un cóctel de anticuerpo anti-colágeno se administró al ratón y LPS se administró 3 días después para inducir el inicio de la artritis. El día de la administración de LPS y 3 días después, MA9-413 scFv-Fc se administró intraperitonealmente a 500, 170 o 56 μg /cabeza y anticuerpo de ratón de control se administró a 500 μg /cabeza (4 - 8 ratones por grupo). Todas las patas del ratón se observaron con el tiempo y se puntuó la hinchazón y el perfil de valor promedio de cada grupo se muestra en la gráfica de la Fig. 11. Como resultado, se reconoció un efecto supresor de artritis dependiente de la concentración de MA9-413 scFv-Fc. En la puntuación del grupo de administración de 500 μg /cabeza el Día 6, el nivel de supresión fue casi equivalente al del grupo de administración de prednisolona en los grupos de control positivo y se confirmó una eficacia suficientemente fuerte, a saber, acción antiinflamatoria.

<<Ejemplo 16: evaluación de eficacia de scFv-Fc para modelo de artritis de ratón - 2>>

Luego, se evaluó si MA9-413 scFv-Fc también mostraba eficacia para la artritis inducida por colágeno de ratón, que es oro modelo de artritis representativo. Mientras que la reacción de inflamación en la etapa agua es inducida en la artritis inducida por anticuerpo de colágeno en el Ejemplo 15, se sabe que la respuesta inflamatoria crónica es inducida en la artritis inducida por colágeno.

El inicio de la artritis fue inducido por la administración de colágeno tipo II de bovino a un ratón dos veces cada 3 semanas. A los 4 días, 6 días, 8 días, 10 días y 12 días de la segunda administración, MA9-413 scFv-Fc se administró intraperitonealmente a 500, 170, 56 µg/cabeza, un anticuerpo de ratón de control se administró intraperitonealmente a 500 µg/cabeza y etanercept se administró intraperitonealmente a 500, 150 µg/cabeza (10 ratones por grupo) como control positivo. Todas las patas del ratón se observaron con el tiempo y se puntuó la hinchazón y el perfil de valor promedio de cada grupo se muestra en la gráfica de la Fig. 12. ANM-2 es un nombre alternativo de MA9-413. Como resultado, se reconoció un efecto supresor de artritis dependiente de la concentración de MA9-413 scFv-Fc. En el grupo de administración de 500 µg/cabeza, se confirmó que el efecto supresor excedía el del grupo de administración de etanercept 500 µg/cabeza en el grupo de control positivo y la eficacia era suficientemente fuerte.

«Ejemplo 17: Evaluación de eficacia de scFv-Fc para diferenciación de osteoclastos»

Además, el efecto de la diferenciación de osteoclastos en el modelo de artritis se examinó. En la artritis inducida por anticuerpo de colágeno de ratón usada en el Ejemplo 15 anterior, se recogieron células de médula ósea del fémur de ratón al día siguiente de la administración de LPS que induce artritis y se cultivó en un medio α MEM que contiene RANKL (concentración final de 30 ng/mL) y M-CSF (concentración final de 100 ng/mL) para inducir la diferenciación de osteoclastos. El medio de cultivo se intercambiaba una vez 3 días desde el inicio. El Día 7 desde el inicio del cultivo, se realizó tinción con TRAP (fosfatasa de ácido resistente al ácido tartárico) y la cantidad de las células teñidas se midió como osteoclastos. Como control negativo, se usó un anticuerpo anti-HBs. Como resultado, cuando se agregó MA9-413 (2 µg/ml) a las células de médula ósea de ratón que tienen artritis inducida, se suprimió en gran medida la diferenciación a osteoclastos (Fig. 13 superior). Además, cuando se usaron las células de médula ósea, que se recogieron la siguiente administración intravenosa de MA9-413 250 µg/cabeza al ratón simultáneamente con administración de LPS, se suprimió la diferenciación de osteoclastos (Fig. 13 inferior).

A partir de los resultados del Ejemplo 15 y Ejemplo 16 anteriores, se aclaró que MA9-413 tiene una acción para suprimir fuertemente las reacciones de inflamación de etapa aguda y etapa crónica. A partir de los resultados del Ejemplo 17 anterior, además, se sugirió fuertemente que MA9-413 tiene, junto con un efecto antiinflamatorio, una acción supresora de destrucción articular durante la inflamación. Por lo tanto, se espera que este clon se pueda utilizar como medicamento más superior que medicamentos convencionales para el tratamiento o profilaxis de artritis humana.

<<Ejemplo 18: Afinidad mejorada de MA9-413»

Debido a que MA9-413 es un anticuerpo que reacciona mucho con α 9 de ratón en vez de α 9 de ser humano, la afinidad puede no ser suficiente para la aplicación a artritis de seres humanos. Por lo tanto, la mejora de la afinidad se probó por alteración molecular de MA9-413. En la mayoría de los casos, en la región variable de anticuerpo, la región que contribuye en mayor medida con el reconocimiento de antígeno es la región CDR3 de VH. La secuencia de CDR3 de VH de MA9-413 es como se muestra en la SEQ ID NO: 4, donde el grupo de Tyr se configura de manera característica. Un modelo estructural estérico de región variable de este clon se preparó y analizó. Como resultado, se encontró que el 108° Tyr y el 109° Tyr se pueden configurar prominentemente particularmente en la superficie de unión al antígeno. Por lo tanto, para evaluar el papel de Tyr en el reconocimiento de antígenos, los vectores de expresión de scFv variante donde el 108° Tyr se sustituyó por Ala (al que se hará referencia en lo sucesivo como MA9-418) y scFv variante donde el 109° Tyr se sustituyó por Ala (al que se hará referencia en lo sucesivo como MA9-419) se construyeron por un método de mutagénesis dirigida por el sitio.

El scFv expresado por este vector se analizó por Cell ELISA. Como resultado, MA9-418 mostró una mejor reactividad con α 9 de ratón y α 9 de ser humano en comparación con MA9-413 y la reactividad de MA9-419 con α 9 de ratón y α 9 de ser humano desapareció en gran medida. Estos resultados sugieren que la sustitución del 108° Tyr por un aminoácido óptimo mejora la reactividad con α 9 y la sustitución del 109° Tyr por otro aminoácido no se desea debido a que es esencial para el reconocimiento de antígenos.

Por lo tanto, un clon específico se analizó con la reactividad de α 9 de ser humano como índice, por un métodos de ingeniería evolucionaria (ciclo de mutagénesis—>filtrado—>selección —>amplificación) como sustitución de aminoácido específico del sitio del 108° y PCR propensa a errores usando kit de mutagénesis aleatoria de PCR diversificada (Clontech). Al realizar varios pasos de selección, 3 clones de HA9-107, HA9-143 y HA9-212 con mejor reactividad con α 9 de ser humano se aislaron en última instancia.

Las secuencias base de ADN de estos clones se analizaron de la misma forma que en el Ejemplo 5 y las secuencias de aminoácidos se dedujeron. Las secuencias de los clones se muestran en la Fig. 14.

«Ejemplo 19: Expresión y purificación de scFv»

Usando los clones mencionados anteriormente MA9-418, HA9-107, HA9-143 y HA9-212 y la cepa de Escherichia coli JM83 como hospedadora de ADN plásmido, se expresó y purificó el scFv. El transformante de Escherichia coli se cultivó en medio 2xYT que contiene 2% de glucosa y 100 µg/mL de ampicilina, se agregó IPTG en la fase logarítmica a una concentración final de 1 mM y las células se cultivaron durante la noche para inducir la expresión de scFv. Luego de que se completó el cultivo, las células bacterianas se recuperaron, se suspendieron en 100 mM

de solución Tris-HCl (pH 7,4) que contenía 20% de sucrosa y 10 mM de EDTA y las células bacterianas se dejaron en reposo sobre hielo durante 30 min. Luego, las células se centrifugaron a 8.900xg durante 30 min, el sobrenadante se recuperó y la fracción obtenida por filtración a través de un filtro de 0,45 µm se tomó como fracción periplásmica. Usando la fracción como material de partida, scFv se purificó según un método convencional por RPAS Purification Module (Amersham), y la fracción de elución obtenida se dializó contra PBS para dar un producto estándar de purificación scFv.

La reactividad del scFv purificado se analizó por Cell ELISA de la misma forma que en el Ejemplo 11 excepto que el anticuerpo anti-Etag etiquetado con HRP (Amersham) se usó para la detección. Como resultado, como se muestra en la Fig. 15, MA9-418, HA9-107, HA9-143 y HA9-212 mostraron mejor reactividad con α9 de ser humano en comparación con MA9-413, y particularmente HA9-212 mostró un nivel notable de mejora.

«Ejemplo 20: Construcción, expresión y purificación de scFv-Fc»

Usando MA9-418, HA9-107, HA9-143 y HA9-212, los genes scFv-Fc se construyeron de la misma forma que en el Ejemplo 9.

scFv-Fc se expresó por expresión transitoria usando célula Freestyle 293-F (Invitrogen) como hospedador. La transfección se llevó a cabo usando un reactivo de fectina 293 (Invitrogen) y la célula se cultivó en un medio de expresión Freestyle 293 (Invitrogen) durante 2-3 días y el sobrenadante de cultivo se recuperó por centrifugación y filtración con un filtro de 0,22 µm.

La purificación se realizó por cromatografía en columna de proteína A según un método convencional. La solución scFv-Fc obtenida después de la diálisis con PBS se tomó como un producto purificado.

La reactividad del producto de purificación scFv-Fc preparado con α9 de ratón y α9 de ser humano se analizó por Cell ELISA de la misma manera que en el Ejemplo 11. Como resultado, MA9-418, HA9-107, HA9-143 y HA9-212 mostraron mejor reactividad con α9 de ser humano en comparación con MA9-413, como se muestra en la Fig. 16.

<<Ejemplo 21: Análisis del clon de variante de epítipo»

Para examinar si MA9-418, HA9-107, HA9-143 y HA9-212 reconocen la región L1 de α9 de la misma manera que en MA9-413, se examinó lo siguiente. La concentración de anticuerpo de fago MA9-413 se fijó a determinado nivel, se llevó a cabo Cell ELISA de la misma forma que en el Ejemplo 4, donde scFv-Fc de cada variante se diluyó serialmente y se agregó simultáneamente con una muestra y se evaluó la presencia o ausencia de inhibición competitiva de anticuerpo de fago MA9-413. Como resultado, como se muestra en la Fig. 17, se confirmó la inhibición competitiva dependiente de la concentración. Por lo tanto, se sugirió firmemente que MA9-418, HA9-107, HA9-143 y HA9-212 reconocen la región L1 de α9, como MA9-413.

«Ejemplo 22: Evaluación de actividad inhibidora de adhesión celular dependiente de α9 de un clon variante»

Se evaluó scFv-Fc de cada clon variante para determinar la actividad inhibidora contra la adhesión celular dependiente de α9 de ser humano y α9 de ratón de la misma forma que en el Ejemplo 13. La Tabla 1 colectivamente muestra los valores de IC50. Se ha confirmado que todos los clones variantes tienen una actividad inhibidora fuerte contra α9 de ser humano en comparación con MA9-413 original. Particularmente, HA9-212 mostró una actividad inhibidora de aproximadamente 1000 veces más contra α9 de ser humano en comparación con MA9-413.

[Tabla 1]

	α9 de ser humano	A9 de ratón
MA9-413	48,5	0,34
HA9-418	>10	0. 96
HA9-107	>10	0,067
HA9-143	0,42	2,32
HA9-212	0,053	3,30

unidad: µg/mL

«Ejemplo 23: Producción y preparación de IgG»

El clon HA9-212 que mostró la mayor reactividad con α9 de ser humano se examinó para determinar la reactividad

5 en la forma molecular de IgG. La construcción genética de IgG se realizó según los siguientes procedimientos. En primer lugar, la región de gen VH de HA9-212 se amplificó por PCR y se insertó en el sitio de clonación del vector de expresión de cadena H humana. En este vector, una secuencia líder que promueve la expresión secretora extracelular, gen VH y un gen de la región constante de IgG1 humana se conectan y la expresión de estos se regula por un promotor CAG. Además, este vector contiene un gen de resistencia a la neomicina y un gen de resistencia a la ampicilina como genes de resistencia al fármaco. Luego, la región de gen VL de MA9-212 se amplificó por PCR y se insertó en el sitio de clonación del vector de expresión de cadena L humana. En este vector, una secuencia líder que promueve la expresión secretora extracelular, gen VL y un gen de la región constante de cadena κ humana se conectan y la expresión de estos se regula por un promotor CAG. El vector tiene un gen dhfr y un gen de resistencia a la ampicilina.

