SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-046963- -00000-0000
Fecha: 2013-03-08 15:37:48 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: ~~132~~ 123

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA
República de Colombia
Ministerio de Comercio, Industria y Turismo
PROPIEDAD INDUSTRIAL

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD DE

PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO: **PÉPTIDO O COMPLEJO PEPTÍDICO QUE SE UNE A INTEGRINA α2 Y MÉTODOS Y USOS QUE IMPLICAN A LOS MISMOS**

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: **A61K 39/395, A61P 17/06, A61P 29/00, A61P 3/10, A61P 35/00, A61P 37/06, A61P 9/10, C07K 16/28, G01N 33/68**

71. SOLICITANTE: **SANOFI**

DOMICILIO: **54, rue de la Boétie, F-75008 Paris, FRANCIA**

74. APODERADO: **Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.**

22. BOGOTA, D.C., 08 MAR. 2013

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-046963- -00000-0000
Fecha: 2013-03-08 15:37:48 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 122

PATENTE DE INVENCIÓN _____ **MODELO DE UTILIDAD** _____ **Art 33 Decisión 486/00**

Indicación que se solicita una patente.
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
Descripción de la invención
Dibujos de ser estos pertinentes
Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa _____ Incompleta _____

PATENTE DE INVENCIÓN PCT X **MODELO DE UTILIDAD PCT** ___ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

X Indicación que se solicita una PCT
X Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
X Dibujos de ser estos pertinentes
X Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa X Incompleta _____

DISEÑO INDUSTRIAL _____ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

Indicación que se solicita Diseño industrial
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa _____ Incompleta _____

ESQUEMA DE TRAZADO _____ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

Indicación que se solicita un esquema de trazado

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica de un esquema de trazado

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa _____ Incompleta _____

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO — adicación

No. 13-046963- -00000-0000

Fecha: 2013-03-08 15:37:48 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 122

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	X Patente de Invención / X Capítulo I	___ Patente de Modelo de Utilidad / ___ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
	Solicitud Internacional No.	PCT/EP2011/064926	Fecha 30/08/2011
	Publicación Internacional No.	WO/2012/028622 A2	Fecha 08/03/2012
3	(54) TITULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
	PÉPTIDO O COMPLEJO PEPTÍDICO QUE SE UNE A INTEGRINA α_2 Y MÉTODOS Y USOS QUE IMPLICAN A LOS MISMOS		
4	CLASIFICACION INTERNACIONAL (51) CIP		
	A61K 39/395, A61P 17/06, A61P 29/00, A61P 3/10, A61P 35/00, A61P 37/06, A61P 9/10, C07K 16/28, G01N 33/68		
5	(71) SOLICITANTE(S) ___ Esta persona también es inventor Para datos adicionales utilizar hoja de información adicional		

APELLIDOS O RAZON SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACION	TIPO
SANOFI			

6	DATOS DEL SOLICITANTE		
	DIRECCION	54, rue de la Boétie	No. TELEFONO
	CIUDAD	F-75008 Paris	E-MAIL
	DEPARTAMENTO/ESTADO		NACIONALIDAD O
	PAIS DE RESIDENCIA	FRANCIA	LUGAR DE CONSTITUCION FRANCIA

7 (72) INVENTOR(ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información adicional

	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1.	CORVEY	Carsten	ALEMANA
2.	BLUM	Horst	ALEMANA
3.	CAMERON	Béatrice	FRANCESA
4.	DABDOUBI	Tarik	FRANCESA
5.	DECARY	Stephanie	FRANCESA
6.	BAURIN	Nicolas	FRANCESA
7.	PAPIN	David	FRANCESA
8.	LANGE	Christian	ALEMANA

DIRECCION DE CORREO ELECTRONICO:

8 DATOS INVENTOR(ES)

	PAIS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO	CIUDAD	DIRECCION
1.	ALEMANIA		65926 Frankfurt am Main	c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH,
2.	ALEMANIA		65926 Frankfurt am Main	c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH,
3.	FRANCIA		F-75013 Paris	c/o Sanofi-Aventis, Département Brevets, 174, Avenue de france
4.	FRANCIA		F-75013 Paris	c/o Sanofi-Aventis, Département Brevets, 174, Avenue de france
5.	FRANCIA		F-75013 Paris	c/o Sanofi-Aventis, Département Brevets, 174, Avenue de france
6.	FRANCIA		F-75013 Paris	c/o Sanofi-Aventis, Département Brevets, 174, Avenue de france
7.	FRANCIA		F-75013 Paris	c/o Sanofi-Aventis, Département Brevets, 174, Avenue de france
8.	ALEMANIA		65926 Frankfurt am Main	c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH,

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/U OTRO(S) INVENTOR(ES)

___ Los demás solicitantes y/o demás inventores se indican en una hoja a continuación

9 (74) ___ REPRESENTANTE X APODERADO

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACION
CASTELLANOS ABONDANO	MARGARITA	C.C. 39.779.654 T.P. 70.819

DIRECCION	Calle 94A No. 7A-09	No. TELEFONO	7560770
CIUDAD	BOGOTA	E-MAIL	info@castellanosyco.co
PAIS	COLOMBIA	No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA	

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD	X SI	NO

(33) PAIS DE ORIGEN	CODIGO PAIS	(31) NUMERO	(32) FECHA (AAA/MM/DD)
1. COM. EUROPEA	EP	10305929.1	31/08/2010
2.			
3.			
4.			
5.			

11 DECLARACION SOBRE USO DE RECURSOS GENETICOS O BIOLOGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los paises miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

_____ SI X NO

NOTA: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro expedido por la Autoridad competente.

12 DECLARACION SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

_____ SI X NO

NOTA: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13 REDUCCION DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente

_____ SI X NO

NOTA: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empr	Universidades públicas o privadas	Entidades sin animo de lucro
_____ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anteri defecto prueba documental idónea.	___ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Ed Acreditación Colciencias.	___ Copia de registro vigente en Cámara de Comercio.
_____ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.		_____ Hoja de información complementaria.
		_____ Otros, especificar.

14 AUTORIZACION DE NOTIFICACION EN LINEA SI X NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en linea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deber ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

14 COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRONICO N°13-22495, 13-22503 Fecha: 06/03/2013

15 FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO - APODERADO

16 ORDEN Y RELACION DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en Castellano

1. X Descripción — N° de folios: 129
2. X Reivindicaciones — N° de reivindicaciones: 44
3. ___ Dibujos y/o figuras — N° de folios: 21
4. X Resumen
5. ___ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ___ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácios en forma digital si fuera el caso.
7. ___ Arte final 12 x 12
8. ___ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. X Poderes, si fuera el caso.
10. ___ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ___ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ___ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. ___ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica.
14. X Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ___ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
16. ___ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. X Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0022495

Bogotá D.C., Marzo 06 de 2013 - 15:24:19

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	535292763	06/03/2013	7.099.800.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr UNDITARIO	Vr CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	500.000.00	500.000.00
			$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-**-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-046963- -00000-0000
Fecha: 2013-03-08 15:37:48 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 122

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0022503

Bogotá D.C., Marzo 06 de 2013 - 15:24:19

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	535292763	06/03/2013	7.099.800.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
34	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	1.020.000.00
				$1.020.000.00

SON: **UN MILL&OACUTE;N VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-**-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-046963- -00000-0000

Fecha: 2013-03-08 15:37:48 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 122

5

Co.

COLOMBIA

PODER

El (los)

SANOFI

Domiciliados en
54 rue La Boétie, 75008 PARIS, France

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para obtener la protección para

con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso –administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

a) Obtención de patentes de invención, su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
b) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan. Con relación a los derechos anteriormente mencionados o en defensa de estos

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato entre los apoderados, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extra-judiciales. .

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy
en
por

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)
(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned

SANOFI

Of
54 rue La Boétie, 75008 PARIS, France

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS a.** attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá- Colombia, obtain the protection for

which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

a) Obtainment of patents, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
b) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us; with regard to the above mentioned rights or in defense of the same.

In all the above matters they may substitute this power of attorney within the appointed attorneys, compromise, cancel, receive, withdraw, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this 20January 2012

in Paris

by
Josiane MERLIER
Director, Patent Administration

(Notary shall execute on the other side)
(Consular legalization or apostille is required)

Je soussigné Me Antoine BAILLY
Notaire à Paris, certifie matériellement
la signature de Mme Josiane MERLIER
apposée sur le présent document.
Cette certification ne comporte aucune vérification de l'exactitude des faits et actes mentionnés dans le présent document

BAILLY POMMERY CAURO
NOTAIRES ASSOCIÉS
DUNE SCP
30 rue La Boétie - Paris 8e

CASTELLANOS & Co.

CALLE 94 A No. 7 A – 09 / P.O. BOX 6349
PHONE (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1) 755 01 58
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
info@castellanosyco.co

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *République française*

Le présent acte public

2. a été signé par Me BAILLY

3. agissant en qualité de Notaire

4. est revêtu du sceau/timbre de Son étude

Attesté

5. à Paris

6. le 12 AVR. 2012

7. *par le Procureur général près la Cour d'appel de Paris*

8. sous n° 24508

9. Sceau :

10. Signature : Jean MARTIN

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, la qualité du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"

BAILLY POMMERY CAURO

Notaires

Successeurs de Maîtres BAILLY et BUCAILLE

30, rue La Boétie – 75008 PARIS
☎ 01.53.53.53.00 - Fax 01.53.53.53.01

Dossier suivi par M. Michaël FREDIER
Tel direct : 01 53 53 53 00 / Fax :01 53 53 53 01
Mail : mickael.fredier.75018@paris.notaires.fr

Expediente seguido por D. Michaël FREDIER
Tel. directo: 01 53 53 53 00/Fax: 01 53 53 53 01
Mail: mickael.fredier.75018@paris.notaires.fr

CERTIFICAT NOTARIAL

Je soussigné, Maître Antoine BAILLY, notaire soussigné de la Société Civile Professionnelle « BAILLY-POMMERY-CAURO » titulaire d'un Office Notarial à Paris (8ème) 30, rue la Boétie.

CERTIFIE ET ATTESTE QUE :

I. SANOFI est une Société Française immatriculée au Registre du Commerce et des Sociétés de PARIS sous le N° 395 030 844 et dont le siège est sis à Paris (75008), 54 rue La Boétie, que celle-ci est valablement constituée conformément aux lois françaises.

II. Mme Josiane MERLIER est bien connue de moi et est la personne ayant signé le document ci-avant.

III. Mme Josiane MERLIER dispose en sa qualité de Directeur Administration Brevets, des pouvoirs de représentation suffisants et est dûment qualifiée pour signer et représenter la Société SANOFI pour l'objet du document ci-avant.

Fait à PARIS,
Le 11 avril 2012

CERTIFICADO NOTARIAL

El abajo firmante, don Antoine BAILLY, Notario miembro de la Sociedad Civil Profesional «BAILLY-POMMERY-CAURO», titular de la Notaría de París (Distrito 8) sita en 30, rue la Boétie.

CERTIFICO Y DOY FE DE QUE:

I. SANOFI es una sociedad francesa inscrita en el Registro Mercantil de PARÍS con el N° 395 030 844 y con domicilio social en París (75008), 54 rue La Boétie, y que la misma se encuentra válidamente constituida de conformidad con la legislación francesa;

II. Conozco a Dª Josiane MERLIER y es la persona que ha firmado el documento precedente;

III. Dª Josiane MERLIER ostenta, en su calidad de Director de Administratión de Patentes, poderes de representación suficientes y está debidamente facultada para firmar y representar a la sociedad SANOFI a los efectos del documento precedente.

Hecho en PARÍS,
El 11 de abril 2012

BAILLY POMMERY CAURO
NOTAIRES ASSOCIÉS
D'UNE SCP
30, rue La Boétie - Paris-8e

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *République française*

Le présent acte public

2. a été signé par Me BAILLY

3. agissant en qualité de Notaire

4. est revêtu du sceau/timbre de Son étude

Attesté

5. à Paris

6. le 12 AVR. 2012

7. *par le Procureur général près la Cour d'appel de Paris*

8. sous n° 24507

9. Sceau :

10. Signature :

JEAN MARTIN

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
8 March 2012 (08.03.2012)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2012/028622 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2011/064926

(22) International Filing Date:
30 August 2011 (30.08.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
10305929.1 31 August 2010 (31.08.2010) EP

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **SANOFI** [FR/FR]; Sanofi-Aventis, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **CORVEY, Carsten** [DE/DE]; c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). **BLUM, Horst** [DE/DE]; c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). **CAMERON, Béatrice** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **DABDOUBI, Tarik** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **DECARY, Stephanie** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **BAURIN, Nicolas** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **PAPIN, David** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **LANGE, Christian** [DE/DE]; c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE).

(74) Agent: **SCHNEIDER, Rudolf**; c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

— *of inventorship (Rule 4.17(iv))*

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) **Title**: PEPTIDE OR PEPTIDE COMPLEX BINDING TO 2 INTEGRIN AND METHODS AND USES INVOLVING THE SAME

(57) **Abstract**: The present invention relates to a peptide or peptide complex binding to α2 integrin, to one or more nucleic acid(s) coding for the peptide or peptide complex, a recombinant cell producing the peptide or peptide complex, a method for producing the peptide or peptide complex, a pharmaceutical composition comprising the peptide or peptide complex or the nucleic acid(s)for use as a medicament, a method for detecting α2 integrin and a screening method.

WO 2012/028622 A2

PEPTIDE OR PEPTIDE COMPLEX BINDING TO α2 INTEGRIN AND METHODS AND USES INVOLVING THE SAME

The present invention relates to a peptide or peptide complex binding to α2 integrin for use in the treatment, prophylaxis or diagnosis, to one or more nucleic acid(s) coding for the peptide or peptide complex, a recombinant cell producing the peptide or peptide complex, a method for producing the peptide or peptide complex, a pharmaceutical composition comprising the peptide or peptide complex or the nucleic acid(s) for use as a medicament, a method for detecting α2 integrin and a screening method.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Integrins are transmembrane proteins that mediate interactions between adhesion molecules on adjacent cells and/or the extracellular matrix (ECM). Integrins play diverse roles in several biological processes including cell migration during development and wound healing, cell differentiation and apoptosis. Their activities can also regulate the metastatic and invasive potential of tumor cells. They exist as heterodimers consisting of α and β subunits. Some α and β subunits exhibit specificity for one another and may be designated as a VLA (very late antigen) member. Heterodimers often preferentially bind certain cell adhesion molecules, or constituents of the ECM. Although they have no catalytic activity, integrins can be part of multimolecular signaling complexes known as focal adhesions.

Upon binding to ligands, integrins transduce intracellular signals to the cytoskeleton that modify cellular activity in response to these cellular adhesion events, referred to as outside-in signaling. Such signaling can also activate other integrin subtypes expressed on the same cell, referred to as inside-out signaling. Inside-out signaling further occurs via regulatory signals that originate within cell cytoplasm such as a disruption of the clasp between an α and β subunit, which are then transmitted to the external ligand-binding domain of the receptor. Integrins can play important roles in the cell adhesion events that control development, organ morphogenesis, physiology and pathology as well as normal tissue homeostasis, and immune and thrombotic responses, and in addition, they serve as environmental sensors for the cell.

Claims

1. Peptide or peptide complex, preferably isolated monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof, wherein said peptide or peptide complex, antibody or fragment specifically binds to the I-domain of a human α2-integrin, said antibody or fragment comprising a heavy chain variable region (VH) domain and a light chain variable region (VL) domain, wherein said antibody or fragment cross-reacts with a non-human primate α2-integrin but does not cross-react with a non-primate α2-integrin.

2. Peptide or peptide complex, preferably isolated monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof, wherein said peptide or peptide complex, antibody or fragment specifically binds to the I-domain of a human α2-integrin, said antibody comprising a heavy chain variable region (VH) domain and a light chain variable region (VL) domain, wherein said antibody or fragment competes with a reference antibody for binding to the epitope of the reference antibody, said reference antibody comprising a light chain encoded by the plasmid as deposited with the DSMZ under accession No. DSM 23944 and a heavy chain encoded by either (i) the plasmid as deposited with the DSMZ under accession DSM 23946 or (ii) the plasmid as deposited with the DSMZ under accession No. DSM 23945.

3. Peptide or peptide complex preferably isolated monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof, comprising one or more of the following components a to f:

a) LCDR1, wherein LDR1 is RASESVESYGNSFIY (SEQ ID NO:6) or a functionally active variant thereof,

b) LCDR2, wherein LDR2 is LASNLAS (SEQ ID NO:7) or a functionally active variant thereof,

c) LCDR3, wherein LDR3 is QQNNEDPYT (SEQ ID NO:8) or a functional active variant thereof,

d) HCDR1, wherein HDR1 is (GYTFTSYWMN, SEQ ID NO:3) or a functionally active variant thereof,

e) HCDR2, wherein HDR2 is RIDPSDSETHYNQKFK (SEQ ID NO:4) or a functionally active variant thereof, and

f) HCDR3, wherein HDR3 is VGRGYFDY (SEQ ID NO:5) or a functional active variant thereof,

and wherein the one or more of the components a) to f) are arranged to allow for binding of the peptide or peptide complex to α2 integrin.

4. Peptide or peptide complex according to one of the claims 1-3,

(i) wherein components a) to c) are comprised in a variable domain of a light chain (VL); and/or

(ii) wherein components d) to f) are comprised in a variable domain of a heavy chain (VH); and/or

(iii) wherein the peptide or peptide complex is an antibody; and/or

(iv) wherein the peptide or peptide complex is a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a Fab, a Fab', a F(ab')2, a Fv, a disulfide linked Fv, a scFv, a $(scFv)_2$, a single domain antibody, a diabody, a multispecific antibody, a dual specific antibody, a isotype antibody, a dual variable domain antibody and a bispecific antibody; and/or

(v) wherein the peptide or peptide complex comprises a heavy chain immunoglobulin constant domain selected from the group consisting of: a human IgM constant domain, a human IgGl constant domain, a human IgG2 constant domain, a human IgG3 constant domain, domain, a human IgG4 constant domain, a human IgE constant domain, and a human IgA constant domain; and/or

(vi) wherein the functionally active variant is a functionally active fragment consisting of at least 90 % sequence identity to any of the amino acid sequences of SEQ ID NOS: 3 to 8; and/or

(vii) wherein the functionally active variant is a functionally active variant having at least 70 %, preferably at least 80 %, more preferably at least 90 % sequence identity to an amino acid sequence of any of SEQ ID NOS: 3 to 8, particularly wherein the functionally active variant is derived from the amino acid sequences of any of SEQ ID NOS: 3 to 8 one or more conservative amino acid substitution; and/or

(viii) comprising the amino acid sequence of

- SEQ ID NO: 1, or a functionally active variant thereof, and/or
- SEQ ID NO: 2, or a functionally active variant thereof, and/or

- SEQ ID NO: 9, or a functionally active variant thereof, and/or
- SEQ ID NO: 10, or a functionally active variant thereof, and/or
- SEQ ID NO: 11, or a functionally active variant thereof, or

(ix) consisting of the amino acid sequence of

- SEQ ID NO: 1, or a functionally active variant thereof, and
- SEQ ID NO: 2, or a functionally active variant thereof, and
- optionally 50 additional amino acid residue(s), preferably 1 to 40, more preferably 1 to 30, even more preferably at most 1 to 25, still more preferably at most 1 to 10, most preferably 1, 2, 3, 4 or 5 additional amino acids residue(s)

or

(x) consisting of the amino acid sequence of

- SEQ ID NO: 9, or a functionally active variant thereof, and
- SEQ ID NO: 10, or a functionally active variant thereof, and
- optionally 50 additional amino acid residue(s), preferably 1 to 40, more preferably 1 to 30, even more preferably at most 1 to 25, still more preferably at most 1 to 10, most preferably 1, 2, 3, 4 or 5 additional amino acids residue(s)

or

(xi) consisting of the amino acid sequence of

- SEQ ID NO: 9, or a functionally active variant thereof, and
- SEQ ID NO: 11, or a functionally active variant thereof, and
- optionally 50 additional amino acid residue(s), preferably 1 to 40, more preferably 1 to 30, even more preferably at most 1 to 25, still more preferably at most 1 to 10, most preferably 1, 2, 3, 4 or 5 additional amino acids residue(s).

5. Peptide or peptide complex according to one of the claims 1 - 4;

- wherein the functionally active variant of LDR1 comprises the mutation at amino acid position 11, particularly 11Asn→Gln; and/or
- wherein the functionally active variant of HDR2 comprises the mutation at amino acid position 6, particularly 6Asp→Glu; and/or

- wherein the functionally active variant of SEQ ID NO: 1 comprises one or more mutations at amino acid positions 9, 12, 15, 22, 34, 46, 47, 80, 83, 85, 87 and/or 89, particularly selected from the group consisting of 9Ala→Ser, 12Ala→Ser, 15Leu→Val, 15Leu→Pro, 22Ser→Thr, 34Asn→Gln, 46Gln→Lys, 47Ala→Pro, 80Asp→Asn, 83Glu→Gln, 85Asp→Glu, 87Ala→Thr and 89Thr→Asn; and/or
- wherein the functionally active variant of SEQ ID NO: 2 comprises one or more mutations at amino acids positions 5, 7, 11, 12, 17, 20, 38, 40, 43, 55, 61, 65, 66, 67, 76, 81, 82, 87, 91, 93, 112, 113 and/or 116, particularly selected from the group consisting of 5His→Val, 7Pro→Ser, 11Leu→Val, 12Val→Lys, 17Pro→Ser, 20Leu→Val, 38Lys→Arg, 40Arg→Ala, 43Arg→Gln, 55Asp→Glu, 61Asn→Ala, 65Lys→Gln, 66Asp→Gly, 67Lys→Arg, 76Ser→Thr, 81Ile→Met, 82Gln→Glu, 87Thr→Arg, 91Ser→Thr, 93Val→Lys, 112Thr→Leu, 113Leu→Val and 116Ser→Val .