10 IgG se expresó por expresión transitoria usando célula COS-7 y célula Freestyle 293-F (Invitrogen) como hospedadores.

15 La transfección en célula COS-7 se llevó a cabo usando Lipofectamina2000 (Invitrogen), y la transfección en célula Freestyle 293-F se llevó a cabo usando un reactivo de fectina 293 (Invitrogen) y, después del cultivo durante 2-3 días, el sobrenadante de cultivo se recuperó por centrifugación y filtración con un filtro de 0,22 μm .

<<Ejemplo 24: Análisis de reactividad de IgG>>

20 La cantidad de expresión de IgG en el sobrenadante de cultivo se cuantificó por ELISA de cuantificación de IgG y la reactividad con $\alpha 9$ de ser humano y $\alpha 9$ de ratón en cada concentración de IgG se analizó por Cell ELISA. Se usó anticuerpo IgG(Fc) antihumano etiquetado por HRP (American Qualex) para la detección y el resto se llevó a cabo en las mismas condiciones que en el Ejemplo 11. Como resultado, como se muestra en la Fig. 18, se confirmó la reactividad dependiente de la concentración y específica con $\alpha 9$ de ser humano y $\alpha 9$ de ratón y particularmente se demostró una fuerte reactividad con $\alpha 9$ de ser humano. A partir de estos resultados, se confirmó que HA9-212 muestra reactividad con $\alpha 9$ incluso en la forma molecular de IgG.

25 De los resultados que anteceden, se confirmó que MA9-418, HA9-107, HA9-143 y HA9-212, que se obtuvieron mediante la alteración de MA9-413 tienen reactividad tanto con $\alpha 9$ de ratón como con $\alpha 9$ de ser humano, que MA9-413 tiene, y muestran una reactividad mucho mejor con $\alpha 9$ de ser humano y una actividad inhibitoria muy mejorada contra $\alpha 9$ de ser humano, mientras se mantiene la propiedad de reconocimiento de región de L1. Además, HA9-212 mostró reactividad fuerte con $\alpha 9$ de ser humano aun en la forma molecular de IgG. A partir de esto, se espera que la variante MA9-413 muestre mayor aplicabilidad como un medicamento para el tratamiento o profilaxis de artritis reumatoide, que es superior a MA9-413.

30 Aplicación industrial

35 Dado que el anticuerpo monoclonal humano y un fragmento de anticuerpo de este de la presente invención tienen regiones variables de anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ derivado de ser humano, así como reactividad específica con integrinas $\alpha 9$ de ratón y humano, actividad inhibitoria de adhesión celular dependiente de integrina $\alpha 9$, y además, acción supresora contra artritis, se espera que sean usados como nuevos fármacos para el diagnóstico, profilaxis o tratamiento de varias enfermedades implicadas por integrinas $\alpha 9$.

Esta aplicación se basa en la solicitud de patente n.º2007- 340203 presentada en Japón (fecha de presentación: 28 de diciembre de 2007)

Listado de secuencias

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

<120> Anticuerpo anti-integrina alpha-9 humano

5 <130> 091333

<150> JP2007-340203

<151> 2007-12-28

<160> 40

<170> PatentIn version 3.4

10 <210> 1

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Gly Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Glu Asn Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

15 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 2

Asp Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

ES 2 582 277 T3

Gly

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Asp Glu Asn Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 1 5 10 15
 Val

<210> 5
 10 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgcctttggt gattatggca tgagctgggt ccgccaagct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atggtggtag cacaggttat 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccacc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gagagatgag 300
 aattacgata ttttgactgg ttactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctca 378

15 <210> 6
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
 85 90 95

20 Thr Val Trp Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 7
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 7

ES 2 582 277 T3

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 9
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
 1 5

<210> 10
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 cagtctgtcg tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
 tcctgctctg gaagcagctc caacattggc aataattatg taccctggta ccaacaactc 120
 ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agagaccgtc agggattcct 180
 gaccgattct ctgcctccaa gtctggcaag tcagccacc tgggcatcac cggactccag 240
 actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgac tgtctgggcc 300
 ttcggcgggtg ggaccaagct gaccgtccta ggt 333

20 <210> 11
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> enlazador que incluye scFv

<400> 11

ES 2 582 277 T3

gaggtgcagc tggtagtc tgggggaggt gtggtacggc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgcctttggt gattatggca tgagctgggt ccgccaagct 120
 ccaggaagg ggctggagt ggtctctggt attaattgga atggtgtag cacaggttat 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccacc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gagagatgag 300
 aattacgata ttttgactgg ttactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctcagg tggaggcggg tcaggcggag gtggctctgg cgggaggcga 420
 tcgcagtctg tcgtgacgca gccgccctca gtgtctgcgg ccccaggaca gaaggtcacc 480
 atctcctgct ctggaagcag ctccaacatt ggcaataatt atgtatcctg gtaccaacaa 540
 ctcccaggaa cagcccccaa actcctcatt tatgacaata ataagagacc gtcagggatt 600
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acgtcagcca ccctgggcat caccggactc 660
 cagactgggg acgaggccga ttattactgc ggaacatggg atagcagcct gactgtctgg 720
 gccttcggcg gtgggaccaa gctgaccgtc ctaggt 756

<210> 12
 <211> 126
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Gly Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Thr Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Glu Asn Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

10 <210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Asp Tyr Gly Met Ser
 15 1 5

ES 2 582 277 T3

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 14
 Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Asp Glu Asn Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 1 5 10 15

Val

15 <210> 16
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgcctttggt gattatggca tgagctgggt cgcccaagct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atggtggtag cacaggttat 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccacc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gagagatgag 300
 aattacgata ttttgactgg tgccctactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 20 acggtcaccg tctcctca 378

<210> 17
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> enlazador que incluye scFv
 <400> 17

ES 2 582 277 T3

gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgcctttggt gattatggca tgagctgggt ccgccaagct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atggtgtag cacaggttat 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccacc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gagagatgag 300
 aattacgata ttttgactgg tgcctactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctcagg tggaggcgggt tcaggcggag gtggctctgg cggtgggcga 420
 tcgcagtctg tcgtgacgca gccgccctca gtgtctgcgg ccccaggaca gaaggtcacc 480
 atctcctgct ctggaagcag ctccaacatt ggcaataatt atgtatcctg gtaccaacaa 540
 ctcccaggaa cagcccccaa actcctcatt tatgacaata ataagagacc gtcagggatt 600
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acgtcagcca ccctgggcat caccggactc 660
 cagactgggg acgaggccga ttattactgc ggaacatggg atagcagcct gactgtctgg 720
 gccttcggcg gtgggaccaa gctgaccgtc ctaggt 756

<210> 18
 <211> 126
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Gly Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Thr Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Glu Asn Tyr Asp Ile Leu Thr Asn Glu Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Asp Tyr Gly Met Ser
 1 5

ES 2 582 277 T3

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 20
 Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 21
 Asp Glu Asn Tyr Asp Ile Leu Thr Asn Glu Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 1 5 10 15

Val

<210> 22
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

15 <400> 22__
 gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgcctttggt gattatggca tgagctgggt ccgccaagct 120
 ccaggaaggg ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atgggtgtag cacaggttat 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccacc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gagagatgag 300
 aattacgata ttttgactaa tgagtactac tatggtatgg atgtctgggg tcaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctca 378

20 <210> 23
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> enlazador que incluye scFv

<400> 23
 gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgcctttggt gattatggca tgagctgggt ccgccaagct 120
 ccaggaaggg ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atgggtgtag cacaggttat 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccacc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gagagatgag 300
 aattacgata ttttgactaa tgagtactac tatggtatgg atgtctgggg tcaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctcag tggaggcggg tcaggcggag gtggctctgg cggtggcgga 420
 tcgcagtctg tcgtgacgca gccgccctca gtgtctgctg ccccaggaca gaaggtcacc 480

ES 2 582 277 T3

atctcctgct ctggaagcag ctccaacatt ggcaataatt atgtatcctg gtaccaacaa 540
 ctcccaggaa cagcccccaa actcctcatt tatgacaata ataagagacc gtcagggatt 600
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acgtcagcca ccctgggcat caccggactc 660
 cagactgggg acgaggccga ttattactgc ggaacatggg atagcagcct gactgtctgg 720
 gccttcggcg gtgggaccaa gctgaccgtc ctaggt 756

<210> 24
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 24
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Gly Glu Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Thr Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Glu Asn Tyr Asp Ile Leu Thr Gly His Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 25
 Glu Tyr Gly Met Ser
 1 5

15

<210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

20

Gly
 <210> 27
 <211> 17

ES 2 582 277 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 Asp Glu Asn Tyr Asp Ile Leu Thr Gly His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 1 5 10 15

Val

5 <210> 28
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgcctttggt gaatatggca tgagctgggt ccgccaagct 120
 ccaggaagg ggctggagt ggtctctggt attaattgga atggtggtag cacaggttat 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccacc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gagagatgag 300
 aattacgata ttttgactgg gcattactac tatggtatgg atgtctgggg tcaagggacc 360

10 acggtcaccg tctcctca 378

<210> 29
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> enlazador que incluye scFv

<400> 29
 gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgcctttggt gaatatggca tgagctgggt ccgccaagct 120
 ccaggaagg ggctggagt ggtctctggt attaattgga atggtggtag cacaggttat 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccacc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gagagatgag 300
 aattacgata ttttgactgg gcattactac tatggtatgg atgtctgggg tcaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctcagg tggaggcggg tcaggcggag gtggctctgg cgggtggcggg 420
 tcgcagtctg tcgtgacgca gccgccctca gtgtctgcgg ccccaggaca gaaggtcacc 480
 atctcctgct ctggaagcag ctccaacatt ggcaataatt atgtatcctg gtaccaacaa 540
 ctcccaggaa cagcccccaa actcctcatt tatgacaata ataagagacc gtcagggatt 600
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acgtcagcca ccttgggcat caccggactc 660
 cagactgggg acgaggccga ttattactgc ggaacatggg atagcagcct gactgtctgg 720

20 gccttcggcg gtgggaccaa gctgaccgtc ctaggt 756

<210> 30
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 30

ES 2 582 277 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Gly Glu Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Thr Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Glu Asn Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 31

Glu Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 32

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 33

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Asp Glu Asn Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

20 <210> 34

<211> 378

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

ES 2 582 277 T3

gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgcctttggt gtagtatggca tgagctgggt ccgccaagct 120
 ccaggaaggg ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atggtggtag cacaggttat 180
 gcagactctg tgcagggccg attcaccacc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gagagatgag 300
 aattacgata ttttgactgg taactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctca 378

<210> 35
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> enlazador que incluye scFv

<400> 35
 gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgcctttggt gtagtatggca tgagctgggt ccgccaagct 120
 ccaggaaggg ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atggtggtag cacaggttat 180
 gcagactctg tgcagggccg attcaccacc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gagagatgag 300
 aattacgata ttttgactgg taactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctcagg tggagggcgt tcagggcgag gtggctctgg cggtagggcga 420
 tcgcagtctg tcgtgacgca gccgccctca gtgtctgcgg ccccaggaca gaaggtcacc 480
 atctctgct ctggaagcag ctccaacatt ggcaataatt atgtatcctg gtaccaacaa 540
 ctcccaggaa cagcccccaa actcctcatt tatgacaata ataagagacc gtcagggatt 600
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acgtcagcca ccctgggcat caccggactc 660
 cagactgggg acgagggcga ttattactgc ggaacatggg atagcagcct gactgtctgg 720
 gccttcggcg gtgggaccaa gctgaccgtc ctaggt 756

<210> 36
 <211> 1035
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 36

10

ES 2 582 277 T3

Met Gly Gly Pro Ala Ala Pro Arg Gly Ala Gly Arg Leu Arg Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Ala Leu Val Val Ala Gly Ile Pro Ala Gly Ala Tyr Asn Leu
20 25 30

Asp Pro Gln Arg Pro Val His Phe Gln Gly Pro Ala Asp Ser Phe Phe
35 40 45

Gly Tyr Ala Val Leu Glu His Phe His Asp Asn Thr Arg Trp Val Leu
50 55 60

Val Gly Ala Pro Lys Ala Asp Ser Lys Tyr Ser Pro Ser Val Lys Ser
65 70 75 80

Pro Gly Ala Val Phe Lys Cys Arg Val His Thr Asn Pro Asp Arg Arg
85 90 95

ES 2 582 277 T3

Cys Thr Glu Leu Asp Met Ala Arg Gly Lys Asn Arg Gly Thr Ser Cys
 100 105 110

Gly Lys Thr Cys Arg Glu Asp Arg Asp Asp Glu Trp Met Gly Val Ser
 115 120 125

Leu Ala Arg Gln Pro Lys Ala Asp Gly Arg Val Leu Ala Cys Ala His
 130 135 140

Arg Trp Lys Asn Ile Tyr Tyr Glu Ala Asp His Ile Leu Pro His Gly
 145 150 155 160

Phe Cys Tyr Ile Ile Pro Ser Asn Leu Gln Ala Lys Gly Arg Thr Leu
 165 170 175

Ile Pro Cys Tyr Glu Glu Tyr Lys Lys Lys Tyr Gly Glu Glu His Gly
 180 185 190

Ser Cys Gln Ala Gly Ile Ala Gly Phe Phe Thr Glu Glu Leu Val Val
 195 200 205

Met Gly Ala Pro Gly Ser Phe Tyr Trp Ala Gly Thr Ile Lys Val Leu
 210 215 220

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

Asn Arg Arg Tyr Thr Tyr Leu Gly Tyr Ala Val Thr Ala Gly His Phe
 245 250 255

Ser His Pro Ser Thr Ile Asp Val Val Gly Gly Ala Pro Gln Asp Lys
 260 265 270

Gly Ile Gly Lys Val Tyr Ile Phe Arg Ala Asp Arg Arg Ser Gly Thr
 275 280 285

Leu Ile Lys Ile Phe Gln Ala Ser Gly Lys Lys Met Gly Ser Tyr Phe
 290 295 300

Gly Ser Ser Leu Cys Ala Val Asp Leu Asn Gly Asp Gly Leu Ser Asp
 305 310 315 320

Leu Leu Val Gly Ala Pro Met Phe Ser Glu Ile Arg Asp Glu Gly Gln
 325 330 335

Val Thr Val Tyr Ile Asn Arg Gly Asn Gly Ala Leu Glu Glu Gln Leu

ES 2 582 277 T3

Leu Pro Pro Leu Thr Pro Val Leu Arg Trp Lys Lys Gly Gln Lys Ile
 595 600 605

Ala Gln Lys Asn Gln Thr Val Phe Glu Arg Asn Cys Arg Ser Glu Asp
 610 615 620

Cys Ala Ala Asp Leu Gln Leu Gln Gly Lys Leu Leu Leu Ser Ser Met
 625 630 635 640

Asp Glu Lys Thr Leu Tyr Leu Ala Leu Gly Ala Val Lys Asn Ile Ser
 645 650 655

Leu Asn Ile Ser Ile Ser Asn Leu Gly Asp Asp Ala Tyr Asp Ala Asn
 660 665 670

Val Ser Phe Asn Val Ser Arg Glu Leu Phe Phe Ile Asn Met Trp Gln
 675 680 685

Lys Glu Glu Met Gly Ile Ser Cys Glu Leu Leu Glu Ser Asp Phe Leu
 690 695 700

Lys Cys Ser Val Gly Phe Pro Phe Met Arg Ser Lys Ser Lys Tyr Glu
 705 710 715 720

Phe Ser Val Ile Phe Asp Thr Ser His Leu Ser Gly Glu Glu Glu Val
 725 730 735

Leu Ser Phe Ile Val Thr Ala Gln Ser Gly Asn Thr Glu Arg Ser Glu
 740 745 750

Ser Leu His Asp Asn Thr Leu Val Leu Met Val Pro Leu Met His Glu
 755 760 765

Val Asp Thr Ser Ile Thr Gly Ile Met Ser Pro Thr Ser Phe Val Tyr
 770 775 780

Gly Glu Ser Val Asp Ala Ala Asn Phe Ile Gln Leu Asp Asp Leu Glu
 785 790 795 800

Cys His Phe Gln Pro Ile Asn Ile Thr Leu Gln Val Tyr Asn Thr Gly
 805 810 815

Pro Ser Thr Leu Pro Gly Ser Ser Val Ser Ile Ser Phe Pro Asn Arg
 820 825 830

Leu Ser Ser Gly Gly Ala Glu Met Phe His Val Gln Glu Met Val Val
 835 840 845

ES 2 582 277 T3

Gly Gln Glu Lys Gly Asn Cys Ser Phe Gln Lys Asn Pro Thr Pro Cys
850 855 860

Ile Ile Pro Gln Glu Gln Glu Asn Ile Phe His Thr Ile Phe Ala Phe
865 870 875 880

Phe Thr Lys Ser Gly Arg Lys Val Leu Asp Cys Glu Lys Pro Gly Ile
885 890 895

Ser Cys Leu Thr Ala His Cys Asn Phe Ser Ala Leu Ala Lys Glu Glu
900 905 910

Ser Arg Thr Ile Asp Ile Tyr Met Leu Leu Asn Thr Glu Ile Leu Lys
915 920 925

Lys Asp Ser Ser Ser Val Ile Gln Phe Met Ser Arg Ala Lys Val Lys
930 935 940

Val Asp Pro Ala Leu Arg Val Val Glu Ile Ala His Gly Asn Pro Glu
945 950 955 960

Glu Val Thr Val Val Phe Glu Ala Leu His Asn Leu Glu Pro Arg Gly
965 970 975

Tyr Val Val Gly Trp Ile Ile Ala Ile Ser Leu Leu Val Gly Ile Leu
980 985 990

Ile Phe Leu Leu Leu Ala Val Leu Leu Trp Lys Met Gly Phe Phe Arg
995 1000 1005

Arg Arg Tyr Lys Glu Ile Ile Glu Ala Glu Lys Asn Arg Lys Glu
1010 1015 1020

Asn Glu Asp Ser Trp Asp Trp Val Gln Lys Asn Gln
1025 1030 1035

<210> 37
<211> 1036
<212> PRT
<213> ratón

5

<400> 37
Met Gly Gly Pro Ala Gly Leu Arg Thr Gly Ala Gly Gly Leu Arg Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Leu Val Ala Ala Gly Val Pro Ala Gly Ala Tyr Asn
20 25 30

ES 2 582 277 T3

Leu Asp Ala Gln Arg Pro Val Arg Phe Gln Gly Pro Ser Gly Ser Phe
 35 40 45
 Phe Gly Tyr Ala Val Leu Glu His Phe His Glu Asn Thr Arg Trp Val
 50 55 60
 Leu Val Gly Ala Pro Lys Ala Asp Ser Lys Tyr Ser Thr Ser Val Lys
 65 70 75 80
 Ser Pro Gly Ala Val Phe Lys Cys Arg Val His Thr Asn Pro Glu Arg
 85 90 95
 Arg Cys Thr Glu Leu Asp Met Ala Arg Gly Arg Thr Arg Gly Ala Pro
 100 105 110
 Cys Gly Lys Thr Cys Arg Gly Asp Arg Asp Asp Glu Trp Met Gly Val
 115 120 125
 Ser Leu Ala Arg Gln Pro Arg Ala Asp Gly Arg Val Leu Ala Cys Ala
 130 135 140
 His Arg Trp Lys Asn Ile Tyr Tyr Glu Ala Asp Gln Ile Leu Ala His
 145 150 155 160
 Gly Phe Cys Tyr Leu Ile Pro Ser Asn Leu Gln Ala Lys Gly Lys Val
 165 170 175
 Leu Ile Pro Cys Tyr Glu Glu Tyr Lys Lys Lys Tyr Gly Glu Glu His
 180 185 190
 Gly Ser Cys Gln Ala Gly Ile Ala Gly Phe Phe Thr Glu Glu Leu Val
 195 200 205
 Val Met Gly Ala Pro Gly Ser Phe Tyr Trp Ala Gly Thr Leu Lys Val
 210 215 220
 Leu Asn Leu Thr Asp Asn Thr Tyr Phe Lys Leu Asn Asp Glu Ala Ile
 225 230 235 240
 Met Asn Arg Arg Tyr Thr Tyr Leu Gly Tyr Ala Val Thr Ala Gly His
 245 250 255
 Phe Ser His Pro Ser Ile Thr Asp Val Val Gly Gly Ala Pro Gln Asp
 260 265 270
 Glu Gly Ile Gly Lys Val Tyr Ile Phe Arg Ala Asp Arg Arg Ser Gly
 275 280 285

ES 2 582 277 T3

Thr Leu Val Lys Ile Phe Gln Ala Ser Gly Lys Lys Met Gly Ser Tyr
 290 295 300

Phe Gly Ser Ser Leu Cys Ala Val Asp Leu Asn Met Asp Gly Leu Ser
 305 310 315 320

Asp Leu Leu Val Gly Ala Pro Met Phe Ser Glu Ile Arg Asp Glu Gly
 325 330 335

Gln Val Thr Val Tyr Leu Asn Gln Gly His Gly Ala Leu Glu Glu Gln
 340 345 350

Leu Thr Leu Thr Gly Asp Ala Ala Tyr Asn Ala His Phe Gly Glu Ser
 355 360 365

Ile Ala Asn Leu Gly Asp Ile Asp Asp Asp Gly Phe Pro Asp Val Ala
 370 375 380

Val Gly Ala Pro Lys Glu Glu Asp Phe Ala Gly Ala Val Tyr Ile Tyr
 385 390 395 400

His Gly Asp Ala Asn Gly Ile Val Pro Lys Tyr Ser Met Lys Leu Ser
 405 410 415

Gly Arg Arg Leu Asn Pro Thr Leu Arg Met Phe Gly Gln Ser Ile Ser
 420 425 430

Gly Gly Ile Asp Met Asp Gly Asn Gly Tyr Pro Asp Val Thr Ile Gly
 435 440 445

Ala Phe Leu Ser Asp Ser Val Val Leu Leu Arg Ala Arg Pro Val Ile
 450 455 460

Thr Val Asp Val Ser Ile Phe Leu Pro Gly Ser Ile Asn Ile Thr Ala
 465 470 475 480

Pro Gln Cys His Asp Gly Gln Gln Pro Val Asn Cys Leu Asn Val Thr
 485 490 495

Val Cys Phe Arg Phe His Gly Lys Asn Val Pro Gly Glu Ile Gly Leu
 500 505 510

Asn Tyr Asn Leu Thr Ala Asp Val Ala Gln Lys Glu Lys Gly Gln Leu
 515 520 525

Pro Arg Val Tyr Phe Val Leu Phe Gly Glu Thr Ala Gly Gln Val Ser

ES 2 582 277 T3

Tyr Gly Glu Ser Val Asp Ala Ser Asn Phe Ile Gln Leu Asp Asp Gln
 785 790 795 800
 Glu Cys His Phe Gln Pro Val Asn Ile Thr Leu Gln Val Tyr Asn Met
 805 810 815
 Gly Pro Ser Thr Leu Pro Gly Ser Ser Val Ser Ile Ser Phe Pro Ser
 820 825 830
 Arg Leu Ser Pro Gly Gly Ala Glu Met Phe Gln Val Gln Asp Met Val
 835 840 845
 Val Ser Gln Glu Lys Gly Asn Cys Ser Leu Gln Arg Asn Pro Thr Pro
 850 855 860
 Cys Ile Ile Pro Gln Glu Gln Glu Asn Ile Phe His Thr Ile Phe Ala
 865 870 875 880
 Phe Phe Ser Lys Ser Gly Arg Lys Val Leu Asp Cys Glu Lys Pro Gly
 885 890 895
 Ser Phe Cys Leu Thr Leu His Cys Asn Leu Ser Ala Leu Pro Lys Glu
 900 905 910
 Glu Ser Arg Thr Ile Asn Leu Tyr Met Leu Leu Asn Thr Glu Ile Leu
 915 920 925
 Lys Lys Asp Ser Ser Ser Val Ile Gln Phe Met Ala Arg Ala Lys Val
 930 935 940
 Lys Val Glu Pro Ala Leu Arg Val Val Glu Ile Ala Asn Gly Asn Pro
 945 950 955 960
 Glu Glu Thr Leu Val Val Phe Glu Ala Leu His Asn Leu Glu Pro Arg
 965 970 975
 Gly Tyr Val Val Gly Trp Ile Ile Ala Ile Ser Leu Leu Val Gly Ile
 980 985 990
 Leu Ile Phe Leu Leu Leu Ala Val Leu Leu Trp Lys Met Gly Phe Phe
 995 1000 1005
 Arg Arg Arg Tyr Lys Glu Ile Ile Glu Ala Glu Lys Asn Arg Lys
 1010 1015 1020
 Glu Asn Glu Asp Gly Trp Asp Trp Val Gln Lys Asn Gln
 1025 1030 1035