6. The Peptide or peptide complex according to any of the claims 1-5, wherein said antibody or fragment specifically binds to the I-domain of the human α2-integrin with nM binding affinity.

7. The Peptide or peptide complex according to any of the claims 1-6, wherein said peptide or peptide complex inhibits the interaction of the human α2-integrin with collagen *in vitro*, thereby inhibiting the activation of platelets due to adhesion of said platelets to said collagen.

8. The Peptide or peptide complex according to any of the previous claims, said heavy chain variable region domain comprising the heavy chain HCDR3 of SEQ ID NO:5.

9. The Peptide or peptide complex according to any of the previous claims, said heavy chain variable region domain comprising the heavy chain CDRs of SEQ ID NO:3 (HCDR1), SEQ ID NO:4 (HCDR2), and SEQ ID NO:5 (HCDR3), or functionally active variants thereof.

10 .The Peptide or peptide complex according to claim 9, wherein the functionally active variant of HCDR2 comprises the mutation Asp→Glu at amino acid position 6.

11. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, said light chain variable region domain comprising the light chain LCDR3 of SEQ ID NO:8.

12. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, said light chain variable region domain comprising the light chain CDRs of SEQ ID NO:6 (LCDR1), SEQ ID NO:7 (LCDR2), and SEQ ID NO:8 (LCDR3), or functionally active variants thereof.

13. The Peptide or peptide complex according to claim 12, wherein the functionally active variant of LCDR1 comprises the mutation Asn→Gln at amino acid position 11.

14. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, said heavy chain variable region (VH) domain having at least 90%, 95%, 97% or 99% sequence identity to the VH sequence of SEQ ID NO: 2.

15. The Peptide or peptide complex according to claim 14, wherein said heavy chain variable region (VH) domain comprises the sequence of SEQ ID NO:2 or a functionally active variant thereof.

16. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, said light chain variable region (VL) domain having at least 90%, 95%, 97% or 99% sequence identity to the VL sequence of SEQ ID NO: 1.

17. The Peptide or peptide complex according to claim 16, wherein said light chain variable region (VL) domain comprises the sequence of SEQ ID NO:1 or a functionally active thereof.

18. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, wherein said heavy chain variable region (VH) domain comprises one or more amino acid substitutions at positions selected from the group consisting of H5, H7, H11, H12, H17, H20, H38, H40, H43, H55, H61, H65, H66, H67, H76, H81, H82, H87, H91, H93, H112, H113 and H116.

19. The Peptide or peptide complex according to claim 18, wherein the one or more amino acid subsitutions are selected from the group consisting 5His→Val, 7Pro→Ser, 11Leu→Val, 12Val→Lys, 17Pro→Ser, 20Leu→Val, 38Lys→Arg, 40Arg→Ala, 43Arg→Gln, 55Asp→Glu, 61Asn→Ala, 65Lys→Gln, 66Asp→Gly, 67Lys→Arg, 76Ser→Thr, 81Ile→Met, 82Gln→Glu, 87Thr→Arg, 91Ser→Thr, 93Val→Lys, 112Thr→Leu, 113Leu→Val and 116Ser→Val .

20. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, wherein said light chain variable region (VL) domain comprises one or more amino acid substitutions at positions selected from the group consisting of L9, L12, L15, L22, L34, L46, L47, L80, L83, L85, L87, and L89.

21. The Peptide or peptide complex according to claim 20, wherein the one or more amino acid subsitutions are selected from the group consisting of 9Ala→Ser, 12Ala→Ser, 15Leu→Val, 15Leu→Pro, 22Ser→Thr, 34Asn→Gln, 46Gln→Lys, 47Ala→Pro, 80Asp→Asn, 83Glu→Gln, 85Asp→Glu, 87Ala→Thr and 89Thr→Asn.

22. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, said heavy chain variable region (VH) domain having at least 90%, 95%, 97% or 99% sequence identity to a VH sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 38 (HC1), SEQ ID NO:39 (HC2), SEQ ID NO:40 (HC3), SEQ ID NO:41 (HC4), SEQ ID NO:42 (HC5), SEQ ID NO:43 (HC6), and SEQ ID NO:44 (HC7).

23. The Peptide or peptide complex according to claim 22 said heavy chain variable region (VH) domain comprising a VH sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 38 (HC1), SEQ ID NO:39 (HC2), SEQ ID NO:40 (HC3), SEQ ID NO:41 (HC4), SEQ ID NO:42 (HC5), SEQ ID NO:43 (HC6), and SEQ ID NO:44 (HC7).

23. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, said light chain variable region (VL) domain having at least 90%, 95%, 97% or 99% sequence identity to a VL sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 33 (LC1), SEQ ID NO:34 (LC2), SEQ ID NO:35 (LC3), SEQ ID NO:36 (LC4), and SEQ ID NO:37 (LC5).

25. The Peptide or peptide complex according to claim 24, said light chain variable region (VL) domain comprising a VL sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 33 (LC1), SEQ ID NO:34 (LC2), SEQ ID NO:35 (LC3), SEQ ID NO:36 (LC4), and SEQ ID NO:37 (LC5).

26. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, wherein said antibody or binding portion is a chimeric antibody or humanized antibody.

27. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, wherein the antigen binding portion is selected from the group consisting of a Fab, a Fab', a F(ab')2, a Fv, a disulfide linked Fv, a scFv, and a $(scFv)_2$.

28. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, which is selected from the group consisting of a multispecific antibody, a dual specific antibody, a isotype antibody, a dual variable domain antibody and a bispecific antibody.

29. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, comprising a heavy chain immunoglobulin constant domain selected from the group consisting of: a human IgM constant domain, a human IgGl constant domain, a human IgG2 constant domain, a human

IgG3 constant domain, domain, a human IgG4 constant domain, a human IgE constant domain, and a human IgA constant domain.

30. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, comprising a human IgG4 constant domain.

31. The Peptide or peptide complex according to according to any of the previous claims, wherein the peptide or peptide complex comprises or consists of an isolated monoclonal anbitody or antigen binding fragment thereof.

32. One or more nucleic acid(s) coding for the peptide or peptide complex according to any of claims 1 to 31.

33. Peptide or peptide complex according to one of the claims 1-31 for use in the treatment, prophylaxis or diagnosis of an α 2- integrin –related disorder or disease.

34. The nucleic(s) of claim 32, wherein the nucleic acid(s) is/are located in a vector.

35. A cell heterologously expressing one of the nucleic acids according to claims 32 or 34.

36. A method for producing a peptide or peptide complex according to any of claims 1 to 31 comprising culturing the cell according to claim 35 under conditions permitting expression of the peptide or peptide complex and optionally recovering the peptide or peptide complex from the host cell.

37. A pharmaceutical composition comprising at least one peptide or peptide complex according to any of claims 1 to 31 and/or at least one nucleic acid according to claim 32 or 34 for use as a medicament.

38. The pharmaceutical composition of claim 37 for use in treating or preventing an α2 integrin-related disease or disorder, preferably selected from the group consisting of thrombosis, a

vascular disease, cancer, including neo-angiogenesis and metastasis, inflammation, inflammatory disease, autoimmune disease and a disease characterized by abnormal or increase angiogenesis, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, reactions to transplant, optical neuritis, spinal cord trauma, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus (SLE), multiple sclerosis, Reynaud's syndrome, experimental autoimmune encephalomyelitis, Sjorgen's syndrome, scleroderma, cardiovascular disease, psoriasis, and infections that induce an inflammatory response.

39. The pharmaceutical composition of claim 37 for use in treating or preventing a vascular disease and/or thrombosis, particularly in the treatment of acute coronary syndrome, percutaneous coronary intervention, ischemic stroke, carotid artery stenosis or peripheral arterial occlusive disease.

40. A method of diagnosing a disease associated with altered α2 integrin, the method comprising

a) contacting a sample comprising α2 integrin with the peptide or peptide complex of any of claims 1 to 31; and

b) detecting binding of α2 integrin to the peptide or peptide complex; and

c) comparing the binding of step b) with a reference,

wherein a altered α2 integrin binding in the sample relative to the reference is indicative of the disease.

41. Article of manufacture comprising

a) a packaging material,

b) a peptide or peptide complex according to one of the claims 1-31 or 33 or a pharmaceutically acceptable salt thereof or comprising the pharmaceutical composition of one of the claims 36-38

c) a label or a package insert, the insert contained within said packaging material, indicating that said peptide or peptide complex is effective for treatment of a disease or disorder, especially an α 2 integrin-related disease disorder.

42. Diagnostic kit for the diagnosis of an α 2-integrin related disorder or disease comprising a peptide or peptide complex according to one of the claims 1-31 and a suitable packaging, and possibly suitable instructions for using said peptide or peptide complex in the detection of α 2 integrin.

43. Method of treatment or diagnosis of an α 2 integrin-related disorder or disease using one or more peptide or peptide complex according to one of the claims 1-31 and/or one or more nucleic acids according to claim 32 or 34 or one of the pharmaceutical compositions according to one of claims 36-38.

44. A method of diagnosing a disease associated with altered α2 integrin, the method comprising

a) contacting a taken sample of an individual with the peptide or peptide complex of any of claims 1 to 31; and

b) detecting binding of α2 integrin to the peptide or peptide complex; and

c) comparing the binding of step b) with the binding of α2 integrin to the peptide or peptide complex in one or more reference samples,

wherein an altered binding in the taken sample relative to the binding detected in the one or more reference samples is indicative of the disease.

Fig. 1A

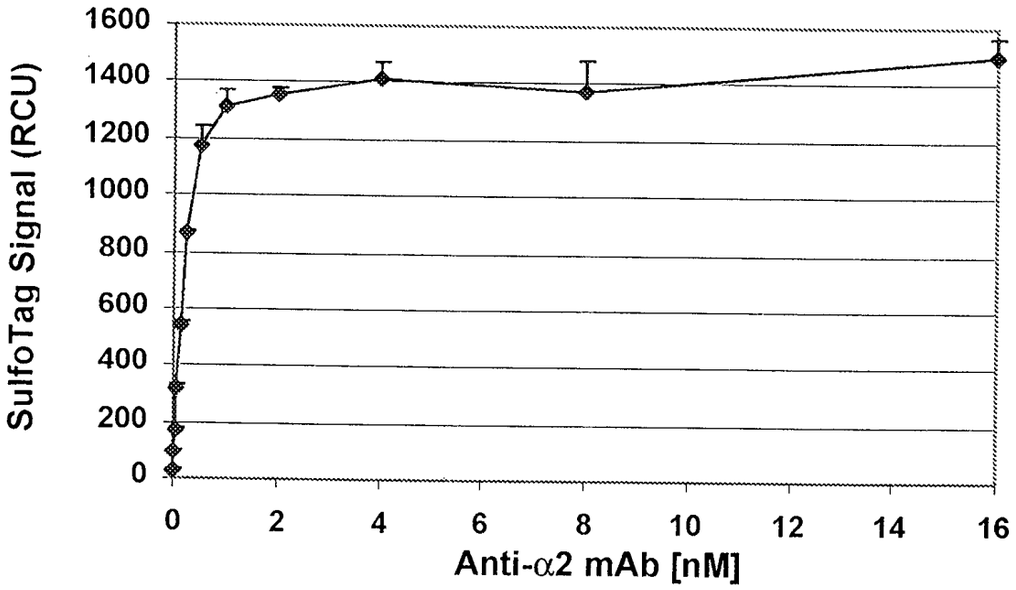
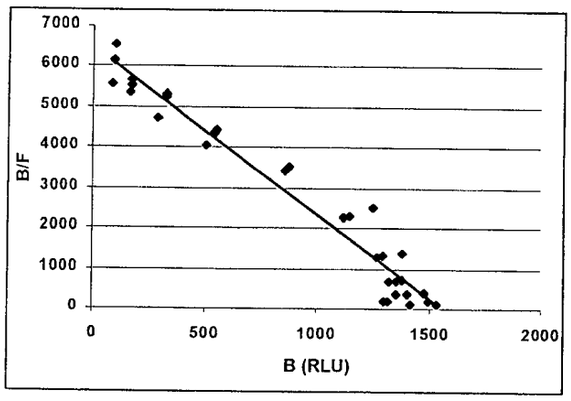


Fig. 1B



Parameter+	Estimate	SD	CV(%)	95%CI
KD (nM)	0.2146	0.01291	6.0	[0.1899 ; 0.2425]

Fig. 2

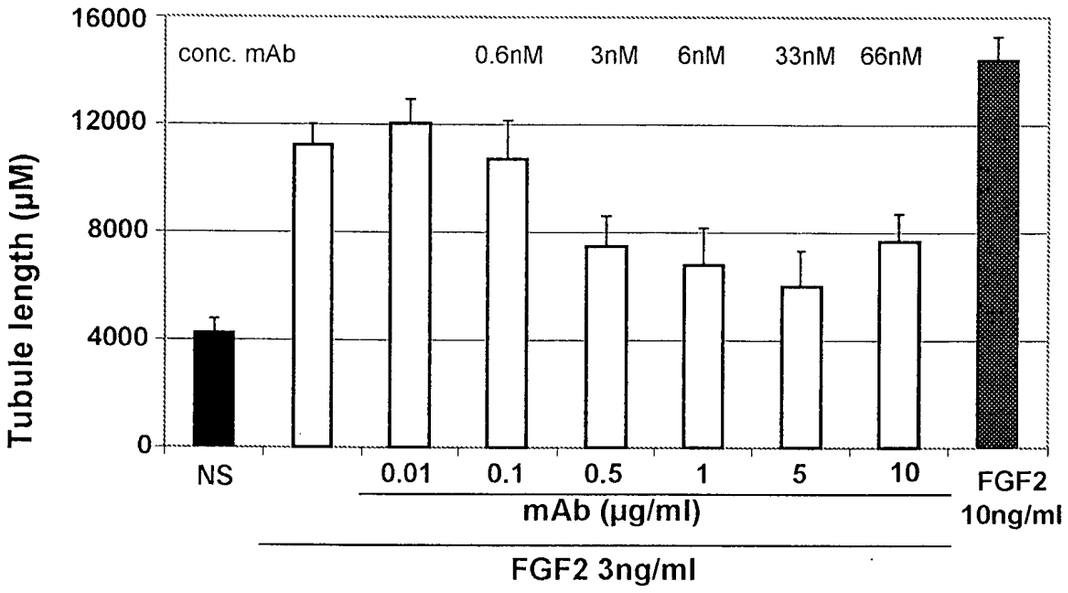

16000
12000
8000
4000
0
Tubule length (µM)
conc. mAb
0.6nM
3nM
6nM
33nM
66nM
NS
0.01
0.1
0.5
1
5
10
FGF2
10ng/ml
mAb (µg/ml)
FGF2 3ng/ml

Fig.3

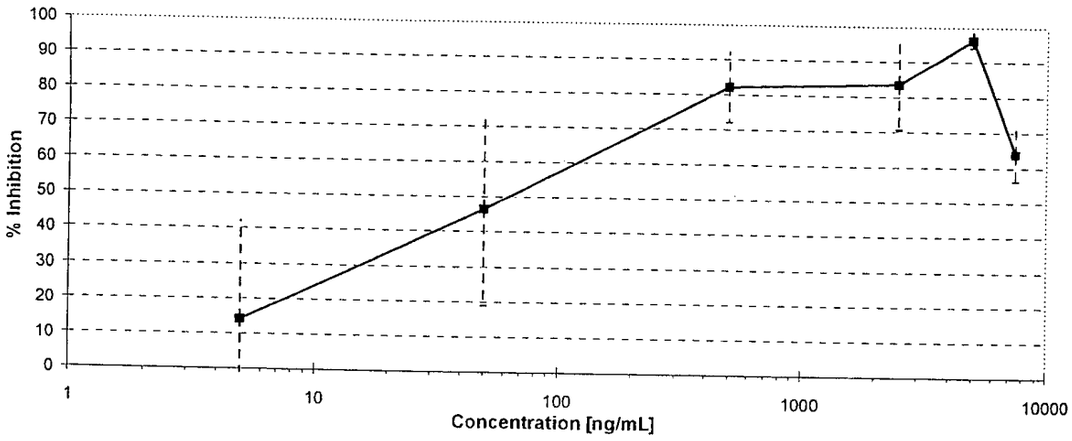

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% Inhibition
1
10
100
1000
10000
Concentration [ng/mL]

Fig.4

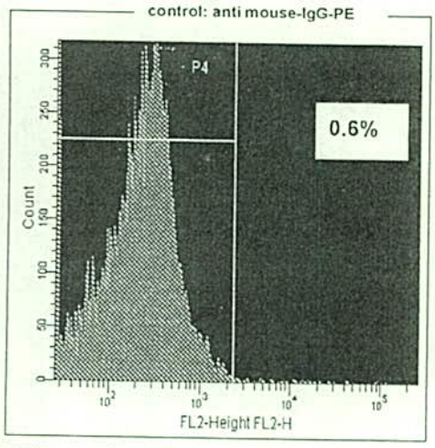


Figure 4a

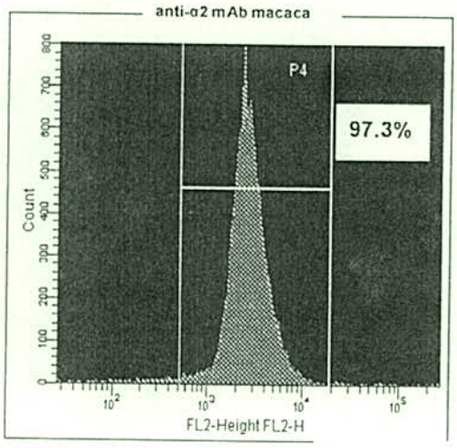


Figure 4b

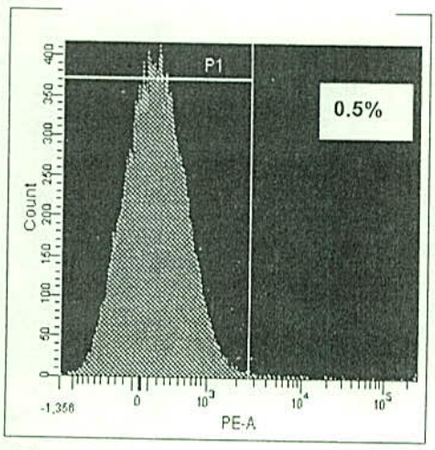


Figure 4c

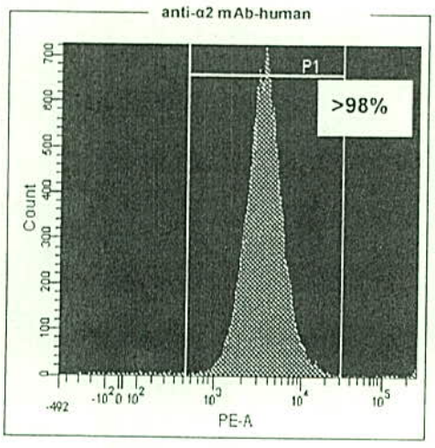


Figure 4d

Fig.5

Fig. 5a) Light chain variable domain of the anti-α2-integrin mAb

NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QQKPGQAPKL LIYLASNLAS GVPARFSGSG
SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K

(SEQ ID NO:1)

AACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATCCTGCAGAGCCAG
TGAAAGTGTTGAGAGTTATGGCAACAGTTTTATTTACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGGCACCCAAACTCCTCA
TCTATCTTGCATCCAACCTAGCATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGACTTCACCCTC
ACCATTGATCCTGTGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAATAATGAGGATCCGTACACGTTCGG
AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

(SEQ ID NO:12)

Fig. 5b) Heavy chain variable domain the anti-α2-integrin mAb

QVQLHQPGAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR IDPSDSETHY NQKFKDKATL
TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG RGYFDYWGQG TTLTVSS

(SEQ ID NO:2)

CAGGTCCAACTGCATCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGGCTCCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGG
CTACACCTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACGAGGCCTCGAGTGGATTGGCAGGATTG
ATCCTTCCGATAGTGAAACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGC
ACAGCCTACATCCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAAGGTGGGACGGGGGTA
CTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

(SEQ ID NO:13)

Fig.6

Fig. 6a: CDRs of the heavy chain variable domain

HCDR1

GYTFTSYWMN

(SEQ ID NO:3)

HCDR2

RIDPSDSETHYNQKFK

(SEQ ID NO:4)

HCDR3

VGRGYFDY

(SEQ ID NO:5)

Figure 6b: CDRs of the light chain variable domain

LCDR1:

RASESVESYGNSFIY

(SEQ ID NO: 6)

LCDR2:

LASNLAS

(SEQ ID NO: 7)

LCDR3:

QQNNEDPYT

(SEQ ID NO: 8)

Fig.7

Fig. 7a: chimeric (anti alpha 2VL-IGKC CL) Light Chain

NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVESYGNSFIYWYQQKPGQAPKLLIYLASNLASGVPA
RFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(Amino Acid Sequence: SEQ ID NO:9)

AACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATCCTGCAGAGCCAG
TGAAAGTGTTGAGAGTTATGGCAACAGTTTTATTTACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGGCACCCAAACTCCTCA
TCTATCTTGCATCCAACCTAGCATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGACTTCACCCTC
ACCATTGATCCTGTGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAATAATGAGGATCCGTACACGTTCGG
AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGC
TGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG
GACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTC
CTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGT
CCAGCCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC

(coding Sequence: SEQ ID NO:14)

Fig.7b: Chimeric (anti α2 VH-IGHG4 CH1) mAb

QVQLHQPGAELVKPGAPVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPGRGLEWIGRIDPSDSETHYNQKF
KDKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCAKVGRGYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPL
APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

(Amino Acid Sequence: SEQ ID NO:10)

CAGGTCCAACTGCATCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGGCTCCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGG
CTACACCTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACGAGGCCTCGAGTGGATTGGCAGGATTG

ATCCTTCCGATAGTGAAACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGC
ACAGCCTACATCCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAAGGTGGGACGGGGGTA
CTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGG
CCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTG
ACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTA
CTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGC
CTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTCCCTGCCCTGCCCCTGAGTTC
GAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGAC
CTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCTGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACA
ACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTCAATTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
GACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGTAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAAACCATCTC
CAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG
TGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAG
AACAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAA
GTCCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGT
CCCTGTCCCTGTCTCTGGGC

(coding Sequence: SEQ ID NO:15)

Fig. 7c: Chimeric (anti α2 VH-IGHG1 CH1) heavy chain Fab fragment

QVQLHQPGAELVKPGAPVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPGRGLEWIGRIDPSDSETHYNQKF
KDKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCAKVGRGYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT*HHHHHH*

(Amino Acid Sequence: SEQ ID NO:11)

CAGGTCCAACTGCATCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGGCTCCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGG
CTACACCTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACGAGGCCTCGAGTGGATTGGCAGGATTG
ATCCTTCCGATAGTGAAACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGC
ACAGCCTACATCCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAAGGTGGGACGGGGGTA
CTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAGCACCAAGGGCCCATCCGTGTTCCCTCTGG
CCCCTTCCTCCAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTG
ACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTA
CTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGC
CCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCTAAGTCCTGTGACAAGACCCACACCCATCACCATCACCATCAC

(coding Sequence: SEQ ID NO:16)

Fig.8

Human constant regions for generation of chimeric antibody constructs

Swiss-Prot: Q502W4

>gi|74740177|sp|Q502W4|Q502W4_HUMAN IGKC protein

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA

DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(Amino Acid Sequence: SEQ ID NO:17)

Swiss-Prot: P01861.1 (S108P, L115E)

>gi|121047|sp|P01861.1|IGHG4_HUMAN RecName: Full=Ig gamma-4 chain C region

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG

TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ

FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL

PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM

HEALHNHYTQKSLSLSLGK

(Amino Acid Sequence: SEQ ID NO:18)

Swiss-Prot: Q569F4

>gi|74735951|sp|Q569F4|Q569F4_HUMAN IGHG1 protein

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG

TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP

EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV

YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC

SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(Amino Acid Sequence: SEQ ID NO:19)

Fig.9

Human α2 and β1 integrin sequences

α2 integrin precursor according to accession No: NP_002194.2:

```
   1 mgpertgaap lplllvlals qgilncclay nvglpeakif sgpsseqfgy avqqfinpkg
  61 nwllvgspws gfpenrmgdv ykcpvdlsta tceklnlqts tsipnvtemk tnmslglilt
 121 rnmgtggflt cgplwaqqcg nqyyttgvcs dispdfqlsa sfspatqpcp slidvvvvcd
 181 esnsiypwda vknflekfvq gldigptktq vgliqyannp rvvfnlntyk tkeemivats
 241 qtsqyggdlt ntfgaiqyar kyaysaasgg rrsatkvmvv vtdgeshdgs mlkavidqcn
 301 hdnilrfgia vlgylnrnal dtknlikeik aiasiptery ffnvsdeaal lekagtlgeq
 361 ifsieqtvqg gdnfqmemsq vgfsadyssq ndilmlgavg afgwsgtivq ktshghlifp
 421 kqafdqilqd rnhssylgys vaaistgest hfvagapran ytgqivlysv nengnitviq
 481 ahrgdqigsy fgsvlcsvdv dkdtitdvll vgapmymsdl kkeegrvylf tikegilgqh
 541 qflegpegie ntrfgsaiaa lsdinmdgfn dvivgsplen qnsgavyiyn ghqgtirtky
 601 sqkilgsdga frshlqyfgr sldgygdlng dsitdvsiga fgqvvqlwsq siadvaieas
 661 ftpekitlvn knaqiilklc fsakfrptkq nnqvaivyni tldadgfssr vtsrglfken
 721 nerclqknmv vnqaqscpeh iiyiqepsdv vnsldlrvdi slenpgtspa leaysetakv
 781 fsipfhkdcg edglcisdlv ldvrqipaaq eqpfivsnqn krltfsvtlk nkresayntg
 841 ivvdfsenlf fasfslpvdg tevtcqvaas qksvacdvgy palkreqqvt ftinfdfnlq
 901 nlqnqaslsf qalsesqeen kadnlvnlki pllydaeihl trstninfye issdgnvpsi
 961 vhsfedvgpk fifslkvttg svpvsmatvi ihipqytkek nplmyltgvq tdkagdiscn
1021 adinplkigq tsssvsfkse nfrhtkelnc rtascsnvtc wlkdvhmkge yfvnvttriw
1081 ngtfasstfq tvqltaaaei ntynpeiyvi edntvtiplm imkpdekaev ptgviigsii
1141 agillllalv ailwklgffk rkyekmtknp deidettels s
```

(SEQ ID NO:20)

α2 integrin coding sequence (hs) according to NCBI accession No: NM_002203.3:

```
   1 atggggccag aacggacagg ggccgcgccg ctgccgctgc tgctggtgtt agcgctcagt
  61 caaggcattt taaattgttg tttggcctac aatgttggtc tcccagaagc aaaaatattt
 121 tccggtcctt caagtgaaca gtttggctat gcagtgcagc agtttataaa tccaaaaggc
 181 aactggttac tggttggttc accctggagt ggctttcctg agaaccgaat gggagatgtg
 241 tataaatgtc ctgttgacct atccactgcc acatgtgaaa aactaaattt gcaaacttca
 301 acaagcattc caaatgttac tgagatgaaa accaacatga gcctcggctt gatcctcacc
 361 aggaacatgg gaactggagg ttttctcaca tgtggtcctc tgtgggcaca gcaatgtggg
 421 aatcagtatt acacaacggg tgtgtgttct gacatcagtc ctgattttca gctctcagcc
 481 agcttctcac ctgcaactca gccctgccct tccctcatag atgttgtggt tgtgtgtgat
 541 gaatcaaata gtatttatcc ttgggatgca gtaaagaatt ttttggaaaa atttgtacaa
 601 ggcctggata taggccccac aaagacacag gtggggttaa ttcagtatgc caataatcca
 661 agagttgtgt ttaacttgaa cacatataaa accaaagaag aaatgattgt agcaacatcc
 721 cagacatccc aatatggtgg ggacctcaca aacacattcg gagcaattca atatgcaaga
 781 aaatatgctt attcagcagc ttctggtggg cgacgaagtg ctacgaaagt aatggtagtt
 841 gtaactgacg gtgaatcaca tgatggttca atgttgaaag ctgtgattga tcaatgcaac
 901 catgacaata tactgaggtt tggcatagca gttcttgggt acttaaacag aaacgccctt
 961 gatactaaaa atttaataaa agaaataaaa gcaatcgcta gtattccaac agaaagatac
1021 tttttcaatg tgtctgatga agcagctcta ctagaaaagg ctgggacatt aggagaacaa
1081 attttcagca ttgaaggtac tgttcaagga ggagacaact ttcagatgga aatgtcacaa
1141 gtgggattca gtgcagatta ctcttctcaa aatgatattc tgatgctggg tgcagtggga
1201 gcttttggct ggagtgggac cattgtccag aagacatctc atggccattt gatctttcct
1261 aaacaagcct ttgaccaaat tctgcaggac agaaatcaca gttcatattt aggttactct
1321 gtggctgcaa tttctactgg agaaagcact cactttgttg ctggtgctcc tcgggcaaat
1381 tataccggcc agatagtgct atatagtgtg aatgagaatg gcaatatcac ggttattcag
1441 gctcaccgag gtgaccagat tggctcctat tttggtagtg tgctgtgttc agttgatgtg
1501 gataaagaca ccattacaga cgtgctcttg gtaggtgcac caatgtacat gagtgaccta
1561 aagaaagagg aaggaagagt ctacctgttt actatcaaag agggcatttt gggtcagcac
1621 caatttcttg aaggccccga gggcattgaa aacactcgat ttggttcagc aattgcagct
1681 ctttcagaca tcaacatgga tggctttaat gatgtgattg ttggttcacc actagaaaat
```

1741 cagaattctg gagctgtata catttacaat ggtcatcagg gcactatccg cacaaagtat

1801 tcccagaaaa tcttgggatc cgatggagcc tttaggagcc atctccagta ctttgggagg

1861 tccttggatg gctatggaga tttaaatggg gattccatca ccgatgtgtc tattggtgcc

1921 tttggacaag tggttcaact ctggtcacaa agtattgctg atgtagctat agaagcttca

1981 ttcacaccag aaaaaatcac tttggtcaac aagaatgctc agataattct caaactctgc

2041 ttcagtgcaa agttcagacc tactaagcaa aacaatcaag tggccattgt atataacatc

2101 acacttgatg cagatggatt ttcatccaga gtaacctcca gggggttatt taaagaaaac

2161 aatgaaaggt gcctgcagaa gaatatggta gtaaatcaag cacagagttg ccccgagcac

2221 atcatttata tacaggagcc ctctgatgtt gtcaactctt tggatttgcg tgtggacatc

2281 agtctggaaa accctggcac tagccctgcc cttgaagcct attctgagac tgccaaggtc

2341 ttcagtattc ctttccacaa agactgtggt gaggacggac tttgcatttc tgatctagtc

2401 ctagatgtcc gacaaatacc agctgctcaa gaacaaccct ttattgtcag caaccaaaac

2461 aaaaggttaa cattttcagt aacgctgaaa aataaaaggg aaagtgcata caacactgga

2521 attgttgttg atttttcaga aaacttgttt tttgcatcat tctccctgcc ggttgatggg

2581 acagaagtaa catgccaggt ggctgcatct cagaagtctg ttgcctgcga tgtaggctac

2641 cctgctttaa agagagaaca acaggtgact tttactatta actttgactt caatcttcaa

2701 aaccttcaga atcaggcgtc tctcagtttc caagccttaa gtgaaagcca agaagaaaac

2761 aaggctgata atttggtcaa cctcaaaatt cctctcctgt atgatgctga aattcactta

2821 acaagatcta ccaacataaa tttttatgaa atctcttcgg atgggaatgt tccttcaatc

2881 gtgcacagtt ttgaagatgt tggtccaaaa ttcatcttct ccctgaaggt aacaacagga

2941 agtgttccag taagcatggc aactgtaatc atccacatcc ctcagtatac caaagaaaag

3001 aacccactga tgtacctaac tggggtgcaa acagacaagg ctggtgacat cagttgtaat

3061 gcagatatca atccactgaa aataggacaa acatcttctt ctgtatcttt caaaagtgaa

3121 aatttcaggc acaccaaaga attgaactgc agaactgctt cctgtagtaa tgttacctgc

3181 tggttgaaag acgttcacat gaaaggagaa tactttgtta atgtgactac cagaatttgg

3241 aacgggactt tcgcatcatc aacgttccag acagtacagc taacggcagc tgcagaaatc

3301 aacacctata accctgagat atatgtgatt gaagataaca ctgttacgat tcccctgatg

3361 ataatgaaac ctgatgagaa agccgaagta ccaacaggag ttataatagg aagtataatt

3421 gctggaatcc ttttgctgtt agctctggtt gcaattttat ggaagctcgg cttcttcaaa

```
3481 agaaaatatg aaaagatgac caaaaatcca gatgagattg atgagaccac agagctcagt
3541 agctga
```

(SEQ ID NO: 21)

β1 integrin isoform 1A precursor (hs) according to NCBI accession No. NP_002202.2:

```
   1 mnlqpifwig lissvccvfa qtdenrclka nakscgeciq agpncgwctn stflqegmpt
  61 sarcddleal kkkgcppddi enprgskdik knknvtnrsk gtaeklkped itqiqpqqlv
 121 lrlrsgepqt ftlkfkraed ypidlyylmd lsysmkddle nvkslgtdlm nemrritsdf
 181 rigfgsfvek tvmpyisttp aklrnpctse qnctspfsyk nvlsltnkge vfnelvgkqr
 241 isgnldspeg gfdaimqvav cgsligwrnv trllvfstda gfhfagdgkl ggivlpndgq
 301 chlennmytm shyydypsia hlvqklsenn iqtifavtee fqpvykelkn lipksavgtl
 361 sanssnviql iidaynslss evilengkls egvtisyksy ckngvngtge ngrkcsnisi
 421 gdevqfeisi tsnkcpkkds dsfkirplgf teevevilqy icececqseg ipespkcheg
 481 ngtfecgacr cnegrvgrhc ecstdevnse dmdaycrken sseicsnnge cvcgqcvcrk
 541 rdntneiysg kfcecdnfnc drsnglicgg ngvckcrvce cnpnytgsac dcsldtstce
 601 asngqicngr gicecgvckc tdpkfqgqtc emcqtclgvc aehkecvqcr afnkgekkdt
 661 ctqecsyfni tkvesrdklp qpvqpdpvsh ckekdvddcw fyftysvngn nevmvhvven
 721 pecptgpdii pivagvvagi vliglallli wkllmiihdr refakfekek mnakwdtgen
 781 piyksavttv vnpkyegk
```

(SEQ ID NO:22)

β1 integrin coding sequence (hs) isoform 1A according to NCBI accession No. NM_002211.3:

```
   1 atcagacgcg cagaggaggc ggggccgcgg ctggtttcct gccggggggc ggctctgggc
  61 cgccgagtcc cctcctcccg cccctgagga ggaggagccg ccgccacccg ccgcgcccga
 121 cacccgggag gccccgccag cccgcgggag aggcccagcg ggagtcgcgg aacagcaggc
 181 ccgagcccac cgcgccgggc cccggacgcc gcgcggaaaa gatgaattta caaccaattt
 241 tctggattgg actgatcagt tcagtttgct gtgtgtttgc tcaaacagat gaaaatagat
```

301 gtttaaaagc aaatgccaaa tcatgtggag aatgtataca agcagggcca aattgtgggt

361 ggtgcacaaa ttcaacattt ttacaggaag gaatgcctac ttctgcacga tgtgatgatt

421 tagaagcctt aaaaaagaag ggttgccctc cagatgacat agaaaatccc agaggctcca

481 aagatataaa gaaaaataaa aatgtaacca accgtagcaa aggaacagca gagaagctca

541 agccagagga tattactcag atccaaccac agcagttggt tttgcgatta agatcagggg

601 agccacagac atttacatta aaattcaaga gagctgaaga ctatcccatt gacctctact

661 accttatgga cctgtcttac tcaatgaaag acgatttgga gaatgtaaaa agtcttggaa

721 cagatctgat gaatgaaatg aggaggatta cttcggactt cagaattgga tttggctcat

781 ttgtggaaaa gactgtgatg ccttacatta gcacaacacc agctaagctc aggaaccctt

841 gcacaagtga acagaactgc accagcccat ttagctacaa aaatgtgctc agtcttacta

901 ataaaggaga agtatttaat gaacttgttg gaaaacagcg catatctgga aatttggatt

961 ctccagaagg tggtttcgat gccatcatgc aagttgcagt ttgtggatca ctgattggct

1021 ggaggaatgt tacacggctg ctggtgtttt ccacagatgc cgggtttcac tttgctggag

1081 atgggaaact tggtggcatt gttttaccaa atgatggaca atgtcacctg gaaaataata

1141 tgtacacaat gagccattat tatgattatc cttctattgc tcaccttgtc cagaaactga

1201 gtgaaaataa tattcagaca atttttgcag ttactgaaga atttcagcct gtttacaagg

1261 agctgaaaaa cttgatccct aagtcagcag taggaacatt atctgcaaat tctagcaatg

1321 taattcagtt gatcattgat gcatacaatt ccctttcctc agaagtcatt ttggaaaacg

1381 gcaaattgtc agaaggcgta acaataagtt acaaatctta ctgcaagaac ggggtgaatg

1441 gaacagggga aaatggaaga aaatgttcca atatttccat tggagatgag gttcaatttg

1501 aaattagcat aacttcaaat aagtgtccaa aaaaggattc tgacagcttt aaaattaggc

1561 ctctgggctt tacggaggaa gtagaggtta ttcttcagta catctgtgaa tgtgaatgcc

1621 aaagcgaagg catccctgaa agtcccaagt gtcatgaagg aaatgggaca tttgagtgtg

1681 gcgcgtgcag gtgcaatgaa gggcgtgttg gtagacattg tgaatgcagc acagatgaag

1741 ttaacagtga agacatggat gcttactgca ggaaagaaaa cagttcagaa atctgcagta

1801 acaatggaga gtgcgtctgc ggacagtgtg tttgtaggaa gagggataat acaaatgaaa

1861 tttattctgg caaattctgc gagtgtgata atttcaactg tgatagatcc aatggcttaa

1921 tttgtggagg aaatggtgtt tgcaagtgtc gtgtgtgtga gtgcaacccc aactacactg

1981 gcagtgcatg tgactgttct ttggatacta gtacttgtga agccagcaac ggacagatct

2041 gcaatggccg gggcatctgc gagtgtggtg tctgtaagtg tacagatccg aagtttcaag

2101 ggcaaacgtg tgagatgtgt cagacctgcc ttggtgtctg tgctgagcat aaagaatgtg

2161 ttcagtgcag agccttcaat aaaggagaaa agaaagacac atgcacacag gaatgttcct

2221 attttaacat taccaaggta gaaagtcggg acaaattacc ccagccggtc caacctgatc

2281 ctgtgtccca ttgtaaggag aaggatgttg acgactgttg gttctatttt acgtattcag

2341 tgaatgggaa caacgaggtc atggttcatg ttgtggagaa tccagagtgt cccactggtc

2401 cagacatcat tccaattgta gctggtgtgg ttgctggaat tgttcttatt ggccttgcat

2461 tactgctgat atggaagctt ttaatgataa ttcatgacag aagggagttt gctaaatttg

2521 aaaaggagaa aatgaatgcc aaatgggaca cgggtgaaaa tcctatttat aagagtgccg

2581 taacaactgt ggtcaatccg aagtatgagg gaaaatgagt actgcccgtg caaatcccac

2641 aacactgaat gcaaagtagc aatttccata gtcacagtta ggtagcttta gggcaatatt

2701 gccatggttt tactcatgtg caggttttga aaatgtacaa tatgtataat ttttaaaatg

2761 ttttattatt ttgaaaataa tgttgtaatt catgccaggg actgacaaaa gacttgagac

2821 aggatggtta ctcttgtcag ctaaggtcac attgtgcctt tttgaccttt tcttcctgga

2881 ctattgaaat caagcttatt ggattaagtg atatttctat agcgattgaa agggcaatag

2941 ttaaagtaat gagcatgatg agagtttctg ttaatcatgt attaaaactg atttttagct

3001 ttacaaatat gtcagtttgc agttatgcag aatccaaagt aaatgtcctg ctagctagtt

3061 aaggattgtt ttaaatctgt tattttgcta tttgcctgtt agacatgact gatgacatat

3121 ctgaaagaca agtatgttga gagttgctgg tgtaaaatac gtttgaaata gttgatctac

3181 aaaggccatg ggaaaaattc agagagttag gaaggaaaaa ccaatagctt taaaacctgt

3241 gtgccatttt aagagttact taatgtttgg taacttttat gccttcactt tacaaatttca

3301 agccttagat aaaagaaccg agcaattttc tgctaaaaag tccttgattt agcactattt

3361 acatacaggc catactttac aaagtatttg ctgaatgggg acctttttgag ttgaatttat

3421 tttattattt ttattttgtt taatgtctgg tgctttctgt cacctcttct aatcttttaa

3481 tgtatttgtt tgcaattttg gggtaagact ttttttatga gtacttttttc tttgaagttt

3541 tagcggtcaa tttgcctttt taatgaacat gtgaagttat actgtggcta tgcaacagct

3601 ctcacctacg cgagtcttac tttgagttag tgccataaca gaccactgta tgtttacttc

3661 tcaccatttg agttgcccat cttgtttcac actagtcaca ttcttgtttt aagtgccttt

3721 agttttaaca gttcactttt tacagtgcta tttactgaag ttatttatta aatatgccta

3781 aaatacttaa atcggatgtc ttgactctga tgtattttat caggttgtgt gcatgaaatt

3841 tttatagatt aaagaagttg aggaaaagca aaaaaaaaa

(SEQ ID NO:23)

Fig.10

Fig. 10a: cDNA encoding LC of anti-α2 integrin mAB

```
atggagacagacacactcctgctatgggtgctgctgctctgggttccaggttccacaggtaacattgtgctgaccca
atctccagcttctttggctgtgtctctagggcagagggccaccatatcctgcagagccagtgaaagtgttgagagtt
atggcaacagttttatttactggtaccagcagaaaccaggacaggcacccaaactcctcatctatcttgcatccaac
ctagcatctggggtccctgccaggttcagtggcagtgggtctaggacagacttcaccctcaccattgatcctgtgga
ggctgatgatgctgcaacctattactgtcagcaaaataatgaggatccgtacacgttcggaggggggaccaagctgg
aaataaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtgagcagttaacatctggaggtgcc
tcagtcgtgtgcttcttgaacaacttctaccccaaagacatcaatgtcaagtggaagattgatggcagtgaacgaca
aaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcacgttga
ccaaggacgagtatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcacccattgtcaag
agcttcaacaggaatgagtgctag
```

(SEQ ID NO:45)