<210> 38

<211> 430

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 38

ES 2 582 277 T3

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

ES 2 582 277 T3

Gly His Phe Arg Ser Gln His Thr Thr Glu Val Val Gly Gly Ala Pro
225 230 235 240

Gln His Glu Gln Ile Gly Lys Ala Tyr Ile Phe Ser Ile Asp Glu Lys
245 250 255

Glu Leu Asn Ile Leu His Glu Met Lys Gly Lys Lys Leu Gly Ser Tyr
260 265 270

Phe Gly Ala Ser Val Cys Ala Val Asp Leu Asn Ala Asp Gly Phe Ser
275 280 285

Asp Leu Leu Val Gly Ala Pro Met Gln Ser Thr Ile Arg Glu Glu Gly
290 295 300

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

Met Glu Thr Asn Leu Val Gly Ser Asp Lys Tyr Ala Ala Arg Phe Gly
325 330 335

Glu Ser Ile Val Asn Leu Gly Asp Ile Asp Asn Asp Gly Phe Glu Asp
340 345 350

Val Ala Ile Gly Ala Pro Gln Glu Asp Asp Leu Gln Gly Ala Ile Tyr
355 360 365

Ile Tyr Asn Gly Arg Ala Asp Gly Ile Ser Ser Thr Phe Ser Gln Arg
370 375 380

Ile Glu Gly Leu Gln Ile Ser Lys Ser Leu Ser Met Phe Gly Gln Ser
385 390 395 400

Ile Ser Gly Gln Ile Asp Ala Asp Asn Asn Gly Tyr Val Asp Val Ala
405 410 415

Val Gly Ala Phe Arg Ser Asp Ser Ala Val Leu Leu Arg Thr
420 425 430

<210> 39

<211> 430

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión

<400> 39

ES 2 582 277 T3

Phe Asn Leu Asp Ala Glu Arg Pro Val His Phe Gln Gly Pro Ala Asp
 1 5 10 15
 Ser Phe Phe Gly Tyr Ala Val Leu Glu His Phe His Asp Asn Thr Arg
 20 25 30
 Trp Val Leu Val Gly Ala Pro Lys Ala Asp Ser Lys Tyr Ser Pro Ser
 35 40 45
 Val Lys Ser Pro Gly Ala Val Phe Lys Cys Arg Val His Thr Asn Pro
 50 55 60
 Asp Arg Arg Cys Thr Glu Leu Asp Met Ala Arg Gly Lys Asn Arg Gly
 65 70 75 80
 Thr Ser Cys Gly Lys Thr Cys Arg Glu Asp Arg Asp Asp Glu Trp Met
 85 90 95
 Gly Val Ser Leu Ala Arg Gln Pro Lys Ala Asp Gly Arg Val Leu Ala
 100 105 110
 Cys Ala His Arg Trp Lys Asn Ile Tyr Tyr Glu Ala Asp His Ile Leu
 115 120 125
 Pro His Gly Phe Cys Tyr Ile Ile Pro Ser Asn Leu Gln Ala Lys Gly
 130 135 140
 Arg Thr Leu Ile Pro Cys Tyr Glu Glu Tyr Lys Lys Lys Tyr Gly Glu
 145 150 155 160
 Glu His Gly Ser Cys Gln Ala Gly Ile Ala Gly Phe Phe Thr Glu Glu
 165 170 175
 Leu Val Val Met Gly Ala Pro Gly Ser Phe Tyr Trp Ala Gly Thr Ile
 180 185 190
 Lys Val Leu Asn Leu Thr Asp Asn Thr Tyr Leu Lys Leu Asn Asp Glu
 195 200 205
 Val Ile Met Asn Arg Arg Tyr Thr Tyr Leu Gly Tyr Ala Val Thr Ala
 210 215 220
 Gly His Phe Ser His Pro Ser Thr Ile Asp Val Val Gly Gly Ala Pro
 225 230 235 240
 Gln Asp Lys Gly Ile Gly Lys Val Tyr Ile Phe Arg Ala Asp Arg Arg
 245 250 255

ES 2 582 277 T3

Ser Gly Thr Leu Ile Lys Ile Phe Gln Ala Ser Gly Lys Lys Met Gly
260 265 270

Ser Tyr Phe Gly Ser Ser Leu Cys Ala Val Asp Leu Asn Gly Asp Gly
275 280 285

Leu Ser Asp Leu Leu Val Gly Ala Pro Met Phe Ser Glu Ile Arg Asp
290 295 300

Glu Gly Gln Val Thr Val Tyr Ile Asn Arg Gly Asn Gly Ala Leu Glu
305 310 315 320

Glu Gln Leu Ala Leu Thr Gly Asp Gly Ala Tyr Asn Ala His Phe Gly
325 330 335

Glu Ser Ile Ala Ser Leu Asp Asp Leu Asp Asn Asp Gly Phe Pro Asp
340 345 350

Val Ala Ile Gly Ala Pro Lys Glu Asp Asp Phe Ala Gly Ala Val Tyr
355 360 365

Ile Tyr His Gly Asp Ala Gly Gly Ile Val Pro Gln Tyr Ser Met Lys
370 375 380

Leu Ser Gly Gln Lys Ile Asn Pro Val Leu Arg Met Phe Gly Gln Ser
385 390 395 400

Ile Ser Gly Gly Ile Asp Met Asp Gly Asn Gly Tyr Pro Asp Val Thr
405 410 415

Val Gly Ala Phe Met Ser Asp Ser Val Val Leu Leu Arg Ala
420 425 430

<210> 40
<211> 430
<212> PRT
<213> ratón

5

<400> 40
Tyr Asn Leu Asp Ala Gln Arg Pro Val Arg Phe Gln Gly Pro Ser Gly
1 5 10 15

Ser Phe Phe Gly Tyr Ala Val Leu Glu His Phe His Asp Asn Thr Arg
20 25 30

Trp Val Leu Val Gly Ala Pro Lys Ala Asp Ser Lys Tyr Ser Thr Ser
35 40 45

ES 2 582 277 T3

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

Asp Arg Arg Cys Thr Glu Leu Asp Met Ala Arg Gly Arg Thr Arg Gly
65 70 75 80

Ala Pro Cys Gly Lys Thr Cys Arg Gly Asp Arg Asp Asp Glu Trp Met
85 90 95

Gly Val Ser Leu Ala Arg Gln Pro Arg Ala Asp Gly Arg Val Leu Ala
100 105 110

Cys Ala His Arg Trp Lys Asn Ile Tyr Tyr Glu Ala Asp His Ile Leu
115 120 125

Pro His Gly Phe Cys Tyr Leu Ile Pro Ser Asn Leu Gln Ala Lys Gly
130 135 140

Lys Val Leu Ile Pro Cys Tyr Glu Glu Tyr Lys Lys Lys Tyr Gly Glu
145 150 155 160

Glu His Gly Ser Cys Gln Ala Gly Ile Ala Gly Phe Phe Thr Glu Glu
165 170 175

Leu Val Val Met Gly Ala Pro Gly Ser Phe Tyr Trp Ala Gly Thr Leu
180 185 190

Lys Val Leu Asn Leu Thr Asp Asn Thr Tyr Phe Lys Leu Asn Asp Glu
195 200 205

Ala Ile Met Asn Arg Arg Tyr Thr Tyr Leu Gly Tyr Ala Val Thr Ala
210 215 220

Gly His Phe Ser His Pro Ser Ile Thr Asp Val Val Gly Gly Ala Pro
225 230 235 240

Gln Asp Glu Gly Ile Gly Lys Val Tyr Ile Phe Arg Ala Asp Arg Arg
245 250 255

Ser Gly Thr Leu Val Lys Ile Phe Gln Ala Ser Gly Lys Lys Met Gly
260 265 270

Ser Tyr Phe Gly Ser Ser Leu Cys Ala Val Asp Leu Asn Met Asp Gly
275 280 285

Leu Ser Asp Leu Leu Val Gly Ala Pro Met Phe Ser Glu Ile Arg Asp
290 295 300

ES 2 582 277 T3

Glu Gly Gln Val Thr Val Tyr Leu Asn Gln Gly His Gly Ala Leu Glu
 305 310 315 320

Glu Gln Leu Thr Leu Thr Gly Asp Ala Ala Tyr Asn Ala His Phe Gly
 325 330 335

Glu Ser Ile Ala Asn Leu Gly Asp Ile Asp Asp Asp Gly Phe Pro Asp
 340 345 350

Val Ala Val Gly Ala Pro Lys Glu Glu Asp Phe Ala Gly Ala Val Tyr
 355 360 365

Ile Tyr His Gly Asp Ala Asn Gly Ile Val Pro Lys Tyr Ser Met Lys
 370 375 380

Leu Ser Gly Arg Arg Leu Asn Pro Thr Leu Arg Met Phe Gly Gln Ser
 385 390 395 400

Ile Ser Gly Gly Ile Asp Met Asp Gly Asn Gly Tyr Pro Asp Val Thr
 405 410 415

Ile Gly Ala Phe Leu Ser Asp Ser Val Val Leu Leu Arg Ala
 420 425 430

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano a o fragmento de anticuerpo que reconoce integrina $\alpha 9$ de ser humano e integrina $\alpha 9$ de ratón inhibe la reacción entre las integrinas $\alpha 9$ y ligandos, y que reconoce un epítipo que comprende residuos 104 (Arg) a 122 (Asp) de integrina $\alpha 9$ de ser humano (SEQ ID NO:36), y un epítipo que comprende residuos 105 (Arg) a 123 (Asp) de integrina $\alpha 9$ de ratón (SEQ ID NO:37).
- 2.** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene (a) regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada y (b) regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (CDR1, CDR2, CDR3), dichas regiones consisten en las secuencias de aminoácidos mostradas por los siguientes números de identificación de secuencias, respectivamente.
- 10 (a) Regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada CDR1, CDR2, CDR3
- SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4;
 SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15;
 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21;
 SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27; o
- 15 SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33;
- (b) Regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera CDR1, CDR2, CDR3
- SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:3
- 3.** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada CDR1, CDR2, CDR3, dichas regiones consisten en las secuencias de aminoácidos mostradas por SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, y SEQ ID NO:33, respectivamente.
- 20 **4.** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por cualquiera de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:24, y SEQ ID NO:30, y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO:6.
- 25 **5.** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, que tiene una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO:30.
- 6.** El anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el anticuerpo es un anticuerpo completo.
- 7.** El fragmento de anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el fragmento de anticuerpo es scFv o scFv-Fc.
- 30 **8.** Un gen que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 9.** Un vector de expresión recombinante que comprende el gen de acuerdo con la reivindicación 8.
- 10.** Un transformante que incorpora el gen de acuerdo con la reivindicación 8.
- 35 **11.** Un método no terapéutico y no diagnóstico para producir un anticuerpo anti-integrina $\alpha 9$ de ser humano o fragmento de anticuerpo permitiendo que el gen de acuerdo con la reivindicación 8 sea expresado en un hospedador.
- 12.** Un agente profiláctico o terapéutico para artritis reumatoide que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 40 **13.** Un uso del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la producción de un agente profiláctico o terapéutico para artritis reumatoide.
- 14.** El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para el uso en la prevención o tratamiento de artritis reumatoide.

FIG. 1

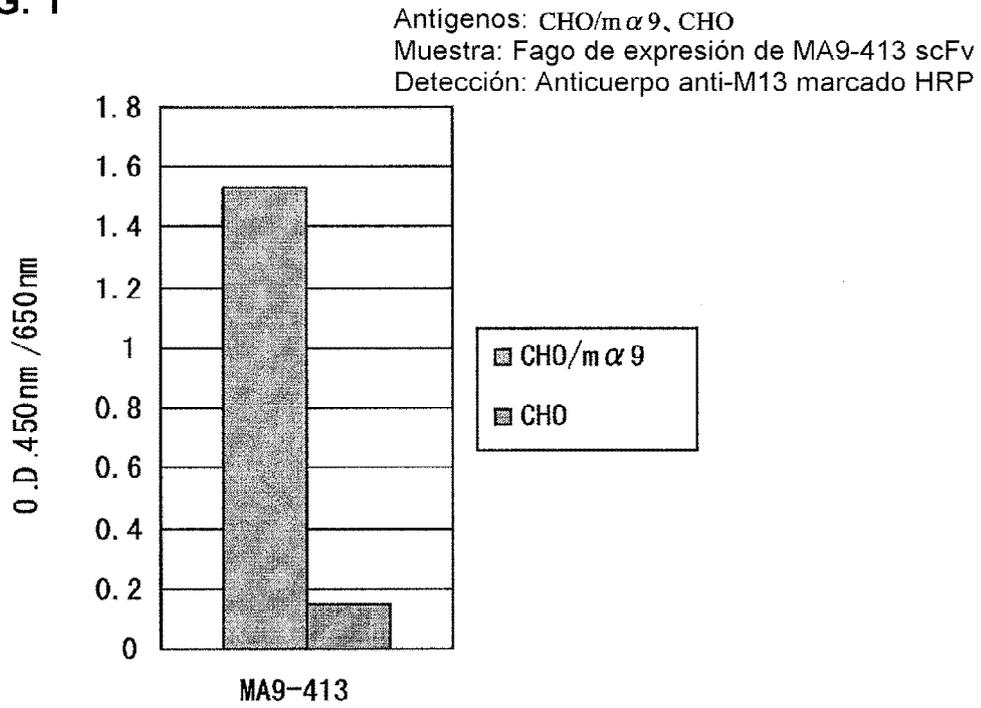


FIG. 2

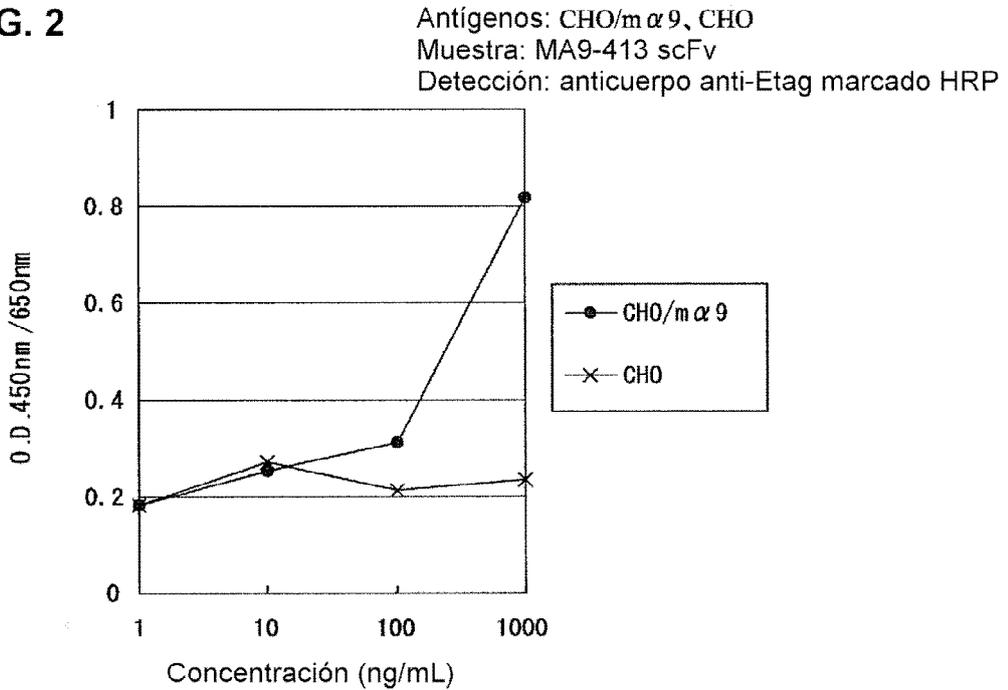


FIG. 3

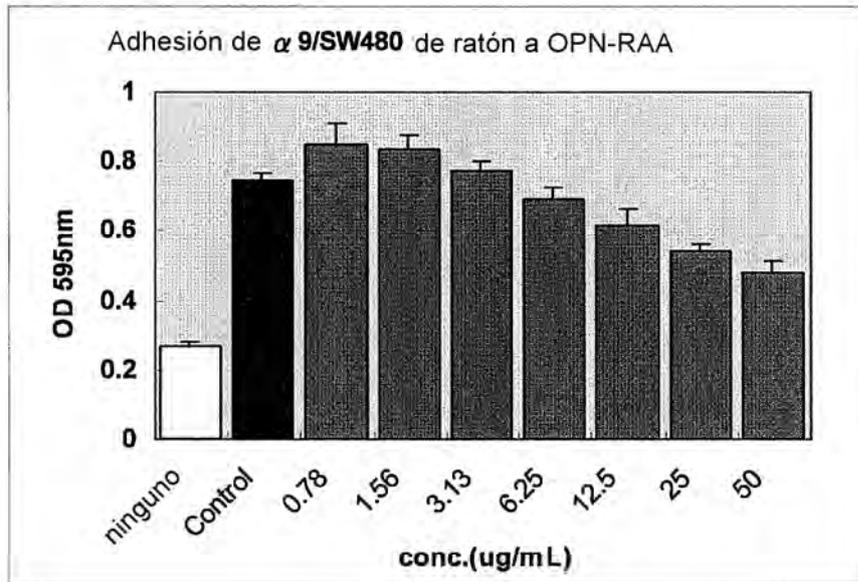


FIG. 4

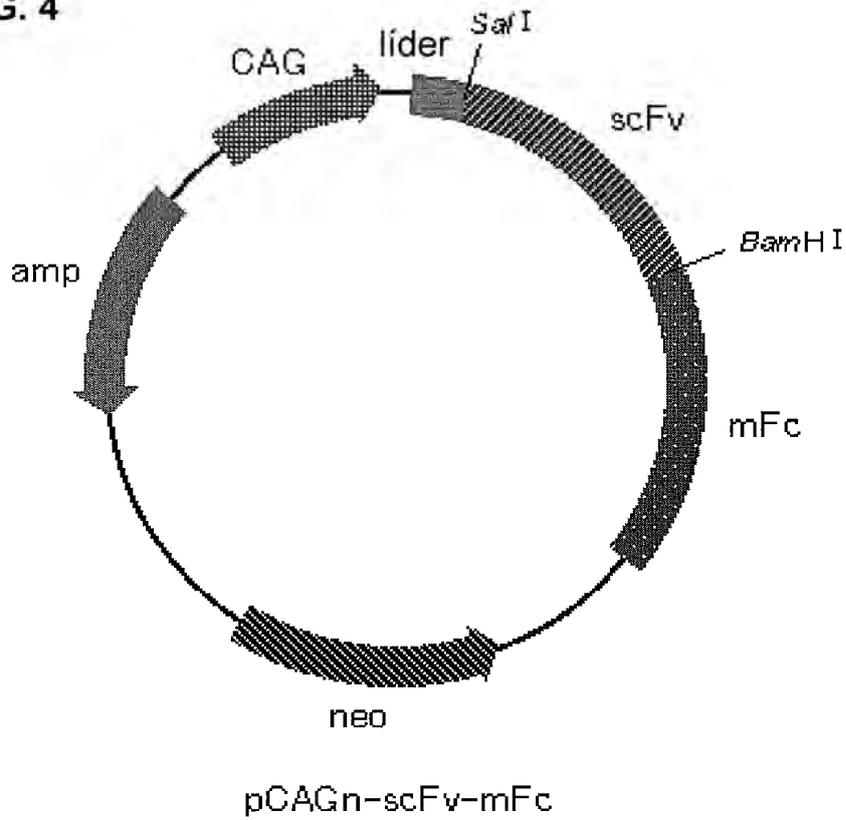


FIG. 5

Antígenos: SW480/m α 9, SW480/h α 9, SW480
 Muestras: MA9-413 scFv-Fc, Y9A2
 Detección: anticuerpo IgG anti-ratón marcado HRP

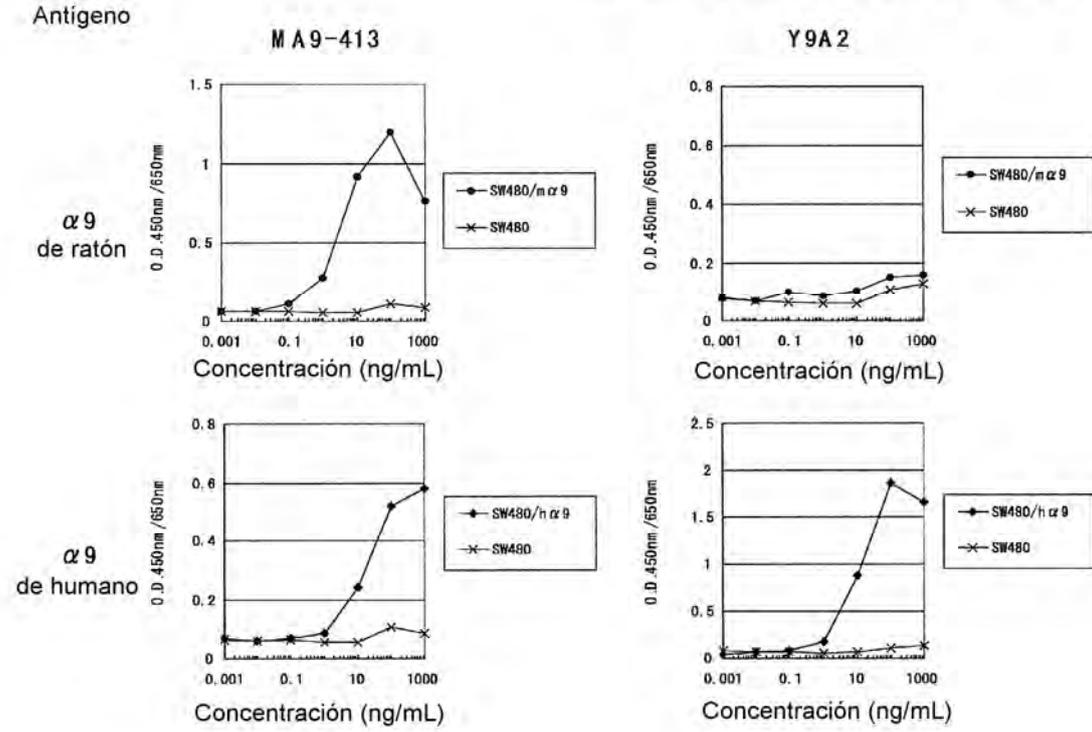
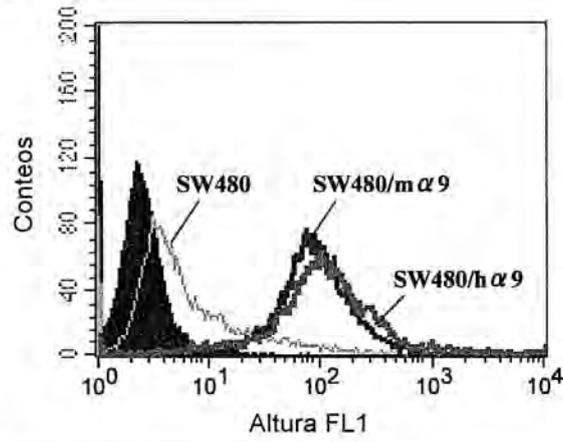
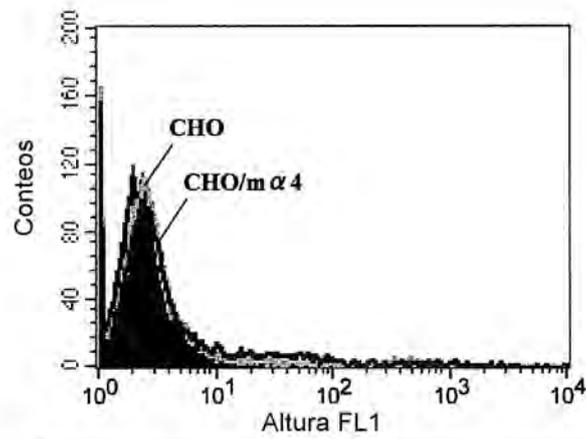