Fig. 10b: cDNA encoding HC anti-α2 integrin mAB

```
atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagccacaggtgtccactcccaggtccaactgcatcagcc
tggggctgaacttgtgaagcctggggctccagtgaagctgtcctgcaaggcttctggctacaccttcaccagctact
ggatgaactgggtgaagcagaggcctggacgaggcctcgagtggattggcaggattgatccttccgatagtgaaact
cactacaatcaaaagttcaaggacaaggccacactgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatccaactcag
cagcctgacatctgaggactctgcggtctattactgtgcaaaggtgggacgggggtactttgactactggggccaag
gcaccactctcacagtctcctcagctaaaacaacagccccatcggtctatccactggcccctgtgtgtggagataca
actggctcctcggtgactctaggatgcctggtcaagggttatttccctgagccagtgaccttgacctggaactctgg
atccctgtccagtggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagtctgacctctacaccctcagcagctcagtgactg
taacctcgagcacctggcccagccagtccatcacctgcaatgtggcccacccggcaagcagcaccaaggtggacaag
aaaattgagcccagagggcccacaatcaagccctgtcctccatgcaaatgcccagcacctaacctcttgggtggacc
atccgtcttcatcttccctccaaagatcaaggatgtactcatgatctccctgagccccatagtcacatgtgtggtgg
tggatgtgagcgaggatgacccagatgtccagatcagctggtttgtgaacaacgtggaagtacacacagctcagaca
caaacccatagagaggattacaacagtactctccgggtggtcagtgccctccccatccagcaccaggactggatgag
tggcaaggagttcaaatgcaaggtcaacaacaaagacctcccagcgcccatcgagagaaccatctcaaaacccaaag
ggtcagtaagagctccacaggtatatgtcttgcctccaccagaagaagagatgactaagaaacaggtcactctgacc
tgcatggtcacagacttcatgcctgaagacatttacgtggagtggaccaacaacgggaaaacagagctaaactacaa
gaacactgaaccagtcctggactctgatggttcttacttcatgtacagcaagctgagagtggaaaagaagaactggg
tggaaagaaatagctactcctgttcagtggtccacgagggtctgcacaatcaccacacgactaagagcttctcccgg
actcccgggaagtga
```

(SEQ ID NO:46)

Fig. 10c: Amino acid sequence of secreted LC of anti-α2 integrin mAB

```
nivltqspaslavslgqratiscrasesvesygnsfiywyqqkpgqapkllliylasnlasgvparfsgsgsrtdftl
tidpveaddaatyycqqnnedpytfgggtkleikradaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfypkdinvkwki
dgserqngvlnswtdqdskdstysmsstltltkdeyerhnsytceathktstspivksfnrnec
```

(SEQ ID NO:47)

Fig. 10d: Amino acid sequence of secreted HC of anti-α2 integrin mAB

qvqlhqpgaelvkpgapvklsckasgytftsywmnwvkqrpgrglewigridpsdsethynqkfkdkatltvdksss
tayiqlssltsedsavyycakvgrgyfdywgqgttltvssakttapsvyplapvcgdttgssvtlgclvkgyfpepv
tltwnsgslssgvhtfpavlqsdlytlsssvtvtsstwpsqsitcnvahpasstkvdkkieprgptikpcppckcpa
pnllggpsvfifppkikdvlmislspivtcvvvdvseddpdvqiswfvnnvevhtaqtqthredynstlrvvsalpi
qhqdwmsgkefkckvnnkdlpapiertiskpkgsvrapqvyvlpppeeemtkkqvtltcmvtdfmpediyvewtnng
ktelnykntepvldsdgsyfmysklrvekknwvernsyscsvvheglhnhhttksfsrtpgk

(SEQ ID NO:48)

Fig. 10e: Amino acid sequence of comparator antibody

Amino acid sequence of LC of comparator

DFVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCSAQSSVNYIHWYQQKPDQAPKKLIYDTSKLASGVPSR
FSGSGSGTDYTFTISSLEAEDAATYYCQQWTTNPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO.53)

Fig. 10f: Amino acid sequence of HC of comparator

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGIHWIRQPPGKGLEWLGVIWARGFTN
YNSALMSRLTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARANDGVYYAMDYWGQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE
FEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

(SEQ ID NO:54)

Fig.11

Fig. 11: Equilibrium dissociation constants K_D for the humanized variants and the comparator as determined by Biacore

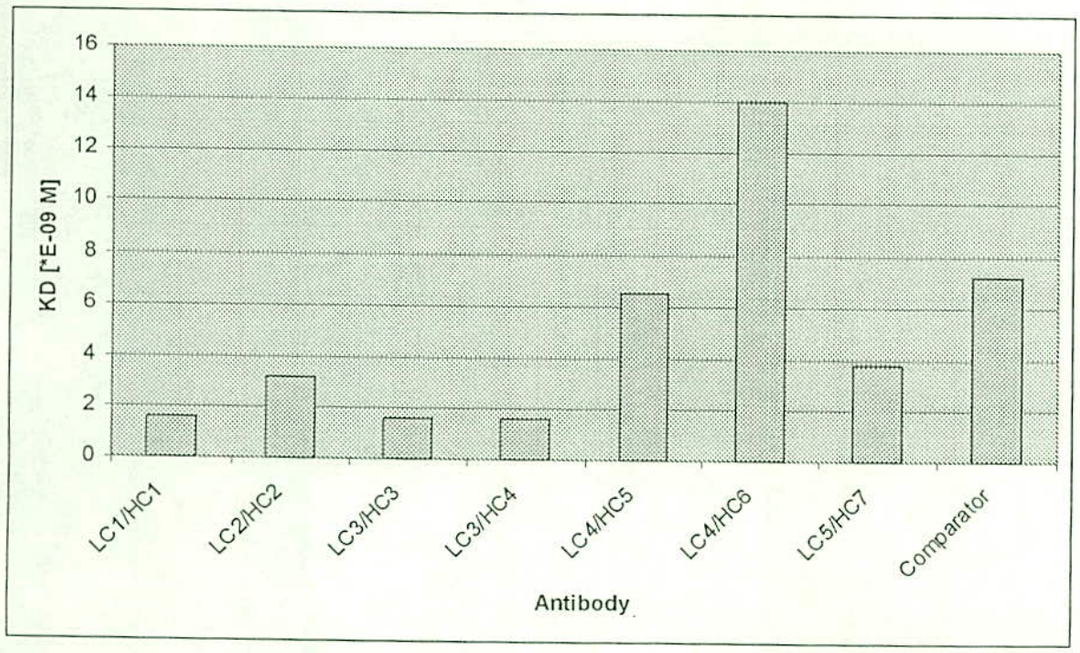


Fig.12

Fig. 12: Binding of comparator mAb TMC2206 to integrin α_2 I domain pre-bound by non-humanized Fab measured using Biacore

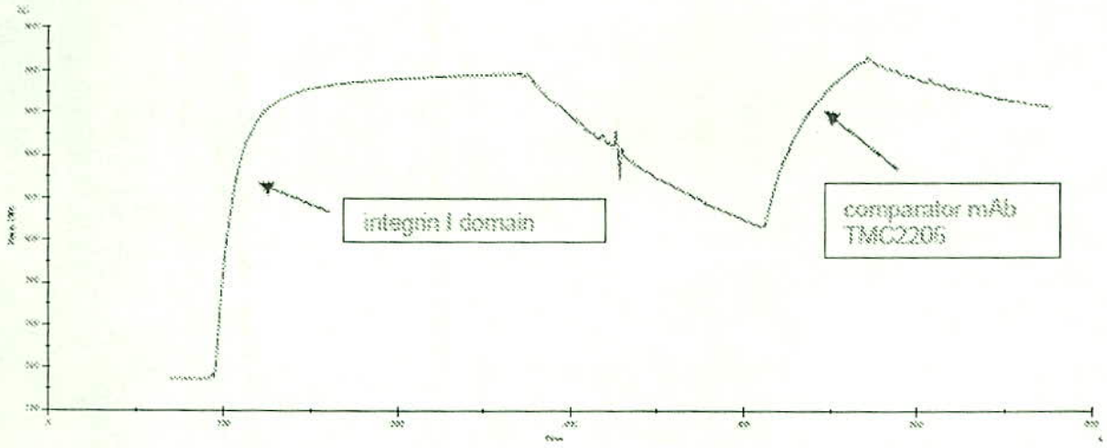


Fig.13

Fig. 13: Binding of non-humanized Fab to integrin α_2 I domain pre-bound by comparator mAb TMC2206

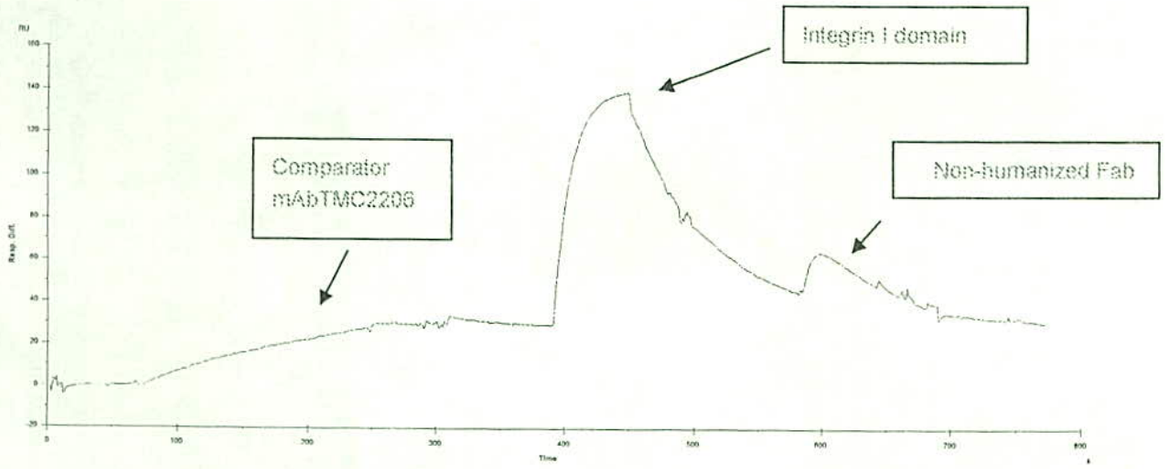
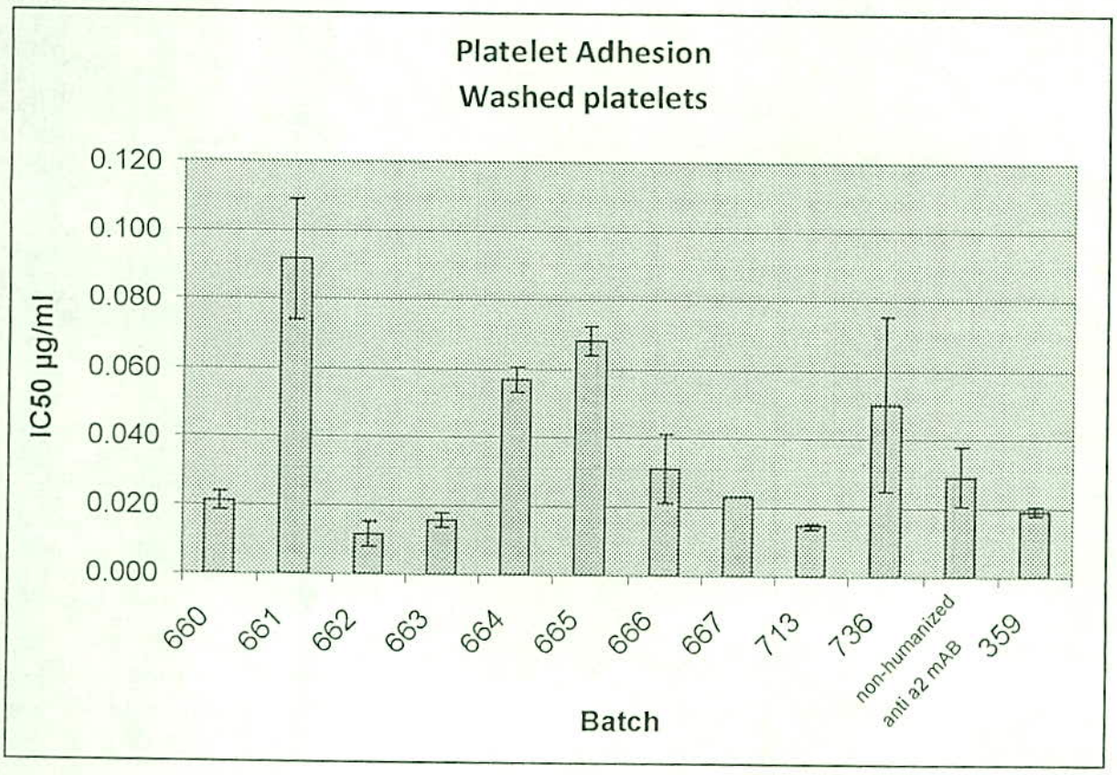


Fig.14

Figure 14: Inhibiton of platelet adhesion to collagen under static conditions using washed platelets



PÉPTIDO O COMPLEJO PEPTÍDICO QUE SE UNE A INTEGRINA α2 Y MÉTODOS Y USOS QUE IMPLICAN A LOS MISMOS

La presente invención está relacionada con un péptido o complejo peptídico que se une a integrina α2 para su uso en el tratamiento, profilaxis o diagnóstico, a uno o más ácidos nucleicos que codifican el péptido o complejo peptídico, una célula recombinante que produce el péptido o complejo peptídico, un método para producir el péptido o complejo peptídico, una composición farmacéutica que comprende el péptido o complejo peptídico o el ácido nucleico o los ácidos nucleicos para su uso como un medicamento, un método para detectar integrina α2 y un método de exploración.

Antecedentes de la invención

Las integrinas son proteínas transmembrana que median interacciones entre moléculas de adhesión en células adyacentes y/o la matriz extracelular (ECM). Las integrinas desempeñan diversos papeles en varios procesos biológicos incluyendo migración celular durante el desarrollo y curación de heridas, diferenciación celular y apoptosis. Sus actividades también pueden regular el potencial metastásico e invasivo de células tumorales. Existen como heterodímeros que consisten en subunidades α y β. Algunas subunidades α y β muestran especificidad entre sí y pueden designarse como un miembro de VLA (antígeno muy tardío). Los heterodímeros se unen preferentemente a ciertas moléculas de adhesión celular o constituyentes de la ECM. Aunque no tienen actividad catalítica, las integrinas pueden ser parte de complejos de señalización multimolecular conocidos como adhesiones focales.

Tras unirse a los ligandos, las integrinas transducen señales intracelulares al citoesqueleto que modifican la actividad celular en respuesta a estos acontecimientos de adhesión celular, denominadas señalización de fuera a dentro. Dicha señalización también puede activar otros subtipos de integrina expresados en la misma célula, denominada señalización de dentro a fuera. La señalización de dentro a fuera se produce además mediante señales reguladoras que se originan dentro del citoplasma celular tales como una interrupción de la unión entre una subunidad α y β, que se transmite después al dominio de unión a ligando externo del receptor. Las integrinas pueden desempeñar papeles importantes en los

acontecimientos de adhesión celular que controlan el desarrollo, morfogénesis de órganos, fisiología y patología así como homeostasis tisular normal y respuestas inmunes y trombóticas y además actúan como sensores ambientales para la célula. Uno de los heterodímeros de integrina es integrina $\alpha 2\beta 1$. La integrina $\alpha 2\beta 1$ se expresa en varios tipos celulares diferentes, incluyendo células endoteliales y epiteliales, fibroblastos, linfocitos y plaquetas. La especificidad de ligando de $\alpha 2\beta 1$ varía con el tipo celular. Aunque actúa como un receptor de colágeno en plaquetas y fibroblastos, puede actuar como un receptor tanto de laminina como de colágeno en células endoteliales y epiteliales.

La integrina $\alpha 2\beta 1$ es una molécula compuesta de una subunidad de integrina $\alpha 2$ de la familia de las integrinas α y una subunidad de integrina $\beta 1$ de la familia de la integrinas β. Las secuencias de integrina $\alpha 2$ y $\beta 1$ se conocen en la técnica y están publicadas, por ejemplo, en Takada y Hemler J. Cell. 109 (1): 397-407, 1989 y Argraves, W.S, J. Cell. Biol. Sep. 105 (3): 1183-90 (1987). Se indican secuencias de ejemplo en la Figura 9, y secuencias adicionales pueden obtenerse de la base de datos del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI), por ejemplo con los números de acceso de NCBI NP_002194 NM_002203, NM_002211, NP_002202 (isoforma de integrina $\beta 1$ 1A) para integrina $\alpha 2$ y $\beta 1$ de homo sapiens, véase también posteriormente.

Se conocen en la técnica variantes de corte y empalme alternativo, isoformas, así como secuencias de origen no humano (tal como roedor (ratón, rata, etc.), simio u otros) y representan posibles realizaciones alternativas siempre que muestren al menos una de las funciones conocidas de la integrina $\alpha 2$ o $\beta 1$.

La subunidad $\alpha 2$ es un miembro de un subconjunto de subunidades de integrina α que contienen un dominio de aproximadamente 200 aminoácidos localizado cerca del extremo amino terminal denominado con frecuencia el dominio I (o insertado). Muchos dominios I, incluyendo el dominio I de la subunidad de integrina y $\alpha 2$ contienen un sitio de unión a cationes adicional, el motivo de sitio de adhesión dependiente de iones metálicos (MIDAS). La caracterización estructural del dominio I de integrina $\alpha 2$ está publicado, por ejemplo, en Dickeson *et al.*, J. Biol. Chemistry, 272, 7661-7668 (1997). Los dominios I son determinantes importantes en la unión del ligando. La secuencia de aminoácidos de un dominio I de integrina $\alpha 2$ humana puede obtenerse de la Figura 9 a, como está marcado en la secuencia

REIVINDICACIONES

1. Péptido o complejo peptídico, preferentemente anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho péptido o complejo peptídico, anticuerpo o fragmento se unen específicamente al dominio I de la integrina α2 humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento un dominio de región variable de la cadena pesada (VH) y un dominio de región variable de la cadena ligera (VL), en el que dicho anticuerpo o fragmento presenta reactividad cruzada con integrina α2 no humana de primate pero no presenta reactividad cruzada con integrina α2 que no sea de primate.

2. Péptido o complejo peptídico, preferentemente anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho péptido o complejo peptídico, anticuerpo o fragmento se unen específicamente al dominio I de la integrina α2 humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento un dominio de región variable de la cadena pesada (VH) y un dominio de región variable de la cadena ligera (VL), en el que dicho anticuerpo o fragmento compite con un anticuerpo de referencia por la unión al epítopo del anticuerpo de referencia, comprendiendo dicho anticuerpo de referencia una cadena ligera codificada por el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de adhesión DSM 23944 y una cadena pesada codificada por (i) el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de adhesión DSM 23946 o bien (ii) el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de adhesión DSM 23945.

3. Péptido o complejo peptídico, preferentemente anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende uno o más de los siguientes componentes a) a f):

a) LCDR1, en el que LDR1 es RASESVESYGNSFIY (SEC ID Nº 6) o una variante funcionalmente activa de la misma,

b) LCDR2, en el que LDR2 es LASNLAS (SEC ID Nº 7) o una variante funcionalmente activa de la misma,

c) LCDR3, en el que LDR3 es QQNNEDPYT (SEC ID Nº 8) o una variante funcional activa de la misma,

d) HCDR1, en el que HDR1 es (GYTFTSYWMN, SEC ID Nº 3) o una variante funcionalmente activa de la misma,

e) HCDR2, en el que HDR2 es RIDPSDSETHYNQKFK (SEC ID Nº 4) o una variante funcionalmente activa de la misma, y

f) HCDR3, en el que HDR3 es VGRGYFDY (SEC ID Nº 5) o una variante funcional activa de la misma,

y en el que el uno o más de los componentes a) a f) se disponen para permitir la unión del péptido o complejo peptídico a la integrina α2.

4. Péptido o complejo peptídico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-3,

(i) en el que los componentes a) a c) están comprendidos en un dominio variable de una cadena ligera (VL); y/o

(ii) en el que los componentes d) a f) están comprendidos en un dominio variable de una cadena pesada (VH); y/o

(iii) en el que el péptido o complejo peptídico es un anticuerpo; y/o

(iv) en el que el péptido o complejo peptídico es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un Fab, un Fab', un F(ab')2, un Fv, un Fv unido por puente disulfuro, un scFv, un $(scFv)_2$, un anticuerpo de dominio único, un dianticuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo específico doble, un anticuerpo de isotipo, un anticuerpo de dominio variable doble y un anticuerpo biespecífico; y/o

(v) en el que el péptido o complejo peptídico comprende un dominio constante de inmunoglobulina de la cadena pesada seleccionado entre el grupo que consiste en: un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgGl humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgE humana y un dominio constante de IgA humana; y/o

(vi) en el que la variante funcionalmente activa es un fragmento funcionalmente activo que consiste en al menos 90 % de identidad de

secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEC ID Nº 3 a 8; y/o

(vii) en el que la variante funcionalmente activa es una variante funcionalmente activa que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEC ID Nº 3 a 8, particularmente en el que la variante funcionalmente activa deriva de una o más sustituciones conservativas de aminoácidos en las secuencias de aminoácidos de cualquiera de SEC ID Nº 3 a 8; y/o

(viii) que comprende la secuencia de aminoácidos de:

- SEC ID Nº 1, o una variante funcionalmente activa de la misma, y/o
- SEC ID Nº 2, o una variante funcionalmente activa de la misma, y/o
- SEC ID Nº 9, o una variante funcionalmente activa de la misma, y/o
- SEC ID Nº 10, o una variante funcionalmente activa de la misma, y/o
- SEC ID Nº 11, o una variante funcionalmente activa de la misma, o

(ix) que comprende la secuencia de aminoácidos de:

- SEC ID Nº 1, o una variante funcionalmente activa de la misma, y
- SEC ID Nº 2, o una variante funcionalmente activa de la misma, y
- opcionalmente 50 restos de aminoácido adicionales, preferentemente de 1 a 40, más preferentemente de 1 a 30, incluso más preferentemente como máximo de 1 a 25, todavía más preferentemente como máximo de 1 a 10, lo más preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 restos de aminoácido adicionales o

(x) que comprende la secuencia de aminoácidos de:

- SEC ID Nº 9, o una variante funcionalmente activa de la misma, y
- SEC ID Nº 10, o una variante funcionalmente activa de la misma, y
- opcionalmente 50 restos de aminoácido adicionales, preferentemente de 1 a 40, más preferentemente de 1 a 30, incluso más preferentemente como máximo de 1 a 25, todavía

más preferentemente como máximo de 1 a 10, lo más preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 restos de aminoácido adicionales o

(xi) que comprende la secuencia de aminoácidos de:

- SEC ID Nº 9, o una variante funcionalmente activa de la misma, y
- SEC ID Nº 11, o una variante funcionalmente activa de la misma, y
- opcionalmente 50 restos de aminoácido adicionales, preferentemente de 1 a 40, más preferentemente de 1 a 30, incluso más preferentemente como máximo de 1 a 25, todavía más preferentemente como máximo de 1 a 10, lo más preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 restos de aminoácido adicionales.