FIG. 6



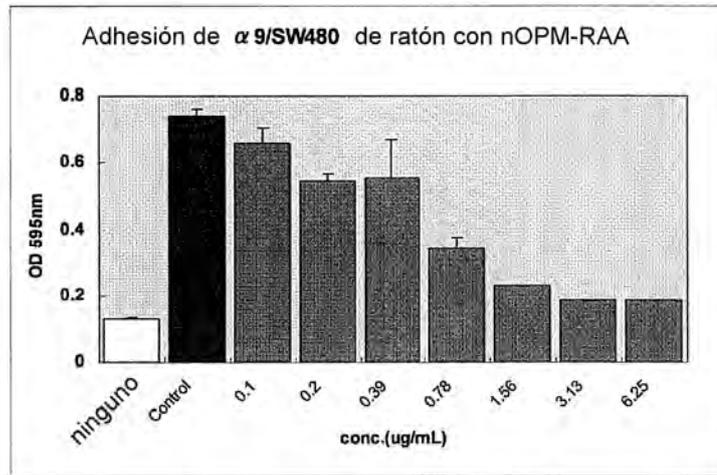
	Célula	Anticuerpo
■	SW480	Ab control isotipo
—	SW480	MA9-413 scFv-Fc
—	SW480/m α 9	MA9-413 scFv-Fc
—	SW480/h α 9	MA9-413 scFv-Fc



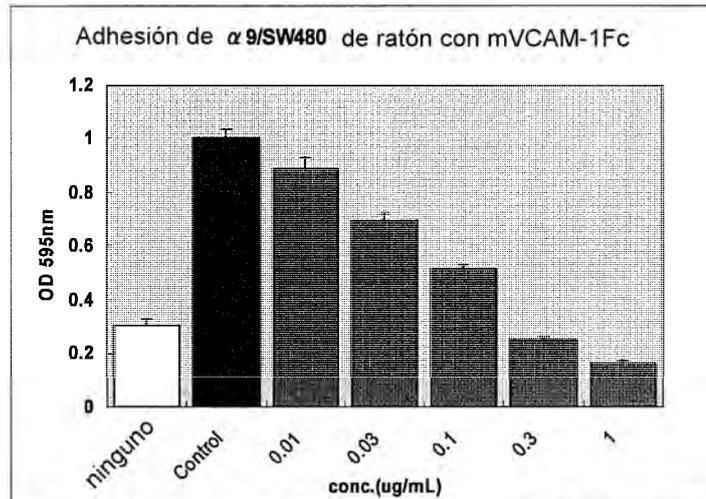
	Célula	Anticuerpo
■	CHO	Ab control isotipo
—	CHO	MA9-413 scFv-Fc
—	CHO/m α 4	MA9-413 scFv-Fc

FIG. 7

a)



b)



c)

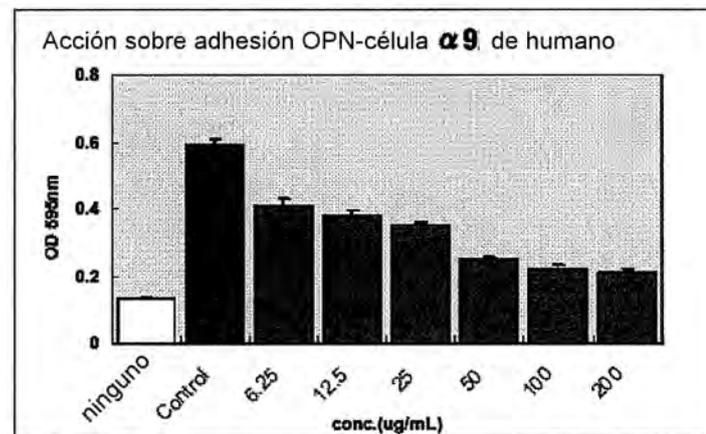


FIG. 8

			R 1		
propelente a4 de humano	1	YNVDTESALLYQGPHTLFGYSVVLHSHGANRWLLVGA	TANWLANASVINE	GAIYRCRI	60
propelente a9 de humano	1	FNLDAERPVEHFQGPADSFYAVLEHFHDNTRWVLVGA	KADSKYS	SPSVKSH	60
propelente a9 de ratón	1	YNLDAQRPVRFQGPSPGSFFGYAVLEHFHDNTRWVLVGA	KADSKYSTSVKSH	GAVFKCRV	60
		..**.....*****
			L1		
propelente a4 de humano	61	GKNPGQTCEQLQLGSP--NGEPCGKTCLEERDNQ	WLGVTLSRQPGENGSI	VTCGHRWKN	118
propelente a9 de humano	61	HTNPDRRCTELDMAR	RGKNRGTSCGKTCREDRDDE	WMGVSLARQPKADGRVLAC	120
propelente a9 de ratón	61	HTNPDRRCTELDMAR	GRTRGAFPCGKTCRGDRDDE	WMGVSLARQPRADGRVLAC	120
		..**.....*****
			R 2	R 3a	
propelente a4 de humano	119	FYIKNENKLP	TGGCYGVPPDLRTELSKRIAP	QYQDYVKKFGENFAS	178
propelente a9 de humano	121	YYEADHI-LPHG	FICYIIFSNLQAKGRLLI-PQ	YEEYKKKYGEZHGSC	178
propelente a9 de ratón	121	YYEADHI-LPHG	FICYIIFSNLQAKGVLI-PQ	YEEYKKKYGEZHGSC	178
		..**.....*****
			R 3b	R 3c	L2
propelente a4 de humano	179	VMQAPGSSYWTSS	LFVYNITTNKYKAF	LDKQNV-K-FGSYLGYSV	236
propelente a9 de humano	179	VMQAPGSSFYWAG	TIKVLNLTNTYKLNDEVI	MNRRYT-YLGYAVT	236
propelente a9 de ratón	179	VMQAPGSSFYWAG	STLKVLNLTNTYFKLNDEAL	MNRRYT-YLGYAVT	236
		********
			R 4	L3	R 5
propelente a4 de humano	237	GGAPQHEQIGKAY	IFSIDEKE--LNI-THEMKGK	KGSGYFGAS	293
propelente a9 de humano	237	GGAPQDKGIGKVVY	IFRADRRSGTLIKI	IQ-ASGKKMGSYFGSSI	295
propelente a9 de ratón	237	GGAPQDEGIGKVVY	IFRADRRSGTLVKT	IQ-ASGKKMGSYFGSSI	295
		********
			L4		
propelente a4 de humano	294	APMQSTIREEG	RVFVYINSGSGAVMNAME	TNLVGS	353
propelente a9 de humano	296	APMFSEIRDEG	QVTVYINRGNGALEEQLA--	LTGDGAYNAHFGES	353
propelente a9 de ratón	296	APMFSEIRDEG	QVTVYINQGHGALEEQLT--	LTGDAAAYNAHFGES	353
		******
propelente a4 de humano	354	AIGAPQEDDLQGA	IYIYNGRADGISSTFSQRIEGLQ	ISKSLSMFGQSI	413
propelente a9 de humano	354	AIGAPKEDDFAGAVY	IYHGDAGGIVFQYSMKLSGQRIN	PVLRMFGQSI	413
propelente a9 de ratón	354	AVGAPKEEDFAGAVY	IYHGDANGIVFKYSMKLSGRRLN	PVLRMFGQSI	413
		******
propelente a4 de humano	414	DVAVGAFRSDSAVLLRT			430
propelente a9 de humano	414	DVTVGAFMSDSVLLRA			430
propelente a9 de ratón	414	DVTIGAPLSDSVLLRA			430
		*****

FIG. 9

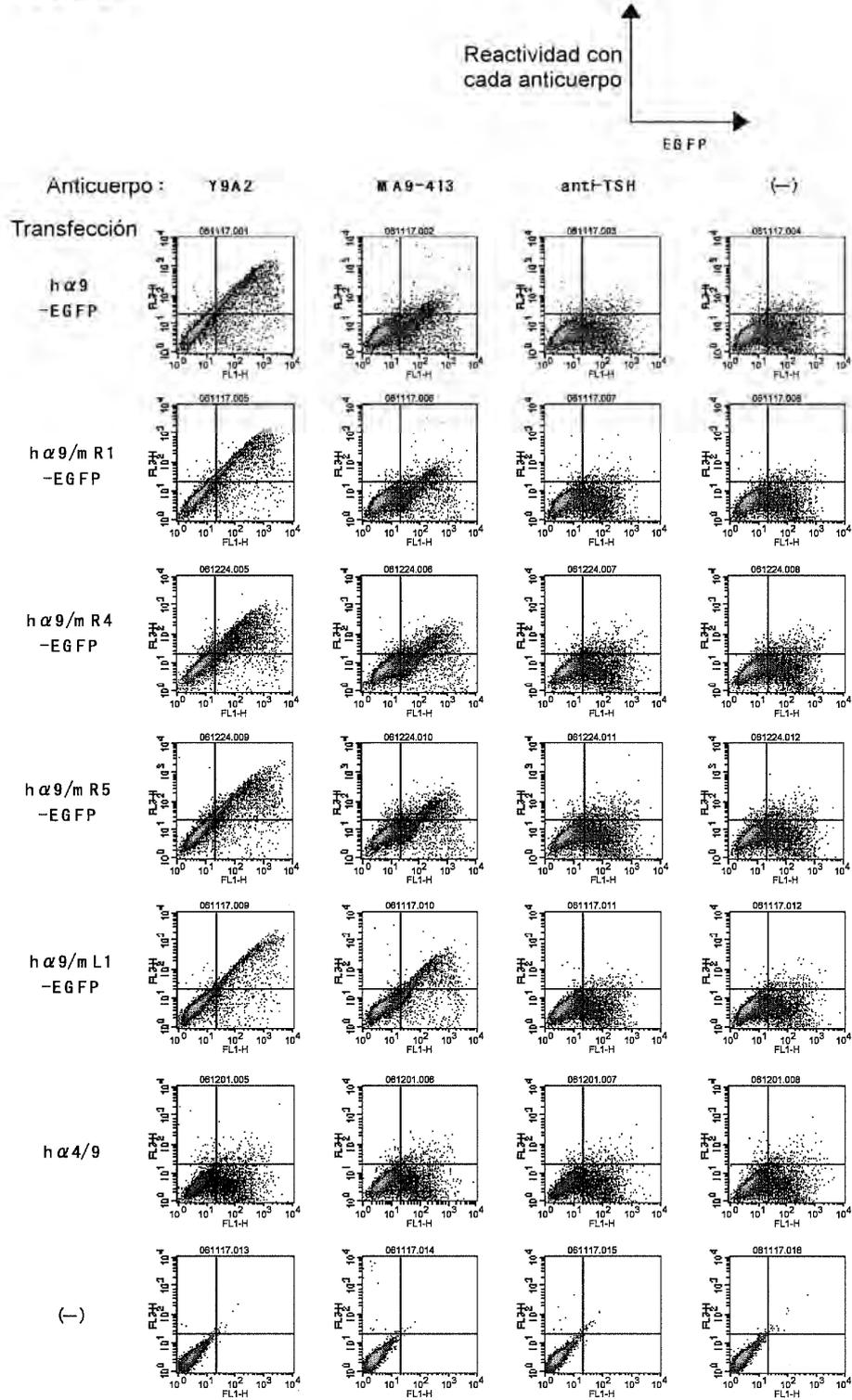


FIG. 10

Antígenos: células con expresión transitoria de h $\alpha 9$ -EGFP de tipo salvaje y varias formas alteradas
 Muestra: MA9-413 scFv-Fc
 Detección: anticuerpo Ugg anti-ratón marcado HRP

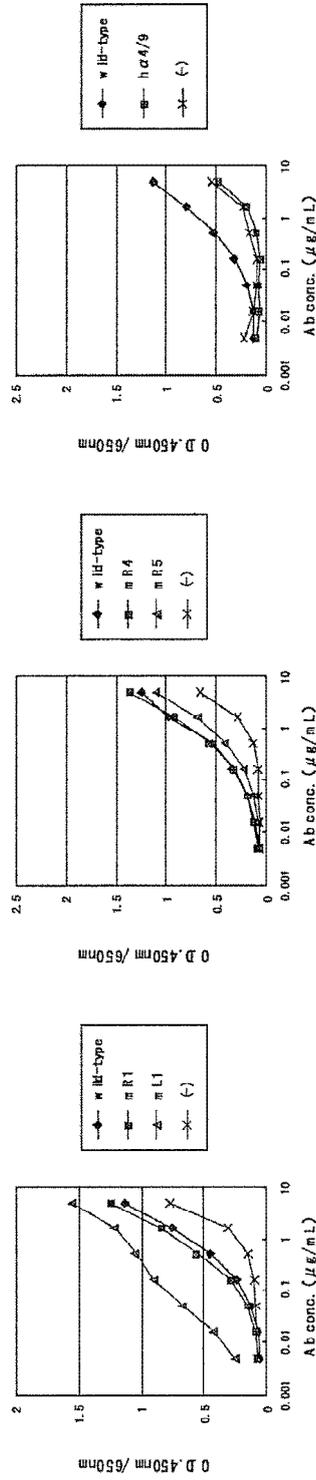
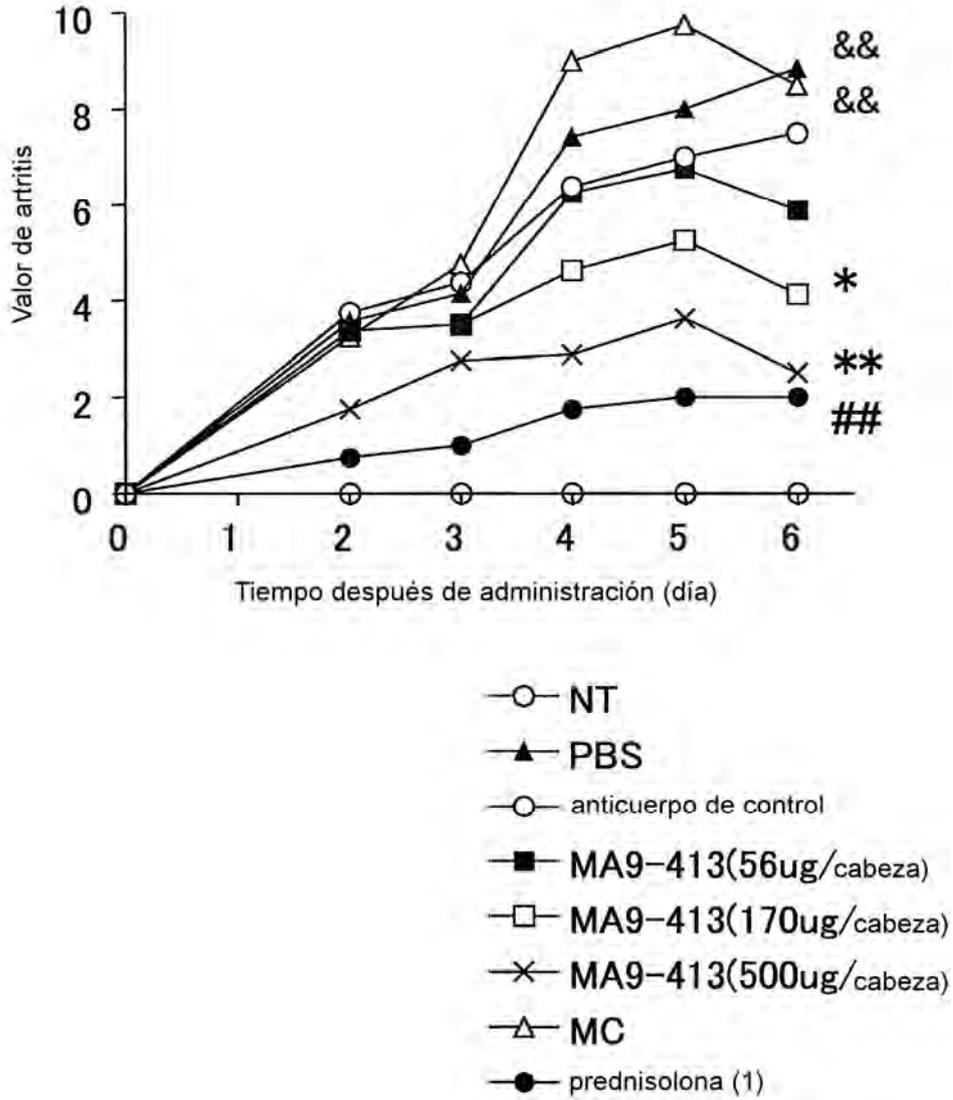
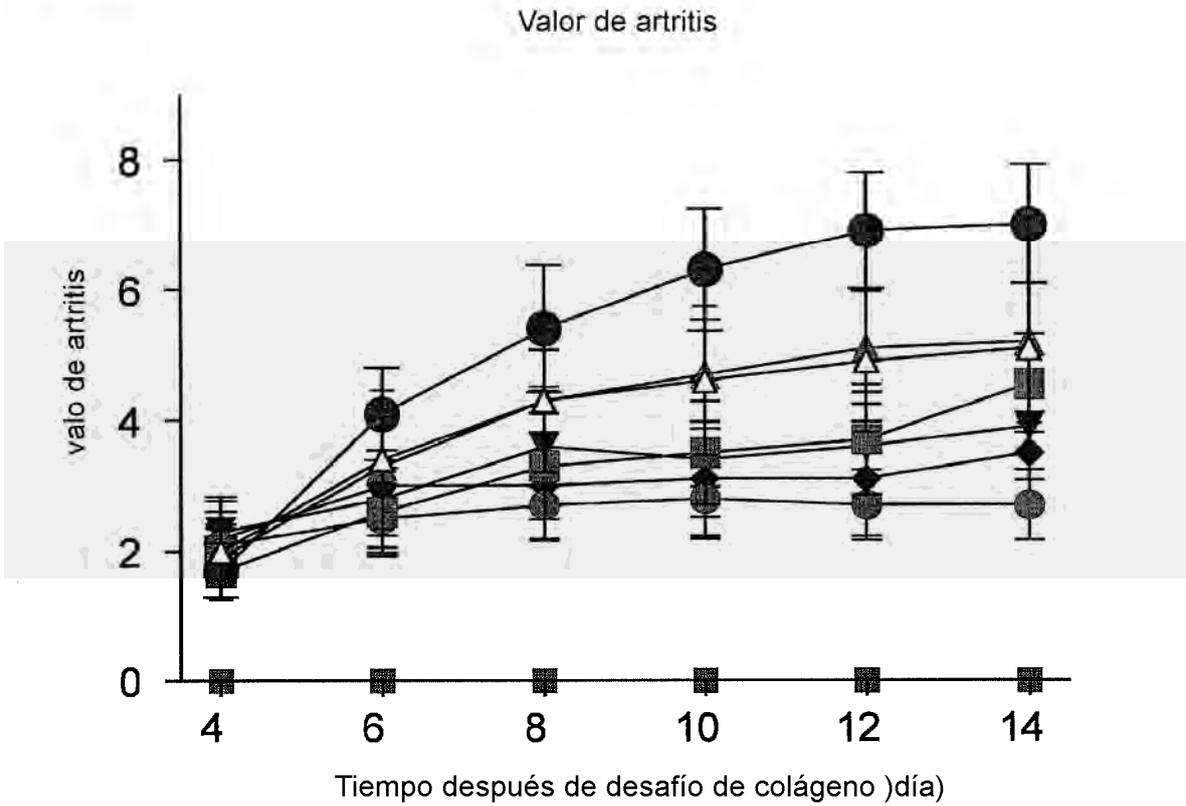


FIG. 11



promedio, n=4-8
 valor de artritis se determinó como una suma de índices de hinchazón para las extremidades
 &&: p<0.01 vs normal (día 6)
 *p<0.05, **p<0.01 vs anticuerpo anti-HBs (día 6)
 ## p<0.01 vs MC (día 6)

FIG. 12



- Control(HBs)
- △ Control(PBS)
- ▲ ANM-2 56 µg → MA9-413
- ANM-2 170 µg → MA9-413
- ANM-2 500 µg → MA9-413
- ▼ Etanercept 500 µg
- ◆ Etanercept 150 µg
- Normal

promedio +/- SE, n = 9-10
 valor de artritis se determinó como una suma de índices de hinchazón para las extremidades

FIG. 13

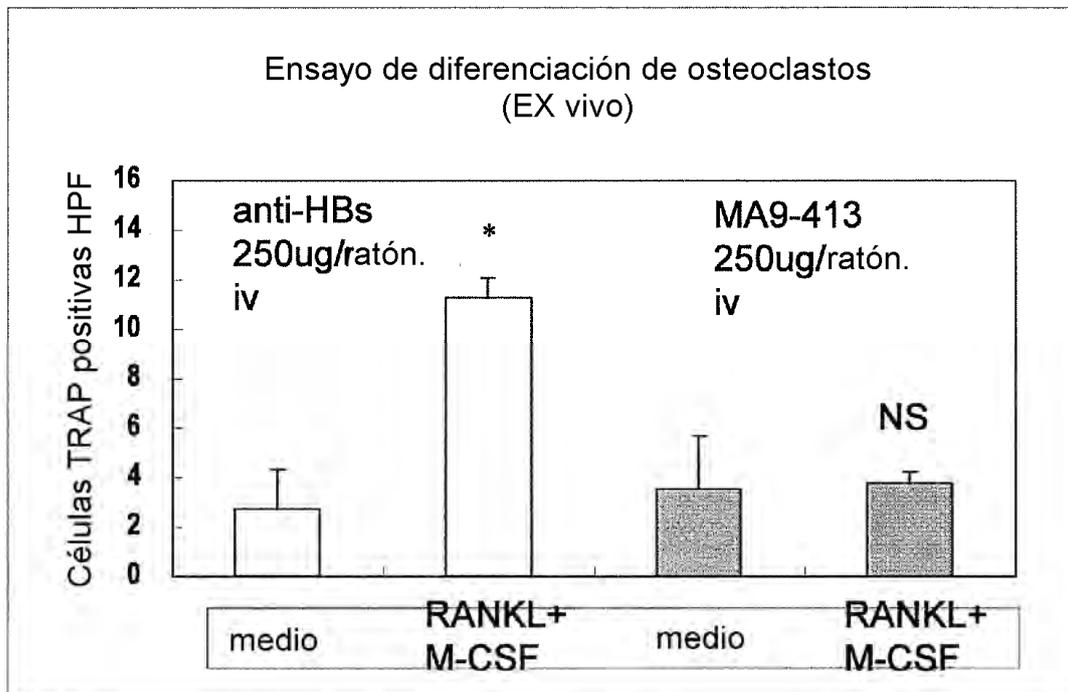
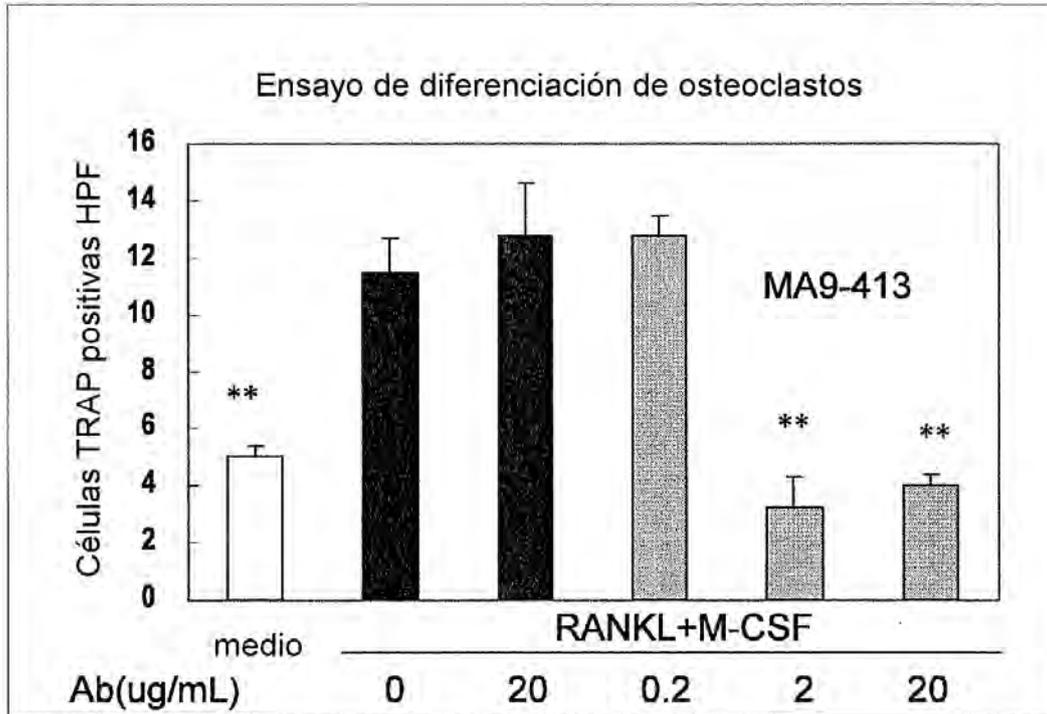