5. Péptido o complejo peptídico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 - 4;

- en el que la variante funcionalmente activa de LDR1 comprende una mutación en el aminoácido en la posición 11, particularmente 11Asn→Gln; y/o
- en el que la variante funcionalmente activa de HDR2 comprende una mutación en el aminoácido de la posición 6, particularmente 6Asp→Glu; y/o
- en el que la variante funcionalmente activa de SEC ID Nº 1 comprende una o más mutaciones en los aminoácidos en las posiciones 9, 12, 15, 22, 34, 46, 47, 80, 83, 85, 87 y/o 89, seleccionadas particularmente entre el grupo que consiste en 9Ala→Ser, 12Ala→Ser, 15Leu→Val, 15Leu→Pro, 22Ser→Thr, 34Asn→Gln, 46Gln→Lys, 47Ala→Pro, 80Asp→Asn, 83Glu→Gln, 85Asp→Glu, 87Ala→Thr y 89Thr→Asn; y/o
- en el que la variante funcionalmente activa de SEC ID Nº 2 comprende una o más mutaciones en los aminoácidos en las posiciones 5, 7, 11, 12, 17, 20, 38, 40, 43, 55, 61, 65, 66, 67, 76, 81, 82, 87, 91, 93, 112, 113 y/o 116, seleccionadas particularmente entre el grupo que consiste en 5His→Val, 7Pro→Ser, 11Leu→Val, 12Val→Lys, 17Pro→Ser, 20Leu→Val, 38Lys→Arg, 40Arg→Ala, 43Arg→Gln, 55Asp→Glu, 61Asn→Ala, 65Lys→Gln, 66Asp→Gly, 67Lys→Arg, 76Ser→Thr,

81Ile→Met, 82Gln→Glu, 87Thr→Arg, 91Ser→Thr, 93Val→Lys, 112Thr→Leu, 113Leu→Val y 116Ser→Val .

6. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho anticuerpo o fragmento se une específicamente al dominio I de la integrina α2 humana con una afinidad de unión de orden nM.

7. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho péptido o complejo peptídico inhibe la interacción de la integrina α2 humana con el colágeno *in vitro*, inhibiendo de esa manera la activación de las plaquetas debida a la adhesión de dichas plaquetas a dicho colágeno.

8. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, comprendiendo dicho dominio de región variable de la cadena pesada la cadena pesada HCDR3 de SEC ID Nº 5.

9. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, comprendiendo dicho dominio de región variable de la cadena pesada las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs) de la cadena pesada de SEC ID Nº 3 (HCDR1), SEC ID Nº 4 (HCDR2), y SEC ID Nº 5 (HCDR3), o variantes funcionalmente activas de las mismas.

10. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la variante funcionalmente activa de HCDR2 comprende la mutación Asp→Glu en el aminoácido en la posición 6.

11. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, comprendiendo dicho dominio de región variable de la cadena ligera la cadena ligera LCDR3 de SEC ID Nº 8.

12. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, comprendiendo dicho dominio de región variable de la

cadena ligera las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs) de la cadena ligera de SEC ID Nº 6 (LCDR1), SEC ID Nº 7 (LCDR2), y SEC ID Nº 8 (LCDR3), o variantes funcionalmente activas de las mismas.

13. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la variante funcionalmente activa de LCDR1 comprende la mutación Asn→Gln en el aminoácido en la posición 11.

14. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, teniendo dicho dominio de región variable de la cadena pesada (VH) al menos 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de VH de SEC ID Nº 2.

15. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho dominio de región variable de la cadena pesada (VH) comprende la secuencia de SEC ID Nº 2 o una variante funcionalmente activa de la misma.

16. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, teniendo dicho dominio de región variable de la cadena ligera (VL) al menos 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de VL de SEC ID Nº 1.

17. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho dominio de región variable de la cadena ligera (VL) comprende la secuencia de SEC ID Nº 1 o una variante funcionalmente activa de la misma.

18. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que dicho dominio de región variable de la cadena pesada (VH) comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en H5, H7, H11, H12, H17, H20, H38, H40, H43, H55, H61, H65, H66, H67, H76, H81, H82, H87, H91, H93, H112, H113 y H116.

19. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con la reivindicación 18, en el que las una o más sustituciones de aminoácidos se seleccionan entre el grupo que consiste en 5His→Val, 7Pro→Ser, 11Leu→Val, 12Val→Lys, 17Pro→Ser, 20Leu→Val, 38Lys→Arg, 40Arg→Ala, 43Arg→Gln, 55Asp→Glu, 61Asn→Ala, 65Lys→Gln, 66Asp→Gly, 67Lys→Arg, 76Ser→Thr, 81Ile→Met, 82Gln→Glu, 87Thr→Arg, 91Ser→Thr, 93Val→Lys, 112Thr→Leu, 113Leu→Val y 116Ser→Val .

20. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que dicho dominio de región variable de la cadena ligera (VL) comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en L9, L12, L15, L22, L34, L46, L47, L80, L83, L85, L87, y L89.

21. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con la reivindicación 20, en el que las una o más sustituciones de aminoácidos se seleccionan entre el grupo que consiste en 9Ala→Ser, 12Ala→Ser, 15Leu→Val, 15Leu→Pro, 22Ser→Thr, 34Asn→Gln, 46Gln→Lys, 47Ala→Pro, 80Asp→Asn, 83Glu→Gln, 85Asp→Glu, 87Ala→Thr y 89Thr→Asn.

22. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, teniendo dicho dominio de región variable de la cadena pesada (VH) al menos 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de VH seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº 38 (HC1), SEC ID Nº 39 (HC2), SEC ID Nº 40 (HC3), SEC ID Nº 41 (HC4), SEC ID Nº 42 (HC5), SEC ID Nº 43 (HC6), y SEC ID Nº 44 (HC7).

23. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con la reivindicación 22, comprendiendo dicho dominio de región variable de la cadena pesada (VH) una secuencia de VH seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº 38 (HC1), SEC ID Nº 39 (HC2), SEC ID Nº 40 (HC3), SEC ID Nº 41 (HC4), SEC ID Nº 42 (HC5), SEC ID Nº 43 (HC6), y SEC ID Nº 44 (HC7).

24. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, teniendo dicho dominio de región variable de la cadena

ligera (VL) al menos 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de VL seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº 33 (LC1), SEC ID Nº 34 (LC2), SEC ID Nº 35 (LC3), SEC ID Nº 36 (LC4), y SEC ID Nº 37 (LC5).

25. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con la reivindicación 24, comprendiendo dicho dominio de región variable de la cadena ligera (VL) una secuencia de VL seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº 33 (LC1), SEC ID Nº 34 (LC2), SEC ID Nº 35 (LC3), SEC ID Nº 36 (LC4), y SEC ID Nº 37 (LC5).

26. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que dicho anticuerpo o porción de unión es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

27. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la porción de unión a antígeno se selecciona entre el grupo que consiste en un Fab, un Fab', un F(ab')2, un Fv, un Fv unido por puente disulfuro, un scFv, y un $(scFv)_2$.

28. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, que se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo específico doble, un anticuerpo de isotipo, un anticuerpo de dominio variable doble y un anticuerpo biespecífico.

29. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, que comprende un dominio constante de inmunoglobulina de la cadena pesada seleccionado entre el grupo que consiste en: un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgGI humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgE humana, y un dominio constante de IgA humana.

30. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, que comprende un dominio constante de IgG4 humana.

31. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que el péptido o complejo peptídico comprende o consiste en un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

32. Uno o más ácidos nucleicos que codifican el péptido o complejo peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31.

33. Péptido o complejo peptídico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-31 para su uso en el tratamiento, profilaxis o diagnóstico de una enfermedad o trastorno relacionado con la integrina α2.

34. El ácido o ácidos nucleicos de la reivindicación 32, en el que el ácido o ácidos nucleicos se localizan en un vector.

35. Una célula que expresa de forma heteróloga uno de los ácidos nucleicos de acuerdo con las reivindicaciones 32 o 34.

36. Un método para la producción de un péptido o complejo peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 que comprende el cultivo de la célula de acuerdo con la reivindicación 35 en condiciones que permitan la expresión del péptido o complejo peptídico y opcionalmente la recuperación del péptido o complejo peptídico de la célula anfitriona.

37. Una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido o complejo peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 y/o al menos un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 32 o 34 para su uso como un medicamento.

38. La composición farmacéutica de la reivindicación 37 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno relacionado con la

integrina α2, seleccionado preferentemente entre el grupo que consiste en trombosis, una enfermedad vascular, cáncer, incluyendo neo-angiogénesis y metástasis, inflamación, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmune y una enfermedad caracterizada por una angiogénesis anormal o aumentada, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, reacciones a trasplantes, neuritis óptica, traumatismo de la médula espinal, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, síndrome de Reynaud, encefalomielitis autoinmune experimental, síndrome de Sjorgen, esclerodermia, enfermedad cardiovascular, psoriasis, e infecciones que provocan una respuesta inflamatoria.

39. La composición farmacéutica de la reivindicación 37 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad vascular y/o trombosis, particularmente en el tratamiento de síndrome coronario agudo, intervención coronaria percutánea, apoplejía isquémica, estenosis de la arteria carótida o enfermedad oclusiva arterial periférica.

40. Un método para el diagnóstico de una enfermedad asociada con integrina α2 alterada, comprendiendo el método:

a) poner en contacto una muestra que comprende integrina α2 con el péptido o complejo peptídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31; y

b) detectar la unión de la integrina α2 al péptido o complejo peptídico; y

c) comparar la unión de la etapa b) con una referencia,

en el que una unión a integrina α2 alterada en la muestra con respecto a la referencia es indicativa de la enfermedad.

41. Artículo de manufactura que comprende:

a) un material de envasado,

b) un péptido o complejo peptídico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-31 o 33 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o que comprenda la composición farmacéutica de una de las reivindicaciones 36-38

c) una etiqueta o un prospecto, estando contenido el prospecto dentro de dicho material de envasado, que indica que dicho péptido o complejo peptídico es eficaz para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, especialmente para una enfermedad o trastorno relacionado con la integrina α2.

42. Kit de diagnóstico para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno relacionado con la integrina α2 que comprende un péptido o complejo peptídico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-31 y un envasado adecuado, y posiblemente instrucciones adecuadas para el uso de dicho péptido o complejo peptídico en la detección de integrina α2.

43. Método de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad o trastorno relacionado con la integrina α2 que usa uno o más péptidos o complejos de péptidos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-31 y/o uno o más ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 32 o 34 o una de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con una de las reivindicaciones 36-38.

44. Un método para el diagnóstico de una enfermedad asociada con integrina α2 alterada, comprendiendo dicho método:

a) poner en contacto una muestra tomada de un individuo con el péptido o complejo peptídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31; y

b) detectar la unión de la integrina α2 al péptido o complejo peptídico; y

c) comparar la unión de la etapa b) con la unión de la integrina α2 al péptido o complejo peptídico en una o más muestras de referencia,

en el que una unión alterada en la muestra tomada con respecto a la unión detectada en las una o más muestras de referencia es indicativa de la enfermedad.

Resumen

PÉPTIDO O COMPLEJO PEPTÍDICO QUE SE UNE A INTEGRINA α2 Y MÉTODOS Y USOS QUE IMPLICAN A LOS MISMOS

La presente invención se refiere a un péptido o complejo peptídico que se unen a integrina α2, a uno o más ácidos nucleicos que codifican el péptido o complejo peptídico, a una célula recombinante que produce el péptido o complejo peptídico, a un método para la producción del péptido o complejo peptídico, a una composición farmacéutica que comprende el péptido o complejo peptídico o el ácido o ácidos nucleicos para su uso como un medicamento, a un método para la detección de integrina α2 y a un método de cribado.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SANOFI

<120> Péptido o complejo peptídico que se une a integrina alfa 2 y métodos y usos que implican a los mismos

<130> DE2010/156

<140> EP10305929.1
<141> 2010-08-31

<160> 54

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio variable de la cadena ligera de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 1

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 2
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio variable de la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 2

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

Pro Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR1 del dominio variable de la cadena pesada

<400> 3

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn
1 5 10

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR2 del dominio variable de la cadena pesada

<400> 4

Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR3 del dominio variable de la cadena pesada

<400> 5

Val Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR1 del dominio variable de la cadena ligera

<400> 6

Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR2 del dominio variable de la cadena ligera

<400> 7

Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR3 del dominio variable de la cadena ligera

<400> 8

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 9
<211> 218
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera (anti-alpha2-VL-IGKC-CL) quimérica

<400> 9

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 10
<211> 443
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> mAb (anti-alpha2-VH-IGHG4-CH1) quimérico

<400> 10

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

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

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

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

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

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

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

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

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

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

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

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

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

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln

340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

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

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

<210> 11
<211> 231
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento Fab de la cadena pesada (anti-alpha2-VH-IGHG1-CH1) quimértico

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
    210                 215                 220

Thr His His His His His His
225                 230
```

<210> 12
<211> 333
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio variable de la cadena ligera del mAb anti-alfa2-integrina

<400> 12

```
aacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc       60

atatcctgca gagccagtga aagtgttgag agttatggca acagttttat ttactggtac      120

cagcagaaac caggacaggc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccaa cctagcatct      180

ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattgat      240

cctgtggagg ctgatgatgc tgcaacctat tactgtcagc aaaataatga ggatccgtac      300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa                                   333
```

<210> 13
<211> 351
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio variable de la cadena pesada del mAb anti-alfa2-integrina

<400> 13

```
caggtccaac tgcatcagcc tggggctgaa cttgtgaagc ctggggctcc agtgaagctg       60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg      120

cctggacgag gcctcgagtg gattggcagg attgatcctt ccgatagtga aactcactac      180

aatcaaaagt tcaaggacaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac      240
```

atccaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaaggtggga 300

cgggggtact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc a 351

<210> 14
<211> 654
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera (anti-alfa2-VL-IGKC-CL) quimérica

<400> 14
aacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atatcctgca gagccagtga aagtgttgag agttatggca acagttttat ttactggtac 120

cagcagaaac caggacaggc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccaa cctagcatct 180

ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattgat 240

cctgtggagg ctgatgatgc tgcaacctat tactgtcagc aaaataatga ggatccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgtacgg tggccgctcc ttccgtgttc 360

atcttccctc cctccgacga gcagctgaag tccggcaccg cctccgtggt gtgtctgctg 420

aacaacttct accctcggga ggccaaggtg cagtggaagg tggacaacgc cctgcagtcc 480

ggcaactccc aggagtccgt caccgagcag gactccaagg acagcaccta ctccctgtcc 540

tccaccctga ccctgtccaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg 600

acccaccagg gcctgtccag ccctgtgacc aagtccttca accggggcga gtgc 654

<210> 15
<211> 1329
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> mAb (anti-alfa2-VH-IGHG4-CH1) quimérico

<400> 15
caggtccaac tgcatcagcc tggggctgaa cttgtgaagc ctggggctcc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120

cctggacgag gcctcgagtg gattggcagg attgatcctt ccgatagtga aactcactac 180

aatcaaaagt tcaaggacaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240

atccaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaaggtggga 300

cgggggtact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agccagcacc 360

aagggccctt ccgtgttccc tctggccct tgctcccggt ccacctccga gtccaccgcc 420

gctctgggct gcctggtgaa ggactacttc cctgagcctg tgaccgtgtc ctggaactct 480

ggcgccctga cctccggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgcagtcctc cggcctgtac 540

tccctgtcct ccgtggtgac cgtgccttcc tcctccctgg gcaccaagac ctacacctgt 600

aacgtggacc acaagccttc caacaccaag gtggacaagc gggtggagtc caagtacggc 660

cctccttgcc ctccctgccc tgcccctgag ttcgagggcg gacctagcgt gttcctgttc 720

cctcctaagc ctaaggacac cctgatgatc tcccggaccc ctgaggtgac ctgtgtggtg 780

gtggacgtgt cccaggagga ccctgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840

gtgcacaacg ccaagaccaa gcctcgggag gagcagttca attccaccta ccgggtggtg 900

tctgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aagaatacaa gtgtaaggtc 960

tccaacaagg gcctgccctc ctccatcgag aaaaccatct ccaaggccaa gggccagcct 1020

agggagcctc aggtgtacac cctgcctcct agccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg 1080

tccctgacct gtctggtgaa gggcttctac ccttccgaca tcgccgtgga gtgggagtcc 1140

aacggccagc ctgagaacaa ctacaagacc acccctcctg tgctggactc cgacggctcc 1200

ttcttcctgt actccaggct gaccgtggac aagtcccggt ggcaggaggg caacgtcttt 1260

tcctgctccg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca cccagaagtc cctgtccctg 1320

tctctgggc 1329

<210> 16
<211> 693
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento Fab de la cadena pesada (anti-alfa2-VH-IGHG1-CH1) quimérico

<400> 16
caggtccaac tgcatcagcc tggggctgaa cttgtgaagc ctggggctcc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120

cctggacgag gcctcgagtg gattggcagg attgatcctt ccgatagtga aactcactac 180

aatcaaaagt tcaaggacaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240

atccaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaaggtggga 300

cgggggtact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agccagcacc 360

aagggcccat ccgtgttccc tctggccccc tcctccaagt ccacctccgg cggcaccgcc 420

gctctgggct gcctggtgaa ggactacttc cctgagcctg tgaccgtgtc ctggaactct 480

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgcagtcctc cggcctgtac 540

tccctgtcct ccgtggtgac cgtgccttcc tcctccctgg gcacccagac ctacatctgt 600

aacgtgaacc acaagccctc caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc taagtcctgt 660

gacaagaccc acacccatca ccatcaccat cac 693

<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína IGKC humana (Swiss-Prot: Q502W4)

<400> 17

```
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1               5                  10                  15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
            20                  25                  30

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

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
    50                  55                  60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
                85                  90                  95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            100                 105
```

<210> 18
<211> 327
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína IGHG4 humana (Swiss-Prot: P01861.1 (S108P, L115E))

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
```

115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 19
<211> 330
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína IGHG1 humana (Swiss-Prot: Q569F4)