FIG. 14

VH

	10	20	30	40	50	60	70
MA9-413	EVQLVESGGG	VVRPGGSLRL	SCAASGFAPG	DYGMSWVRQA	PGKGLEWVSG	INWNGGSTGY	ADSVKGRFTT
MA9-418	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HA9-107	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HA9-143	-----	-----	-----	E-----	-----	-----	-----
HA9-212	-----	-----	-----	E-----	-----	-----	-----Q-----

	80	90	100	110	120	
MA9-413	SRDNAKNSLY	LQMNSLRAED	TALYYCARDE	NYDILTGYYY	YGMDVWGQGT	TVTSS
MA9-418	-----	-----	-----	-----A-----	-----	-----
HA9-107	-----	-----	-----	-----NE-----	-----	-----
HA9-143	-----	-----	-----	-----H-----	-----	-----
HA9-212	-----	-----	-----	-----N-----	-----	-----

VL

	10	20	30	40	50	60	70
MA9-413	QSVVTQPPSV	SAAPGQKVTI	SCSGSSSNIG	NNYVSWYQQL	PGTAPKLLIY	DNNKRPSGIP	DRFSASKSGT
MA9-418	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HA9-107	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HA9-143	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HA9-212	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	80	90	100	110
MA9-413	SATLGI TGLQ	TGDEADYYCG	TWDSSLTVWA	FGGGTKLTVL G
MA9-418	-----	-----	-----	-----
HA9-107	-----	-----	-----	-----
HA9-143	-----	-----	-----	-----
HA9-212	-----	-----	-----	-----

FIG. 15

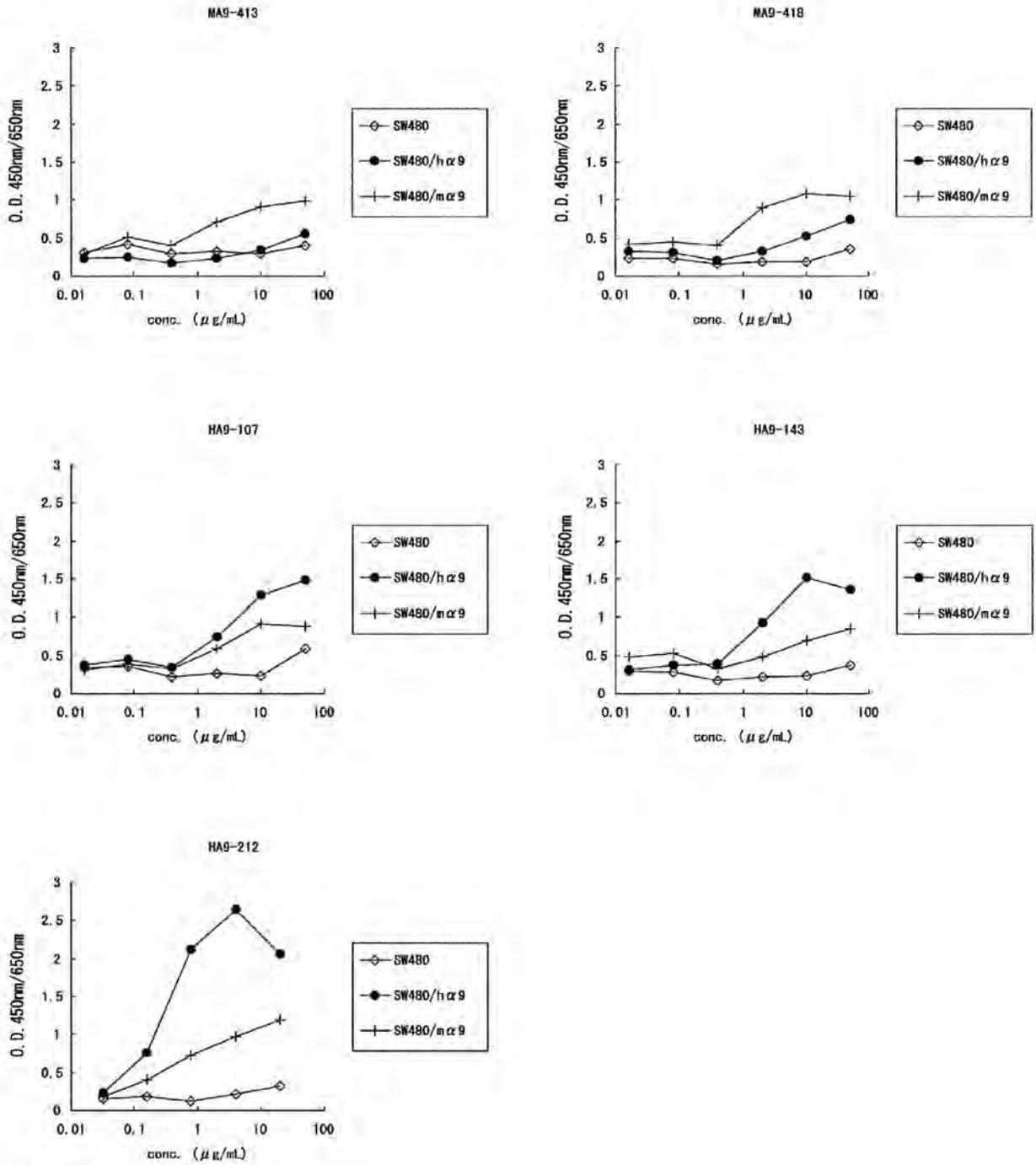


FIG. 16

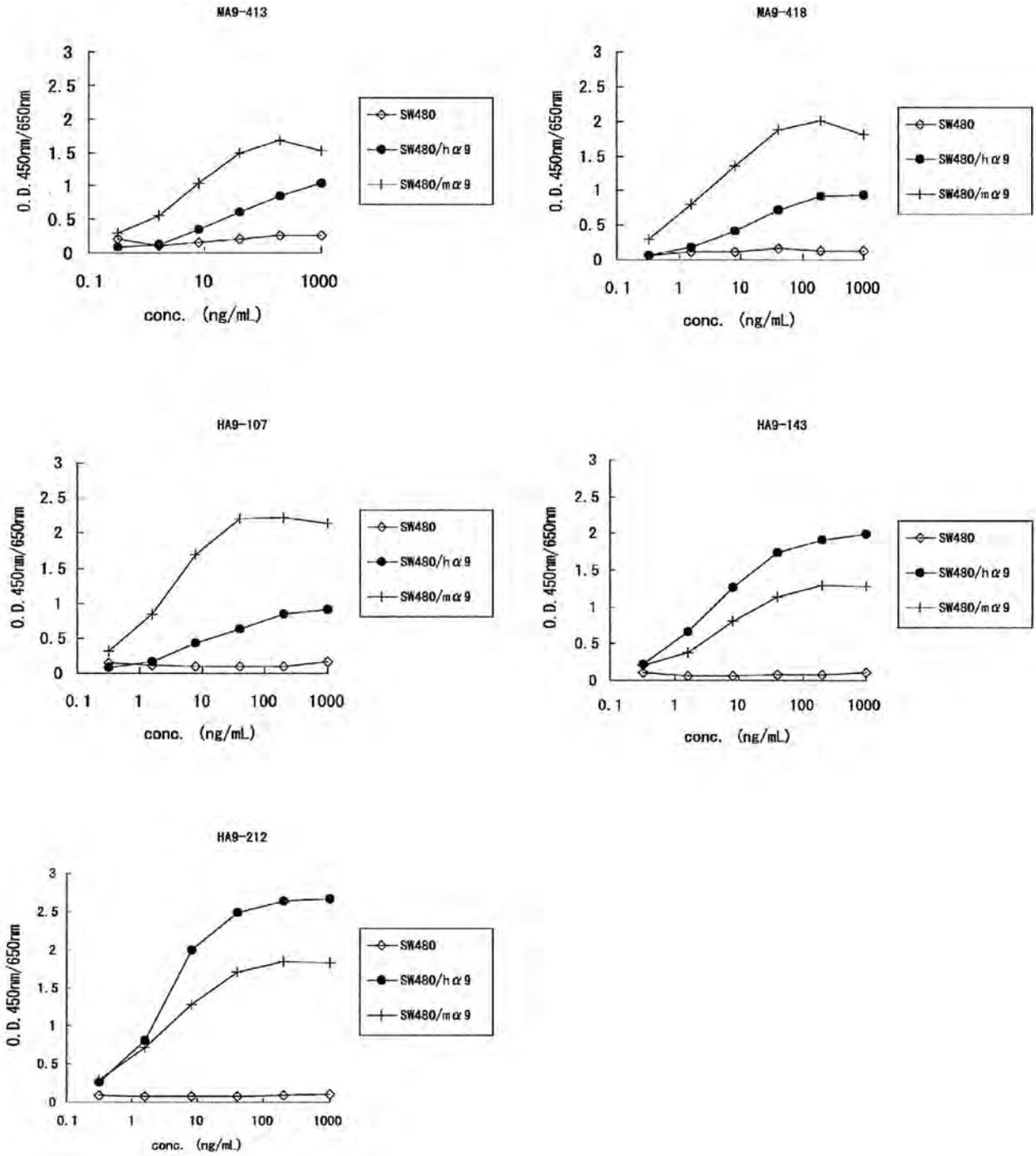


FIG. 17

Antígeno: SW480/H α 9
 Muestras: fago de expresión de scFv-Fc de cada clon
 Detección: anticuerpo anti-M13 marcado HRP

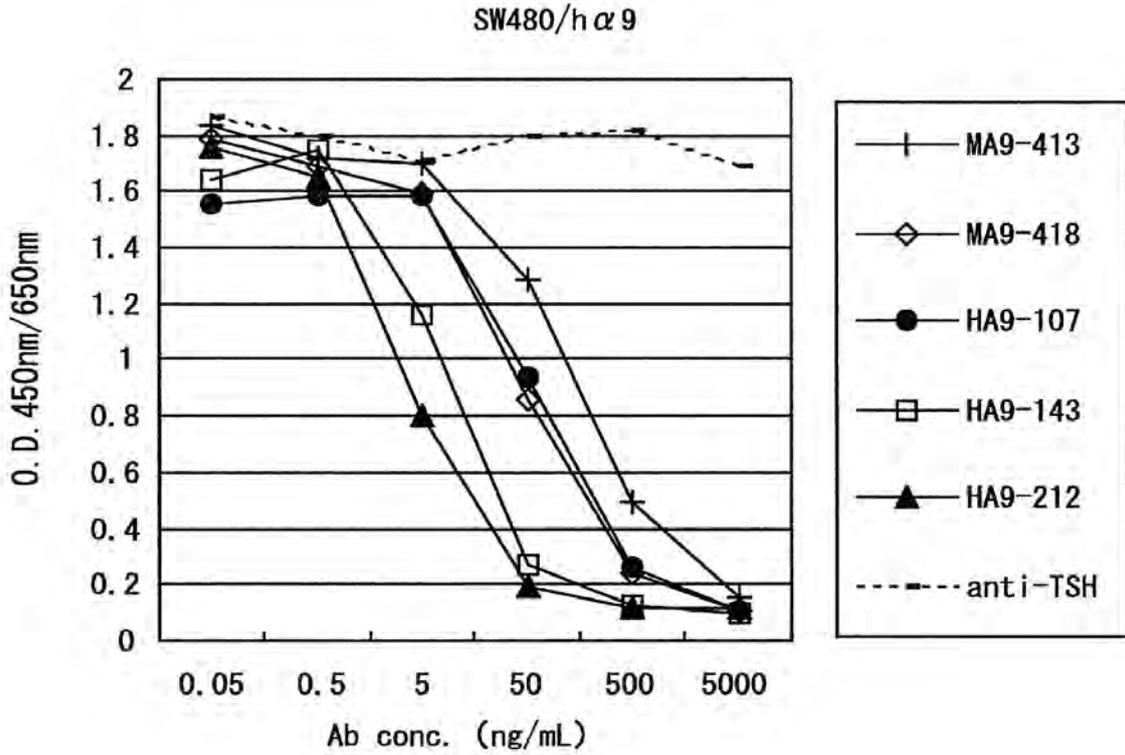


FIG. 18