<400> 19

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225                 230                 235                 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
```

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 20
<211> 1181
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Ser Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Val Ala Ala Ile Ser Thr Gly Glu
        435                 440                 445

Ser Thr His Phe Val Ala Gly Ala Pro Arg Ala Asn Tyr Thr Gly Gln
    450                 455                 460
```

```
Ile Val Leu Tyr Ser Val Asn Glu Asn Gly Asn Ile Thr Val Ile Gln
465                 470                 475                 480

Ala His Arg Gly Asp Gln Ile Gly Ser Tyr Phe Gly Ser Val Leu Cys
                485                 490                 495

Ser Val Asp Val Asp Lys Asp Thr Ile Thr Asp Val Leu Leu Val Gly
            500                 505                 510

Ala Pro Met Tyr Met Ser Asp Leu Lys Lys Glu Glu Gly Arg Val Tyr
        515                 520                 525

Leu Phe Thr Ile Lys Glu Gly Ile Leu Gly Gln His Gln Phe Leu Glu
    530                 535                 540

Gly Pro Glu Gly Ile Glu Asn Thr Arg Phe Gly Ser Ala Ile Ala Ala
545                 550                 555                 560

Leu Ser Asp Ile Asn Met Asp Gly Phe Asn Asp Val Ile Val Gly Ser
                565                 570                 575

Pro Leu Glu Asn Gln Asn Ser Gly Ala Val Tyr Ile Tyr Asn Gly His
            580                 585                 590

Gln Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Ile Leu Gly Ser Asp
        595                 600                 605

Gly Ala Phe Arg Ser His Leu Gln Tyr Phe Gly Arg Ser Leu Asp Gly
    610                 615                 620

Tyr Gly Asp Leu Asn Gly Asp Ser Ile Thr Asp Val Ser Ile Gly Ala
625                 630                 635                 640

Phe Gly Gln Val Val Gln Leu Trp Ser Gln Ser Ile Ala Asp Val Ala
                645                 650                 655

Ile Glu Ala Ser Phe Thr Pro Glu Lys Ile Thr Leu Val Asn Lys Asn
            660                 665                 670

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Glu Thr Thr Glu Leu Ser Ser
1175 1180

<210> 21
<211> 3546
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 21
atggggccag aacggacagg ggccgcgccg ctgccgctgc tgctggtgtt agcgctcagt 60

caaggcattt taaattgttg tttggcctac aatgttggtc tcccagaagc aaaaatattt 120

tccggtcctt caagtgaaca gtttggctat gcagtgcagc agtttataaa tccaaaaggc 180

aactggttac tggttggttc accctggagt ggctttcctg agaaccgaat gggagatgtg 240

tataaatgtc ctgttgacct atccactgcc acatgtgaaa aactaaattt gcaaacttca 300

acaagcattc caaatgttac tgagatgaaa accaacatga gcctcggctt gatcctcacc 360

aggaacatgg gaactggagg ttttctcaca tgtggtcctc tgtgggcaca gcaatgtggg 420

aatcagtatt acacaacggg tgtgtgttct gacatcagtc ctgattttca gctctcagcc 480

agcttctcac ctgcaactca gccctgccct tccctcatag atgttgtggt tgtgtgtgat 540

gaatcaaata gtatttatcc ttgggatgca gtaaagaatt ttttggaaaa atttgtacaa 600

ggcctggata taggccccac aaagacacag gtggggttaa ttcagtatgc caataatcca 660

agagttgtgt ttaacttgaa cacatataaa accaaagaag aaatgattgt agcaacatcc 720

cagacatccc aatatggtgg ggacctcaca aacacattcg gagcaattca atatgcaaga 780

aaatatgctt attcagcagc ttctggtggg cgacgaagtg ctacgaaagt aatggtagtt 840

gtaactgacg gtgaatcaca tgatggttca atgttgaaag ctgtgattga tcaatgcaac 900

catgacaata tactgaggtt tggcatagca gttcttgggt acttaaacag aaacgccctt 960

gatactaaaa atttaataaa agaaataaaa gcaatcgcta gtattccaac agaaagatac 1020

tttttcaatg tgtctgatga agcagctcta ctagaaaagg ctgggacatt aggagaacaa 1080

attttcagca ttgaaggtac tgttcaagga ggagacaact ttcagatgga aatgtcacaa 1140

gtgggattca gtgcagatta ctcttctcaa aatgatattc tgatgctggg tgcagtggga 1200

gcttttggct ggagtgggac cattgtccag aagacatctc atggccattt gatctttcct 1260

aaacaagcct ttgaccaaat tctgcaggac agaaatcaca gttcatattt aggttactct 1320

gtggctgcaa tttctactgg agaaagcact cactttgttg ctggtgctcc tcgggcaaat 1380

tataccggcc agatagtgct atatagtgtg aatgagaatg gcaatatcac ggttattcag 1440

gctcaccgag gtgaccagat tggctcctat tttggtagtg tgctgtgttc agttgatgtg 1500

gataaagaca ccattacaga cgtgctcttg gtaggtgcac caatgtacat gagtgaccta 1560

aagaaagagg aaggaagagt ctacctgttt actatcaaag agggcatttt gggtcagcac 1620

caatttcttg aaggccccga gggcattgaa aacactcgat ttggttcagc aattgcagct 1680

ctttcagaca tcaacatgga tggctttaat gatgtgattg ttggttcacc actagaaaat 1740

cagaattctg gagctgtata catttacaat ggtcatcagg gcactatccg cacaaagtat 1800

tcccagaaaa tcttgggatc cgatggagcc tttaggagcc atctccagta ctttgggagg 1860

tccttggatg gctatggaga tttaaatggg gattccatca ccgatgtgtc tattggtgcc 1920

tttggacaag tggttcaact ctggtcacaa agtattgctg atgtagctat agaagcttca 1980

ttcacaccag aaaaaatcac tttggtcaac aagaatgctc agataattct caaactctgc 2040

ttcagtgcaa agttcagacc tactaagcaa aacaatcaag tggccattgt atataacatc 2100

acacttgatg cagatggatt ttcatccaga gtaacctcca gggggttatt taaagaaaac 2160

aatgaaaggt gcctgcagaa gaatatggta gtaaatcaag cacagagttg ccccgagcac 2220

atcatttata tacaggagcc ctctgatgtt gtcaactctt tggatttgcg tgtggacatc 2280

agtctggaaa accctggcac tagccctgcc cttgaagcct attctgagac tgccaaggtc 2340

ttcagtattc ctttccacaa agactgtggt gaggacggac tttgcatttc tgatctagtc 2400

ctagatgtcc gacaaatacc agctgctcaa gaacaaccct ttattgtcag caaccaaaac 2460

aaaaggttaa cattttcagt aacgctgaaa aataaaaggg aaagtgcata caacactgga 2520

attgttgttg atttttcaga aaacttgttt tttgcatcat tctccctgcc ggttgatggg 2580

acagaagtaa catgccaggt ggctgcatct cagaagtctg ttgcctgcga tgtaggctac 2640

cctgctttaa agagagaaca acaggtgact tttactatta actttgactt caatcttcaa 2700

aaccttcaga atcaggcgtc tctcagtttc caagccttaa gtgaaagcca agaagaaaac 2760

aaggctgata atttggtcaa cctcaaaatt cctctcctgt atgatgctga aattcactta 2820

acaagatcta ccaacataaa tttttatgaa atctcttcgg atgggaatgt tccttcaatc 2880

gtgcacagtt ttgaagatgt tggtccaaaa ttcatcttct ccctgaaggt aacaacagga 2940

agtgttccag taagcatggc aactgtaatc atccacatcc ctcagtatac caaagaaaag 3000

aacccactga tgtacctaac tggggtgcaa acagacaagg ctggtgacat cagttgtaat 3060

gcagatatca atccactgaa aataggacaa acatcttctt ctgtatcttt caaaagtgaa 3120

aatttcaggc acaccaaaga attgaactgc agaactgctt cctgtagtaa tgttacctgc 3180

tggttgaaag acgttcacat gaaaggagaa tactttgtta atgtgactac cagaatttgg 3240

aacgggactt tcgcatcatc aacgttccag acagtacagc taacggcagc tgcagaaatc 3300

aacacctata accctgagat atatgtgatt gaagataaca ctgttacgat tcccctgatg 3360

ataatgaaac ctgatgagaa agccgaagta ccaacaggag ttataatagg aagtataatt 3420

gctggaatcc ttttgctgtt agctctggtt gcaattttat ggaagctcgg cttcttcaaa 3480

agaaaatatg aaaagatgac caaaaatcca gatgagattg atgagaccac agagctcagt 3540

agctga 3546

<210> 22
<211> 798
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Ser Lys Gly Thr Ala Glu Lys Leu Lys Pro Glu Asp Ile Thr
100 105 110

Gln Ile Gln Pro Gln Gln Leu Val Leu Arg Leu Arg Ser Gly Glu Pro
115 120 125

Gln Thr Phe Thr Leu Lys Phe Lys Arg Ala Glu Asp Tyr Pro Ile Asp
130 135 140

Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Glu
145 150 155 160

Asn Val Lys Ser Leu Gly Thr Asp Leu Met Asn Glu Met Arg Arg Ile
165 170 175

Thr Ser Asp Phe Arg Ile Gly Phe Gly Ser Phe Val Glu Lys Thr Val
180 185 190

Met Pro Tyr Ile Ser Thr Thr Pro Ala Lys Leu Arg Asn Pro Cys Thr
195 200 205

Ser Glu Gln Asn Cys Thr Ser Pro Phe Ser Tyr Lys Asn Val Leu Ser
210 215 220

Leu Thr Asn Lys Gly Glu Val Phe Asn Glu Leu Val Gly Lys Gln Arg
225 230 235 240

Ile Ser Gly Asn Leu Asp Ser Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met
245 250 255

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

Leu Leu Val Phe Ser Thr Asp Ala Gly Phe His Phe Ala Gly Asp Gly
275 280 285

Lys Leu Gly Gly Ile Val Leu Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Leu Glu
290 295 300

Asn Asn Met Tyr Thr Met Ser His Tyr Tyr Asp Tyr Pro Ser Ile Ala
305 310 315 320

His Leu Val Gln Lys Leu Ser Glu Asn Asn Ile Gln Thr Ile Phe Ala
325 330 335

Val Thr Glu Glu Phe Gln Pro Val Tyr Lys Glu Leu Lys Asn Leu Ile
340 345 350

Pro Lys Ser Ala Val Gly Thr Leu Ser Ala Asn Ser Ser Asn Val Ile
355 360 365

```
Gln Leu Ile Ile Asp Ala Tyr Asn Ser Leu Ser Ser Glu Val Ile Leu
    370                 375                 380

Glu Asn Gly Lys Leu Ser Glu Gly Val Thr Ile Ser Tyr Lys Ser Tyr
385                 390                 395                 400

Cys Lys Asn Gly Val Asn Gly Thr Gly Glu Asn Gly Arg Lys Cys Ser
                405                 410                 415

Asn Ile Ser Ile Gly Asp Glu Val Gln Phe Glu Ile Ser Ile Thr Ser
            420                 425                 430

Asn Lys Cys Pro Lys Lys Asp Ser Asp Ser Phe Lys Ile Arg Pro Leu
        435                 440                 445

Gly Phe Thr Glu Glu Val Glu Val Ile Leu Gln Tyr Ile Cys Glu Cys
    450                 455                 460

Glu Cys Gln Ser Glu Gly Ile Pro Glu Ser Pro Lys Cys His Glu Gly
465                 470                 475                 480

Asn Gly Thr Phe Glu Cys Gly Ala Cys Arg Cys Asn Glu Gly Arg Val
                485                 490                 495

Gly Arg His Cys Glu Cys Ser Thr Asp Glu Val Asn Ser Glu Asp Met
            500                 505                 510

Asp Ala Tyr Cys Arg Lys Glu Asn Ser Ser Glu Ile Cys Ser Asn Asn
        515                 520                 525

Gly Glu Cys Val Cys Gly Gln Cys Val Cys Arg Lys Arg Asp Asn Thr
    530                 535                 540

Asn Glu Ile Tyr Ser Gly Lys Phe Cys Glu Cys Asp Asn Phe Asn Cys
545                 550                 555                 560

Asp Arg Ser Asn Gly Leu Ile Cys Gly Gly Asn Gly Val Cys Lys Cys
                565                 570                 575

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23
<211> 3879
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 23
atcagacgcg cagaggaggc ggggccgcgg ctggtttcct gccgggggggc ggctctgggc 60

cgccgagtcc cctcctcccg cccctgagga ggaggagccg ccgccacccg ccgcgcccga 120

cacccgggag gccccgccag cccgcgggag aggcccagcg ggagtcgcgg aacagcaggc 180

ccgagcccac cgcgccgggc cccggacgcc gcgcggaaaa gatgaattta caaccaattt 240

tctggattgg actgatcagt tcagtttgct gtgtgtttgc tcaaacagat gaaaatagat 300

gtttaaaagc aaatgccaaa tcatgtggag aatgtataca agcagggcca aattgtgggt 360

ggtgcacaaa ttcaacattt ttacaggaag gaatgcctac ttctgcacga tgtgatgatt 420

tagaagcctt aaaaaagaag ggttgccctc cagatgacat agaaaatccc agaggctcca 480

aagatataaa gaaaaataaa aatgtaacca accgtagcaa aggaacagca gagaagctca 540

agccagagga tattactcag atccaaccac agcagttggt tttgcgatta agatcagggg 600

agccacagac atttacatta aaattcaaga gagctgaaga ctatcccatt gacctctact 660

accttatgga cctgtcttac tcaatgaaag acgatttgga gaatgtaaaa agtcttggaa 720

cagatctgat gaatgaaatg aggaggatta cttcggactt cagaattgga tttggctcat 780

ttgtggaaaa gactgtgatg ccttacatta gcacaacacc agctaagctc aggaaccctt 840

gcacaagtga acagaactgc accagcccat ttagctacaa aaatgtgctc agtcttacta 900

ataaaggaga agtatttaat gaacttgttg gaaaacagcg catatctgga aatttggatt 960

ctccagaagg tggtttcgat gccatcatgc aagttgcagt ttgtggatca ctgattggct 1020

ggaggaatgt tacacggctg ctggtgtttt ccacagatgc cgggtttcac tttgctggag 1080

atgggaaact tggtggcatt gttttaccaa atgatggaca atgtcacctg gaaaataata 1140

tgtacacaat gagccattat tatgattatc cttctattgc tcaccttgtc cagaaactga 1200

gtgaaaataa tattcagaca atttttgcag ttactgaaga atttcagcct gtttacaagg 1260

agctgaaaaa cttgatccct aagtcagcag taggaacatt atctgcaaat tctagcaatg 1320

taattcagtt gatcattgat gcatacaatt ccctttcctc agaagtcatt ttggaaaacg 1380

gcaaattgtc agaaggcgta acaataagtt acaaatctta ctgcaagaac ggggtgaatg 1440

gaacagggga aaatggaaga aaatgttcca atatttccat tggagatgag gttcaatttg 1500

aaattagcat aacttcaaat aagtgtccaa aaaaggattc tgacagcttt aaaattaggc 1560

ctctgggctt tacggaggaa gtagaggtta ttcttcagta catctgtgaa tgtgaatgcc 1620

aaagcgaagg catccctgaa agtcccaagt gtcatgaagg aaatgggaca tttgagtgtg 1680

gcgcgtgcag gtgcaatgaa gggcgtgttg gtagacattg tgaatgcagc acagatgaag 1740

ttaacagtga agacatggat gcttactgca ggaaagaaaa cagttcagaa atctgcagta 1800

acaatggaga gtgcgtctgc ggacagtgtg tttgtaggaa gagggataat acaaatgaaa 1860

tttattctgg caaattctgc gagtgtgata atttcaactg tgatagatcc aatggcttaa 1920

tttgtggagg aaatggtgtt tgcaagtgtc gtgtgtgtga gtgcaacccc aactacactg 1980

gcagtgcatg tgactgttct ttggatacta gtacttgtga agccagcaac ggacagatct 2040

gcaatggccg gggcatctgc gagtgtggtg tctgtaagtg tacagatccg aagtttcaag 2100

ggcaaacgtg tgagatgtgt cagacctgcc ttggtgtctg tgctgagcat aaagaatgtg 2160

ttcagtgcag agccttcaat aaaggagaaa agaaagacac atgcacacag gaatgttcct 2220

attttaacat taccaaggta gaaagtcggg acaaattacc ccagccggtc caacctgatc 2280

ctgtgtccca ttgtaaggag aaggatgttg acgactgttg gttctatttt acgtattcag 2340

tgaatgggaa caacgaggtc atggttcatg ttgtggagaa tccagagtgt cccactggtc 2400

cagacatcat tccaattgta gctggtgtgg ttgctggaat tgttcttatt ggccttgcat 2460

tactgctgat atggaagctt ttaatgataa ttcatgacag aagggagttt gctaaatttg 2520

aaaaggagaa aatgaatgcc aaatgggaca cgggtgaaaa tcctatttat aagagtgccg 2580

taacaactgt ggtcaatccg aagtatgagg gaaaatgagt actgcccgtg caaatcccac 2640

aacactgaat gcaaagtagc aatttccata gtcacagtta ggtagcttta gggcaatatt 2700

gccatggttt tactcatgtg caggttttga aaatgtacaa tatgtataat ttttaaaatg 2760

ttttattatt ttgaaaataa tgttgtaatt catgccaggg actgacaaaa gacttgagac 2820

aggatggtta ctcttgtcag ctaaggtcac attgtgcctt tttgaccttt tcttcctgga 2880

ctattgaaat caagcttatt ggattaagtg atatttctat agcgattgaa agggcaatag 2940

ttaaagtaat gagcatgatg agagtttctg ttaatcatgt attaaaactg atttttagct 3000

ttacaaatat gtcagtttgc agttatgcag aatccaaagt aaatgtcctg ctagctagtt 3060

aaggattgtt ttaaatctgt tattttgcta tttgcctgtt agacatgact gatgacatat 3120

ctgaaagaca agtatgttga gagttgctgg tgtaaaatac gtttgaaata gttgatctac 3180

aaaggccatg ggaaaaattc agagagttag gaaggaaaaa ccaatagctt taaaacctgt 3240

gtgccatttt aagagttact taatgtttgg taacttttat gccttcactt tacaaattca 3300

agccttagat aaaagaaccg agcaattttc tgctaaaaag tccttgattt agcactattt 3360

acatacaggc catactttac aaagtatttg ctgaatgggg acctttttgag ttgaatttat 3420

tttattattt ttattttgtt taatgtctgg tgctttctgt cacctcttct aatcttttaa 3480

tgtatttgtt tgcaattttg gggtaagact ttttttatga gtacttttttc tttgaagttt 3540

tagcggtcaa tttgccttttt taatgaacat gtgaagttat actgtggcta tgcaacagct 3600

ctcacctacg cgagtcttac tttgagttag tgccataaca gaccactgta tgtttacttc 3660

tcaccatttg agttgcccat cttgtttcac actagtcaca ttcttgtttt aagtgccttt 3720

agttttaaca gttcactttt tacagtgcta tttactgaag ttatttatta aatatgccta 3780

aaatacttaa atcggatgtc ttgactctga tgtattttat caggttgtgt gcatgaaatt 3840

tttatagatt aaagaagttg aggaaaagca aaaaaaaaa 3879

<210> 24
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador 5`-GeneRacer para amplificar dominios variables de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 24
cgactggagc acgaggacac tga 23

<210> 25
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> RACEMOG2a: cebador 3` internoa la región de bisagra murina para amplificar dominios variables de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 25
aggacagggc ttgattgtgg g 21

<210> 26
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CKFOR: cebador 3` interno a la región CK murina para amplificar dominios variables de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 26
ctcattcctg ttgaagctct tgac 24

<210> 27
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> alpha2mAB-VL FOR: cebador para amplificar la cadenma ligera de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 27
ctggtggcca ccgccaccgg cgtgcacagc aacattgtgc tgacccaatc tc 52

<210> 28
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> alpha2mAB-VL REV: cebador para amplificar la cadena ligera de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 28
accgtacgtt ttatttccag cttggtcccc 30

<210> 29
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> alpha2mAB mAB-VH FOR: cebador para amplificar la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 29
ctggtggcca ccgccaccgg cgtgcacagc caggtccaac tgcatcagcc tg 52

<210> 30
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> alpha2mAB mAB-VH REV: cebador para amplificar la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 30
tagggccctt ggtgctggct gaggagactg tgagagtgg 39

<210> 31
<211> 54

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Leader FOR1-54: cebador para introducir la secuencia líder en las cadenas variables de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 31
gctagcacca tgggctggtc ctgcatcatc ctgtttctgg tggccaccgc cacc 54

<210> 32
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Leader FOR1-23: cebador para introducir la secuencia líder en las cadenas variables del mAb anti-alfa2-integrina

<400> 32
caagctagca ccatgggctg gtcctg 26

<210> 33
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC1: Dominio variable de la cadena ligera de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes

<400> 33

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Gln Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 34
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC2: Dominio variable de la cadena ligera de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes

<400> 34

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Gln Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 35
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC3: Dominio variable de la cadena ligera de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes y estabilizantes

<400> 35

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 36
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC4: Dominio variable de la cadena ligera de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes y estabilizantes

<400> 36

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 37
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC5: Dominio variable de la cadena ligera de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones injertadas

<400> 37

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

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 38
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC1: Dominio variable de la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Val Ser
115

<210> 39
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC2: Dominio variable de la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Val Ser
        115

<210>  40
<211>  117
<212>  PRT
<213>  Secuencia artificial

<220>
<223>  HC3: Dominio variable de la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina con
       mutaciones humanizantes y estabilizantes

<400>  40

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Val Ser
115

<210> 41
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC4: Dominio variable de la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes y estabilizantes

<400> 41

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

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

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

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

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

Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Lys Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Leu Thr Val Val Ser
115

<210> 42
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC5: Dominio variable de la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes y estabilizantes

<400> 42

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Val Ser
        115
```

<210> 43
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencioa artificial

<220>
<223> HC6: Dominio variable de la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes y estabilizantes

<400> 43

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

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

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

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

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

Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Lys Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

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

Leu Thr Val Val Ser
        115
```

<210> 44
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC7: Dominio variable de la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones injertadas

<400> 44

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Lys Val Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 45
<211> 717
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 45
atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt 60

aacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 120

atatcctgca gagccagtga aagtgttgag agttatggca acagttttat ttactggtac 180

cagcagaaac caggacaggc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccaa cctagcatct 240

ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattgat 300

cctgtggagg ctgatgatgc tgcaacctat tactgtcagc aaaataatga ggatccgtac 360

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 420

atcttcccac catccagtga gcagttaaca tctggaggtg cctcagtcgt gtgcttcttg 480

aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaaga ttgatggcag tgaacgacaa 540

aatggcgtcc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc 600

agcaccctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660

actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgctag 717

<210> 46
<211> 1401
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 46
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ccacaggtgt ccactcccag 60

gtccaactgc atcagcctgg ggctgaactt gtgaagcctg gggctccagt gaagctgtcc 120

tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc tactggatga actgggtgaa gcagaggcct 180

ggacgaggcc tcgagtggat tggcaggatt gatccttccg atagtgaaac tcactacaat 240

caaaagttca aggacaaggc cacactgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatc 300

caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaaa ggtgggacgg 360

gggtactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcagc taaaacaaca 420

gccccatcgg tctatccact ggcccctgtg tgtggagata caactggctc ctcggtgact 480

ctaggatgcc tggtcaaggg ttatttccct gagccagtga ccttgacctg gaactctgga 540

tccctgtcca gtggtgtgca caccttccca gctgtcctgc agtctgacct ctacaccctc 600

agcagctcag tgactgtaac ctcgagcacc tggcccagcc agtccatcac ctgcaatgtg 660

gcccacccgg caagcagcac caaggtggac aagaaaattg agcccagagg gcccacaatc 720

aagccctgtc ctccatgcaa atgcccagca cctaacctct tgggtggacc atccgtcttc 780

atcttccctc caaagatcaa ggatgtactc atgatctccc tgagccccat agtcacatgt 840

gtggtggtgg atgtgagcga ggatgaccca gatgtccaga tcagctggtt tgtgaacaac 900

gtggaagtac acacagctca gacacaaacc catagagagg attacaacag tactctccgg 960

gtggtcagtg ccctccccat ccagcaccag gactggatga gtggcaagga gttcaaatgc 1020

aaggtcaaca acaaagacct cccagcgccc atcgagagaa ccatctcaaa acccaaaggg 1080

tcagtaagag ctccacaggt atatgtcttg cctccaccag aagaagagat gactaagaaa 1140

caggtcactc tgacctgcat ggtcacagac ttcatgcctg aagacattta cgtggagtgg 1200

accaacaacg ggaaaacaga gctaaactac aagaacactg aaccagtcct ggactctgat 1260

ggttcttact tcatgtacag caagctgaga gtggaaaaga agaactgggt ggaaagaaat 1320

agctactcct gttcagtggt ccacgagggt ctgcacaatc accacacgac taagagcttc 1380

tcccggactc ccgggaagtg a 1401

<210> 47
<211> 218
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 47

```
Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
            20                  25                  30

Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
    50                  55                  60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
                85                  90                  95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
        115                 120                 125

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
145                 150                 155                 160

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                165                 170                 175

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
            180                 185                 190

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
        195                 200                 205

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
    210                 215

<210>  48
<211>  447
<212>  PRT
<213>  Mus musculus

<400>  48

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu
        115                 120                 125

Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys
    130                 135                 140

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

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

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp
            180                 185                 190

Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
        195                 200                 205

Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys
    210                 215                 220

Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225                 230                 235                 240

Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser
                245                 250                 255

Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp
            260                 265                 270

Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln
        275                 280                 285
```

Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser
290 295 300

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro
340 345 350

Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met
355 360 365

Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn
370 375 380

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

Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn
405 410 415

Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu
420 425 430

His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 49
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IGLKV79_IGLKJ2

<400> 49

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

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Phe Leu
20 25 30

Gly Ile Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Asn Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 50
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IGHV11_IGHD33_IGHJ8

<400> 50

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 51
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Vk1LC

<400> 51

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

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

<220>
<223> dominio variable de la cadena ligera del mAb anti-integrina 2

<400> 53

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 54
<211> 445
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

```
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
                325                 330                 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            340                 345                 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
        355                 360                 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    370                 375                 380

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

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

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
            420                 425                 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
        435                 440                 445
```

99

Fig. 1A

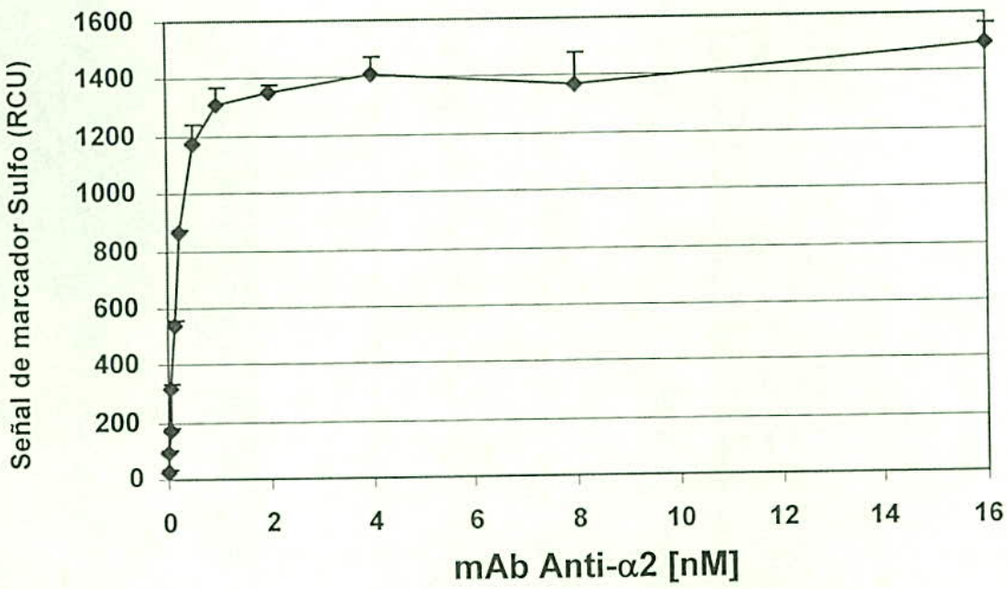
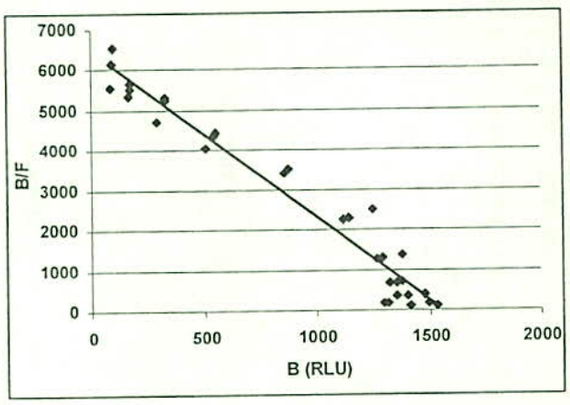


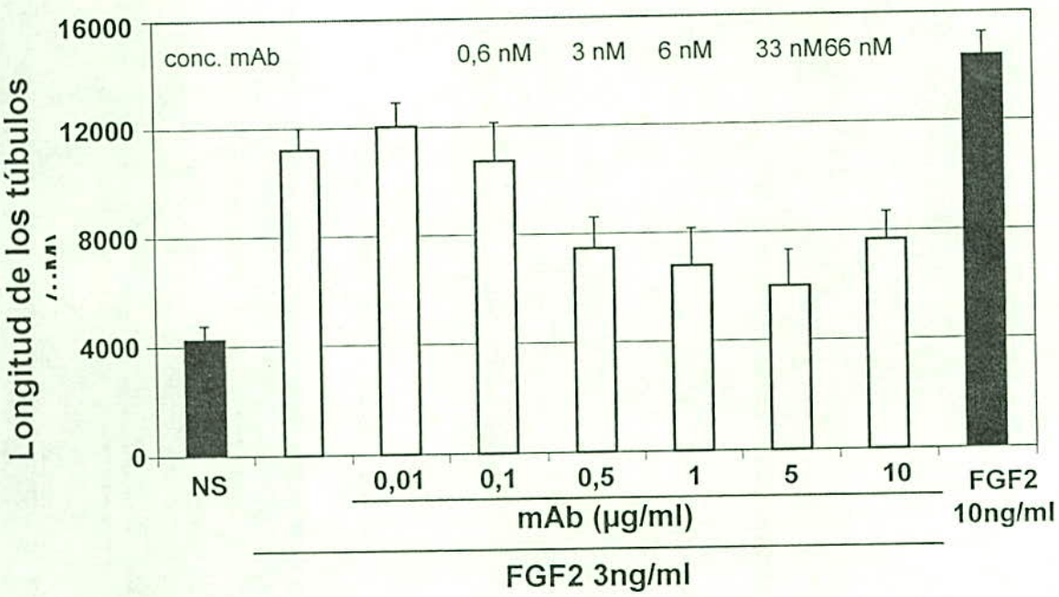
Fig. 1B



Parámetro+	Estimación	DT	CV (%)	CI 95 %
KD (nM)	0,2146	0,01291	6,0	[0,1899 ; 0,2425]

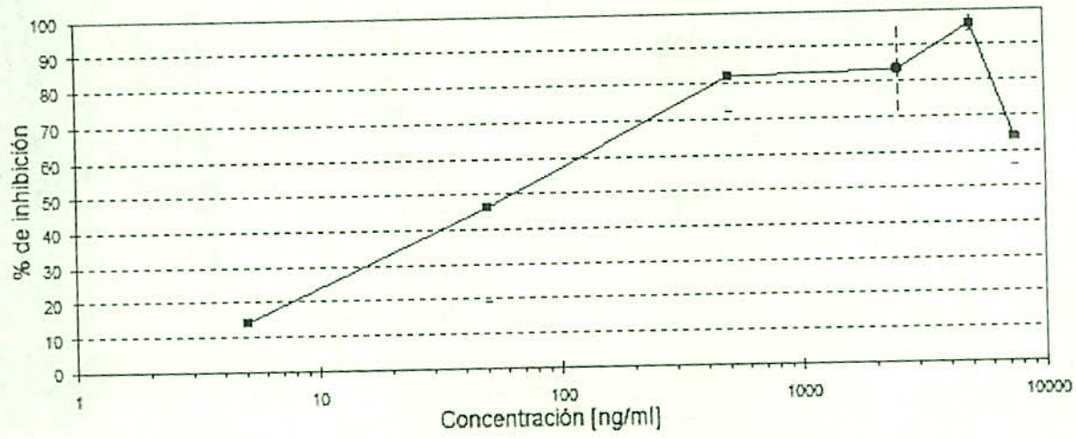
160

Fig. 2


16000
12000
8000
4000
0
Longitud de los túbulos
conc. mAb
0,6 nM
3 nM
6 nM
33 nM66 nM
NS
0,01
0,1
0,5
1
5
10
FGF2
10ng/ml
mAb (µg/ml)
FGF2 3ng/ml

101

Fig.3


% de inhibición
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
10
100
1000
10000
Concentración [ng/ml]

102

Fig.4

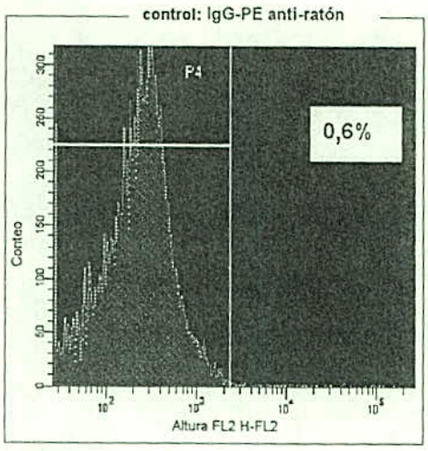


Figura 4A

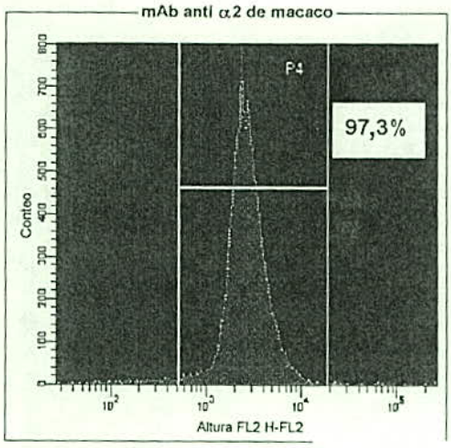


Figura 4B

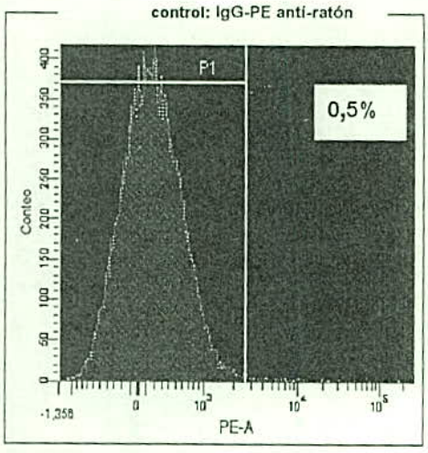


Figura 4C

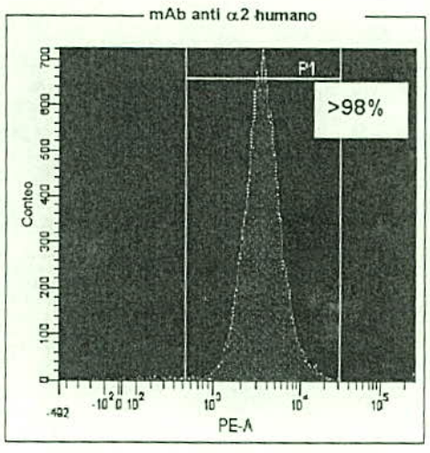


Figura 4D

Fig.5

Fig. 5a) Dominio variable de cadena ligera del mAb anti-integrina α2

NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QQKPGQAPKL LIYLASNLAS
GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K

(SEC ID N°: 1)

AACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATCCTGCAGAG
CCAGTGAAAGTGTTGAGAGTTATGGCAACAGTTTTATTTACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGGCACCCAA
ACTCCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGCATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTAGGACA
GACTTCACCCTCACCATTGATCCTGTGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAATAATGAGG
ATCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

(SEC ID N°: 12)

Fig. 5b) Dominio variable de cadena pesada del mAb anti-integrina α2-

QVQLHQPGAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR IDPSDSETHY
NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG RGYFDYWGQG TTLTVSS

(SEC ID N°: 2)

CAGGTCCAACTGCATCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGGCTCCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTT
CTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACGAGGCCTCGAGTGGATTGG
CAGGATTGATCCTTCCGATAGTGAAACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACACTGACTGTAGAC
AAATCCTCCAGCACAGCCTACATCCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAA
AGGTGGGACGGGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

(SEC ID N°: 13)

Fig.6

Fig. 6a: CDR del dominio variable de cadena pesada

HCDR1

GYTFTSYWMN

(SEC ID N°: 3)

HCDR2

RIDPSDSETHYNQKFK

(SEC ID N°: 4)

HCDR3

VGRGYFDY

(SEC ID N°: 5)

Figure 6b: CDR del dominio variable de cadena ligera

LCDR1:

RASESVESYGNSFIY

(SEC ID N°: 6)

LCDR2:

LASNLAS

(SEC ID N°: 7)

LCDR3:

QQNNEDPYT

(SEC ID N°: 8)

105

Fig.7

Fig. 7a: Cadena ligera quimérica (anti alfa 2VL-IGKC CL)

NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVESYGNSFIYWYQQKPGQAPKLLIYLASNLASGVPARF
SGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(Secuencia de aminoácidos: SEC ID Nº: 9)

AACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATCCTGCAGAG
CCAGTGAAAGTGTTGAGAGTTATGGCAACAGTTTTATTTACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGGCACCCAA
ACTCCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGCATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTAGGACA
GACTTCACCCTCACCATTGATCCTGTGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAATAATGAGG
ATCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTT
CCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGG
GAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGG
ACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGT
GTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC

(Secuencia codificante: SEC ID Nº: 14)

Fig.7b: mAb quimérico (anti α2 VH-IGHG4 CH1)

QVQLHQPGAELVKPGAPVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPGRGLEWIGRIDPSDSETHYNQKFKD
KATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCAKVGRGYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCS
RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTY
TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

(Secuencia de aminoácidos: SEC ID Nº: 10)

CAGGTCCAACTGCATCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGGCTCCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTT
CTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACGAGGCCTCGAGTGGATTGG
CAGGATTGATCCTTCCGATAGTGAAACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACACTGACTGTAGAC
AAATCCTCCAGCACAGCCTACATCCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAA
AGGTGGGACGGGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAGCACCAAGGG
CCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTG
AAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCC
CTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCAC
CAAGACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGTCCAAGTAC

107

Fig.8

Regiones constantes humanas para generación de construcciones de anticuerpo quimérico

Swiss-Prot: Q502W4

>gi|74740177|sp|Q502W4|Q502W4_HUMAN proteína IGKC

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT

LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(Secuencia de aminoácidos: SEC ID N°: 17)

Swiss-Prot: P01861.1 (S108P, L115E)

>gi|121047|sp|P01861.1|IGHG4_HUMAN RecName: Full=Región de Cadena C de Ig gamma-4

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS

SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV

SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA

KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV

DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(Secuencia de aminoácidos: SEC ID N°: 18)

Swiss-Prot: Q569F4

>gi|74735951|sp|Q569F4|Q569F4_HUMAN proteína IGHG1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS

SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV

VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI

SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(Secuencia de aminoácidos: SEC ID N°: 19)

Fig.9

Secuencias de integrina α2 yβ1 humana

Precursor de integrina α2 de acuerdo con el número de acceso: NP_002194.2:

```
   1 mgpertgaap lplllvlals qgilncclay nvglpeakif sgpsseqfgy avqqfinpkg
  61 nwllvgspws gfpenrmgdv ykcpvdlsta tceklnlqts tsipnvtemk tnmslglilt
 121 rnmgtggflt cgplwaqqcg nqyyttgvcs dispdfqlsa sfspatqpcp slidvvvvcd
 181 esnsiypwda vknflekfvq gldigptktq vgliqyannp rvvfnlntyk tkeemivats
 241 qtsqyggdlt ntfgaiqyar kyaysaasgg rrsatkvmvv vtdgeshdgs mlkavidqcn
 301 hdnilrfgia vlgylnrnal dtknlikeik aiasiptery ffnvsdeaal lekagtlgeq
 361 ifsiegtvqg gdnfqmemsq vgfsadyssq ndilmlgavg afgwsgtivq ktshghlifp
 421 kqafdqilqd rnhssylgys vaaistgest hfvagapran ytgqivlysv nengnitviq
 481 ahrgdqigsy fgsvlcsvdv dkdtitdvll vgapmymsdl kkeegrvylf tikegilgqh
 541 qflegpegie ntrfgsaiaa lsdinmdgfn dvivgsplen qnsgavyiyn ghqgtirtky
 601 sqkilgsdga frshlqyfgr sldgygdlng dsitdvsiga fgqvvqlwsq siadvaieas
 661 ftpekitlvn knaqiilklc fsakfrptkq nnqvaivyni tldadgfssr vtsrglfken
 721 nerclqknmv vnqaqscpeh iiyiqepsdv vnsldlrvdi slenpgtspa leaysetakv
 781 fsipfhkdcg edglcisdlv ldvrqipaaq eqpfivsnqn krltfsvtlk nkresayntg
 841 ivvdfsenlf fasfslpvdg tevtcqvaas qksvacdvgy palkreqqvt ftinfdfnlq
 901 nlqnqaslsf qalsesqeen kadnlvnlki pllydaeihl trstninfye issdgnvpsi
 961 vhsfedvgpk fifslkvttg svpvsmatvi ihipqytkek nplmyltgvq tdkagdiscn
1021 adinplkigq tsssvsfkse nfrhtkelnc rtascsnvtc wlkdvhmkge yfvnvttriw
1081 ngtfasstfq tvqltaaaei ntynpeiyvi edntvtiplm imkpdekaev ptgviigsii
1141 agillllalv ailwklgffk rkyekmtknp deidettels s
```

(SEC ID N°: 20)

Secuencia codificante de integrina α2 (hs) de acuerdo con el N° de acceso de NCBI: NM_002203.3:

```
   1 atggggccag aacggacagg ggccgcgccg ctgccgctgc tgctggtgtt agcgctcagt
  61 caaggcattt taaattgttg tttggcctac aatgttggtc tcccagaagc aaaaatattt
```

121 tccggtcctt caagtgaaca gtttggctat gcagtgcagc agtttataaa tccaaaaggc

181 aactggttac tggttggttc accctggagt ggctttcctg agaaccgaat gggagatgtg

241 tataaatgtc ctgttgacct atccactgcc acatgtgaaa aactaaattt gcaaacttca

301 acaagcattc caaatgttac tgagatgaaa accaacatga gcctcggctt gatcctcacc

361 aggaacatgg gaactggagg ttttctcaca tgtggtcctc tgtgggcaca gcaatgtggg

421 aatcagtatt acacaacggg tgtgtgttct gacatcagtc ctgattttca gctctcagcc

481 agcttctcac ctgcaactca gccctgccct tccctcatag atgttgtggt tgtgtgtgat

541 gaatcaaata gtatttatcc ttgggatgca gtaaagaatt ttttggaaaa atttgtacaa

601 ggcctggata taggccccac aaagacacag gtggggttaa ttcagtatgc caataatcca

661 agagttgtgt ttaacttgaa cacatataaa accaaagaag aaatgattgt agcaacatcc

721 cagacatccc aatatggtgg ggacctcaca aacacattcg gagcaattca atatgcaaga

781 aaatatgctt attcagcagc ttctggtggg cgacgaagtg ctacgaaagt aatggtagtt

841 gtaactgacg gtgaatcaca tgatggttca atgttgaaag ctgtgattga tcaatgcaac

901 catgacaata tactgaggtt tggcatagca gttcttgggt acttaaacag aaacgccctt

961 gatactaaaa atttaataaa agaaataaaa gcaatcgcta gtattccaac agaaagatac

1021 tttttcaatg tgtctgatga agcagctcta ctagaaaagg ctgggacatt aggagaacaa

1081 attttcagca ttgaaggtac tgttcaagga ggagacaact ttcagatgga aatgtcacaa

1141 gtgggattca gtgcagatta ctcttctcaa aatgatattc tgatgctggg tgcagtggga

1201 gcttttggct ggagtgggac cattgtccag aagacatctc atggccattt gatctttcct

1261 aaacaagcct ttgaccaaat tctgcaggac agaaatcaca gttcatattt aggttactct

1321 gtggctgcaa tttctactgg agaaagcact cactttgttg ctggtgctcc tcgggcaaat

1381 tataccggcc agatagtgct atatagtgtg aatgagaatg gcaatatcac ggttattcag

1441 gctcaccgag gtgaccagat tggctcctat tttggtagtg tgctgtgttc agttgatgtg

1501 gataaagaca ccattacaga cgtgctcttg gtaggtgcac caatgtacat gagtgaccta

1561 aagaaagagg aaggaagagt ctacctgttt actatcaaag agggcatttt gggtcagcac

1621 caatttcttg aaggccccga gggcattgaa aacactcgat ttggttcagc aattgcagct

1681 ctttcagaca tcaacatgga tggctttaat gatgtgattg ttggttcacc actagaaaat

1741 cagaattctg gagctgtata catttacaat ggtcatcagg gcactatccg cacaaagtat

1801 tcccagaaaa tcttgggatc cgatggagcc tttaggagcc atctccagta ctttgggagg

1861 tccttggatg gctatggaga tttaaatggg gattccatca ccgatgtgtc tattggtgcc

1921 tttggacaag tggttcaact ctggtcacaa agtattgctg atgtagctat agaagcttca

1981 ttcacaccag aaaaaatcac tttggtcaac aagaatgctc agataattct caaactctgc

2041 ttcagtgcaa agttcagacc tactaagcaa aacaatcaag tggccattgt atataacatc

2101 acacttgatg cagatggatt ttcatccaga gtaacctcca gggggttatt taaagaaaac

2161 aatgaaaggt gcctgcagaa gaatatggta gtaaatcaag cacagagttg ccccgagcac

2221 atcatttata tacaggagcc ctctgatgtt gtcaactctt tggatttgcg tgtggacatc

2281 agtctggaaa accctggcac tagccctgcc cttgaagcct attctgagac tgccaaggtc

2341 ttcagtattc ctttccacaa agactgtggt gaggacggac tttgcatttc tgatctagtc

2401 ctagatgtcc gacaaatacc agctgctcaa gaacaaccct ttattgtcag caaccaaaac

2461 aaaaggttaa cattttcagt aacgctgaaa aataaaaggg aaagtgcata caacactgga

2521 attgttgttg atttttcaga aaacttgttt tttgcatcat tctccctgcc ggttgatggg

2581 acagaagtaa catgccaggt ggctgcatct cagaagtctg ttgcctgcga tgtaggctac

2641 cctgctttaa agagagaaca acaggtgact tttactatta actttgactt caatcttcaa

2701 aaccttcaga atcaggcgtc tctcagtttc caagccttaa gtgaaagcca agaagaaaac

2761 aaggctgata atttggtcaa cctcaaaatt cctctcctgt atgatgctga aattcactta

2821 acaagatcta ccaacataaa tttttatgaa atctcttcgg atgggaatgt tccttcaatc

2881 gtgcacagtt ttgaagatgt tggtccaaaa ttcatcttct ccctgaaggt aacaacagga

2941 agtgttccag taagcatggc aactgtaatc atccacatcc ctcagtatac caaagaaaag

3001 aacccactga tgtacctaac tggggtgcaa acagacaagg ctggtgacat cagttgtaat

3061 gcagatatca atccactgaa aataggacaa acatcttctt ctgtatcttt caaaagtgaa

3121 aatttcaggc acaccaaaga attgaactgc agaactgctt cctgtagtaa tgttacctgc

3181 tggttgaaag acgttcacat gaaaggagaa tactttgtta atgtgactac cagaatttgg

3241 aacgggactt tcgcatcatc aacgttccag acagtacagc taacggcagc tgcagaaatc

3301 aacacctata accctgagat atatgtgatt gaagataaca ctgttacgat tcccctgatg

3361 ataatgaaac ctgatgagaa agccgaagta ccaacaggag ttataatagg aagtataatt

3421 gctggaatcc ttttgctgtt agctctggtt gcaattttat ggaagctcgg cttcttcaaa

3481 agaaaatatg aaaagatgac caaaaatcca gatgagattg atgagaccac agagctcagt

3541 agctga

(SEC ID N°: 21)

Precursor de isoforma 1A de integrina β1 (hs) de acuerdo con el N° de acceso de NCBI NP_002202.2:

1 mnlqpifwig lissvccvfa qtdenrclka nakscgeciq agpncgwctn stflqegmpt

61 sarcddleal kkkgcppddi enprgskdik knknvtnrsk gtaeklkped itqiqpqqlv

```
121 lrlrsgepqt ftlkfkraed ypidlyylmd lsysmkddle nvkslgtdlm nemrritsdf
181 rigfgsfvek tvmpyisttp aklrnpctse qnctspfsyk nvlsltnkge vfnelvgkqr
241 isgnldspeg gfdaimqvav cgsligwrnv trllvfstda gfhfagdgkl ggivlpndgq
301 chlennmytm shyydypsia hlvqklsenn iqtifavtee fqpvykelkn lipksavgtl
361 sanssnviql iidaynslss evilengkls egvtisyksy ckngvngtge ngrkcsnisi
421 gdevqfeisi tsnkcpkkds dsfkirplgf teevevilqy icececqseg ipespkcheg
481 ngtfecgacr cnegrvgrhc ecstdevnse dmdaycrken sseicsnnge cvcgqcvcrk
541 rdntneiysg kfcecdnfnc drsnglicgg ngvckcrvce cnpnytgsac dcsldtstce
601 asngqicngr gicecgvckc tdpkfqgqtc emcqtclgvc aehkecvqcr afnkgekkdt
661 ctqecsyfni tkvesrdklp qpvqpdpvsh ckekdvddcw fyftysvngn nevmvhvven
721 pecptgpdii pivagvvagi vliglallli wkllmiihdr refakfekek mnakwdtgen
781 piyksavttv vnpkyegk
```

(SEC ID N°: 22)

Isoforma 1A de secuencia codificante de integrina β1 (hs) de acuerdo con el N° de acceso de NCBI NM_002211.3:

```
  1 atcagacgcg cagaggaggc ggggccgcgg ctggtttcct gccggggggc ggctctgggc
 61 cgccgagtcc cctcctcccg cccctgagga ggaggagccg ccgccacccg ccgcgcccga
121 cacccgggag gccccgccag cccgcgggag aggcccagcg ggagtcgcgg aacagcaggc
181 ccgagcccac cgcgccgggc cccggacgcc gcgcggaaaa gatgaattta caaccaattt
241 tctggattgg actgatcagt tcagtttgct gtgtgtttgc tcaaacagat gaaaatagat
301 gtttaaaagc aaatgccaaa tcatgtggag aatgtataca agcagggcca aattgtgggt
361 ggtgcacaaa ttcaacattt ttacaggaag gaatgcctac ttctgcacga tgtgatgatt
421 tagaagcctt aaaaaagaag ggttgccctc cagatgacat agaaaatccc agaggctcca
481 aagatataaa gaaaaataaa aatgtaacca accgtagcaa aggaacagca gagaagctca
541 agccagagga tattactcag atccaaccac agcagttggt tttgcgatta agatcagggg
601 agccacagac atttacatta aaattcaaga gagctgaaga ctatcccatt gacctctact
661 accttatgga cctgtcttac tcaatgaaag acgatttgga gaatgtaaaa agtcttggaa
721 cagatctgat gaatgaaatg aggaggatta cttcggactt cagaattgga tttggctcat
781 ttgtggaaaa gactgtgatg ccttacatta gcacaacacc agctaagctc aggaaccctt
841 gcacaagtga acagaactgc accagcccat ttagctacaa aaatgtgctc agtcttacta
```

112

901 ataaaggaga agtatttaat gaacttgttg gaaaacagcg catatctgga aatttggatt

961 ctccagaagg tggtttcgat gccatcatgc aagttgcagt ttgtggatca ctgattggct

1021 ggaggaatgt tacacggctg ctggtgtttt ccacagatgc cgggtttcac tttgctggag

1081 atgggaaact tggtggcatt gttttaccaa atgatggaca atgtcacctg gaaaataata

1141 tgtacacaat gagccattat tatgattatc cttctattgc tcaccttgtc cagaaactga

1201 gtgaaaataa tattcagaca atttttgcag ttactgaaga atttcagcct gtttacaagg

1261 agctgaaaaa cttgatccct aagtcagcag taggaacatt atctgcaaat tctagcaatg

1321 taattcagtt gatcattgat gcatacaatt ccctttcctc agaagtcatt ttggaaaacg

1381 gcaaattgtc agaaggcgta acaataagtt acaaatctta ctgcaagaac ggggtgaatg

1441 gaacagggga aaatggaaga aaatgttcca atatttccat tggagatgag gttcaatttg

1501 aaattagcat aacttcaaat aagtgtccaa aaaaggattc tgacagcttt aaaattaggc

1561 ctctgggctt tacggaggaa gtagaggtta ttcttcagta catctgtgaa tgtgaatgcc

1621 aaagcgaagg catccctgaa agtcccaagt gtcatgaagg aaatgggaca tttgagtgtg

1681 gcgcgtgcag gtgcaatgaa gggcgtgttg gtagacattg tgaatgcagc acagatgaag

1741 ttaacagtga agacatggat gcttactgca ggaaagaaaa cagttcagaa atctgcagta

1801 acaatggaga gtgcgtctgc ggacagtgtg tttgtaggaa gagggataat acaaatgaaa

1861 tttattctgg caaattctgc gagtgtgata atttcaactg tgatagatcc aatggcttaa

1921 tttgtggagg aaatggtgtt tgcaagtgtc gtgtgtgtga gtgcaacccc aactacactg

1981 gcagtgcatg tgactgttct ttggatacta gtacttgtga agccagcaac ggacagatct

2041 gcaatggccg gggcatctgc gagtgtggtg tctgtaagtg tacagatccg aagtttcaag

2101 ggcaaacgtg tgagatgtgt cagacctgcc ttggtgtctg tgctgagcat aaagaatgtg

2161 ttcagtgcag agccttcaat aaaggagaaa agaaagacac atgcacacag gaatgttcct

2221 attttaacat taccaaggta gaaagtcggg acaaattacc ccagccggtc caacctgatc

2281 ctgtgtccca ttgtaaggag aaggatgttg acgactgttg gttctatttt acgtattcag

2341 tgaatgggaa caacgaggtc atggttcatg ttgtggagaa tccagagtgt cccactggtc

2401 cagacatcat tccaattgta gctggtgtgg ttgctggaat tgttcttatt ggccttgcat

2461 tactgctgat atggaagctt ttaatgataa ttcatgacag aagggagttt gctaaatttg

2521 aaaaggagaa aatgaatgcc aaatgggaca cgggtgaaaa tcctatttat aagagtgccg

2581 taacaactgt ggtcaatccg aagtatgagg gaaaatgagt actgcccgtg caaatcccac

2641 aacactgaat gcaaagtagc aatttccata gtcacagtta ggtagcttta gggcaatatt

2701 gccatggttt tactcatgtg caggttttga aaatgtacaa tatgtataat ttttaaaatg

2761 ttttattatt ttgaaaataa tgttgtaatt catgccaggg actgacaaaa gacttgagac

2821 aggatggtta ctcttgtcag ctaaggtcac attgtgcctt tttgaccttt tcttcctgga

2881 ctattgaaat caagcttatt ggattaagtg atatttctat agcgattgaa agggcaatag

2941 ttaaagtaat gagcatgatg agagtttctg ttaatcatgt attaaaactg atttttagct

3001 ttacaaatat gtcagtttgc agttatgcag aatccaaagt aaatgtcctg ctagctagtt

3061 aaggattgtt ttaaatctgt tattttgcta tttgcctgtt agacatgact gatgacatat

3121 ctgaaagaca agtatgttga gagttgctgg tgtaaaatac gtttgaaata gttgatctac

3181 aaaggccatg ggaaaaattc agagagttag gaaggaaaaa ccaatagctt taaaacctgt

3241 gtgccatttt aagagttact taatgtttgg taacttttat gccttcactt tacaaattca

3301 agccttagat aaaagaaccg agcaattttc tgctaaaaag tccttgattt agcactattt

3361 acatacaggc catactttac aaagtatttg ctgaatgggg acctttttgag ttgaatttat

3421 tttattattt ttattttgtt taatgtctgg tgctttctgt cacctcttct aatcttttaa

3481 tgtatttgtt tgcaattttg gggtaagact ttttttatga gtacttttttc tttgaagttt

3541 tagcggtcaa tttgcctttt taatgaacat gtgaagttat actgtggcta tgcaacagct

3601 ctcacctacg cgagtcttac tttgagttag tgccataaca gaccactgta tgtttacttc

3661 tcaccatttg agttgcccat cttgtttcac actagtcaca ttcttgtttt aagtgccttt

3721 agttttaaca gttcactttt tacagtgcta tttactgaag ttatttatta aatatgccta

3781 aaatacttaa atcggatgtc ttgactctga tgtattttat caggttgtgt gcatgaaatt

3841 tttatagatt aaagaagttg aggaaaagca aaaaaaaaa

(SEC ID N°: 23)

Fig.10

Fig. 10a: ADNc que codifica LC de mAB anti-integrina α2

atggagacagacacactcctgctatgggtgctgctgctctgggttccaggttccacaggtaacattgtgctga
cccaatctccagcttctttggctgtgtctctagggcagagggccaccatatcctgcagagccagtgaaagtgt
tgagagttatggcaacagttttatttactggtaccagcagaaaccaggacaggcacccaaactcctcatctat
cttgcatccaacctagcatctggggtccctgccaggttcagtggcagtgggtctaggacagacttcaccctca
ccattgatcctgtggaggctgatgatgctgcaacctattactgtcagcaaaataatgaggatccgtacacgtt
cggaggggggaccaagctggaaataaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagt
gagcagttaacatctggaggtgcctcagtcgtgtgcttcttgaacaacttctaccccaaagacatcaatgtca
agtggaagattgatggcagtgaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaaagacag
cacctacagcatgagcagcaccctcacgttgaccaaggacgagtatgaacgacataacagctatacctgtgag
gccactcacaagacatcaacttcacccattgtcaagagcttcaacaggaatgagtgctag

(SEC ID Nº: 45)

Fig. 10b: ADNc que codifica HC de mAB anti-integrina α2

atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagccacaggtgtccactcccaggtccaactgcatc
agcctggggctgaacttgtgaagcctggggctccagtgaagctgtcctgcaaggcttctggctacaccttcac
cagctactggatgaactgggtgaagcagaggcctggacgaggcctcgagtggattggcaggattgatccttcc
gatagtgaaactcactacaatcaaaagttcaaggacaaggccacactgactgtagacaaatcctccagcacag
cctacatccaactcagcagcctgacatctgaggactctgcggtctattactgtgcaaaggtgggacgggggta
ctttgactactggggccaaggcaccactctcacagtctcctcagctaaaacaacagccccatcggtctatcca
ctggcccctgtgtgtggagatacaactggctcctcggtgactctaggatgcctggtcaagggttatttccctg
agccagtgaccttgacctggaactctggatccctgtccagtggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagtc
tgacctctacaccctcagcagctcagtgactgtaacctcgagcacctggcccagccagtccatcacctgcaat
gtggcccacccggcaagcagcaccaaggtggacaagaaaattgagcccagagggcccacaatcaagccctgtc
ctccatgcaaatgcccagcacctaacctcttgggtggaccatccgtcttcatcttccctccaaagatcaagga
tgtactcatgatctccctgagccccatagtcacatgtgtggtggtggatgtgagcgaggatgacccagatgtc
cagatcagctggtttgtgaacaacgtggaagtacacacagctcagacacaaacccatagagaggattacaaca
gtactctccgggtggtcagtgccctccccatccagcaccaggactggatgagtggcaaggagttcaaatgcaa
ggtcaacaacaaagacctcccagcgcccatcgagagaaccatctcaaaacccaaagggtcagtaagagctcca
caggtatatgtcttgcctccaccagaagaagagatgactaagaaacaggtcactctgacctgcatggtcacag
acttcatgcctgaagacatttacgtggagtggaccaacaacgggaaaacagagctaaactacaagaacactga
accagtcctggactctgatggttcttacttcatgtacagcaagctgagagtggaaaagaagaactgggtggaa
agaaatagctactcctgttcagtggtccacgagggtctgcacaatcaccacacgactaagagcttctcccgga
ctcccgggaagtga

(SEC ID Nº: 46)

Fig. 10c: Secuencia de aminoácidos of LC secretada de mAB anti-integrina α2

nivltqspaslavslgqratiscrasesvesygnsfiywyqqkpgqapkllliylasnlasgvparfsgsgsrt
dftltidpveaddaatyycqqnnedpytfgggtkleikradaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfypk
dinvkwkidgserqngvlnswtdqdskdstysmsstltltkdeyerhnsytceathktstspivksfnrnec

(SEC ID Nº: 47)

115

Fig. 10d: Secuencia de aminoácidos de HC secretada de mAB anti-integrina α2

qvqlhqpgaelvkpgapvklsckasgytftsywmnwvkqrpgrglewigridpsdsethynqkfkdkatltvd
kssstayiqlssltsedsavyycakvgrgyfdywgqgttltvssakttapsvyplapvcgdttgssvtlgclv
kgyfpepvtltwnsgslssgvhtfpavlqsdlytlsssvtvtsstwpsqsitcnvahpasstkvdkkieprgp
tikpcppckcpapnllggpsvfifppkikdvlmislspivtcvvvdvseddpdvqiswfvnnvevhtaqtqth
redynstlrvvsalpiqhqdwmsgkefkckvnnkdlpapiertiskpkgsvrapqvyvlpppeeemtkkqvtl
tcmvtdfmpediyvewtnngktelnykntepvldsdgsyfmysklrvekknwvernsyscsvvheglhnhhtt
ksfsrtpgk

(SEC ID Nº: 48)

Fig. 10e: Secuencia de aminoácidos de anticuerpo comparador

Secuencia de aminoácidos de LC del comparador

DFVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCSAQSSVNYIHWYQQKPDQAPKKLIYDTSKLASGVPSR
FSGSGSGTDYTFTISSLEAEDAATYYCQQWTTNPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEC ID Nº: 53)

Secuencia de aminoácidos de HC del comparador

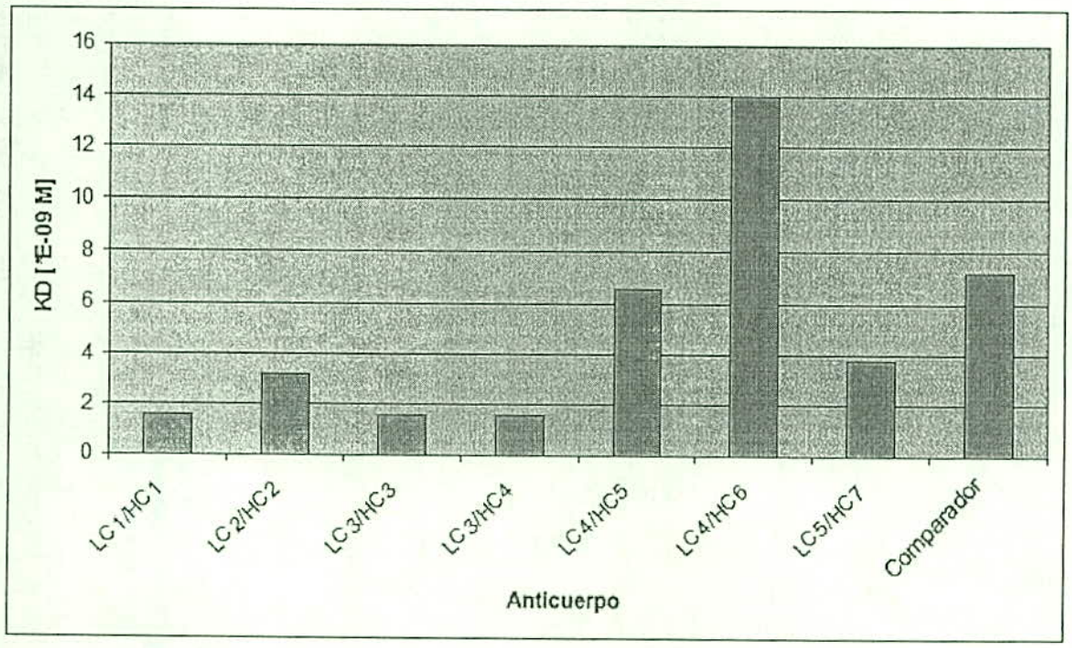
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGIHWIRQPPGKGLEWLGVIWARGFTN
YNSALMSRLTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARANDGVYYAMDYWGQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE
FEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

(SEC ID Nº: 54)

116

Fig.11

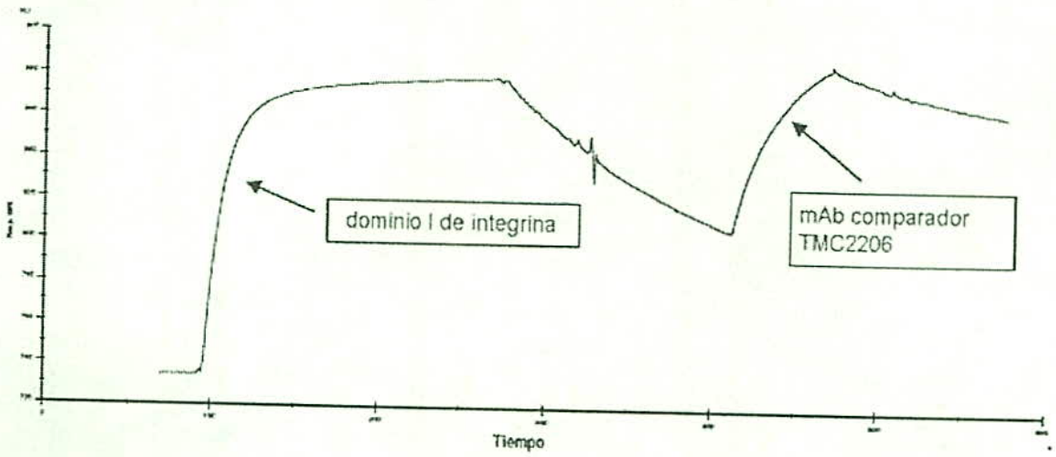
Fig. 11: Constantes de disociación en equilibrio K_D para las variantes humanizadas y el comparador según se determina por Biacore



117

Fig.12

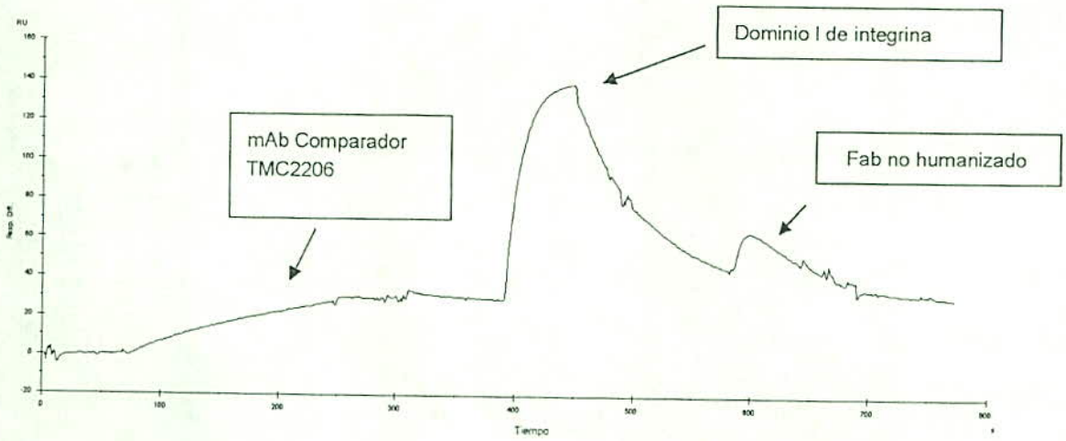
Fig. 12: Unión de mAb comparador TMC2206 con dominio I de integrina α_2 preunido por Fab no humanizado medida usando Biacore



118

Fig.13

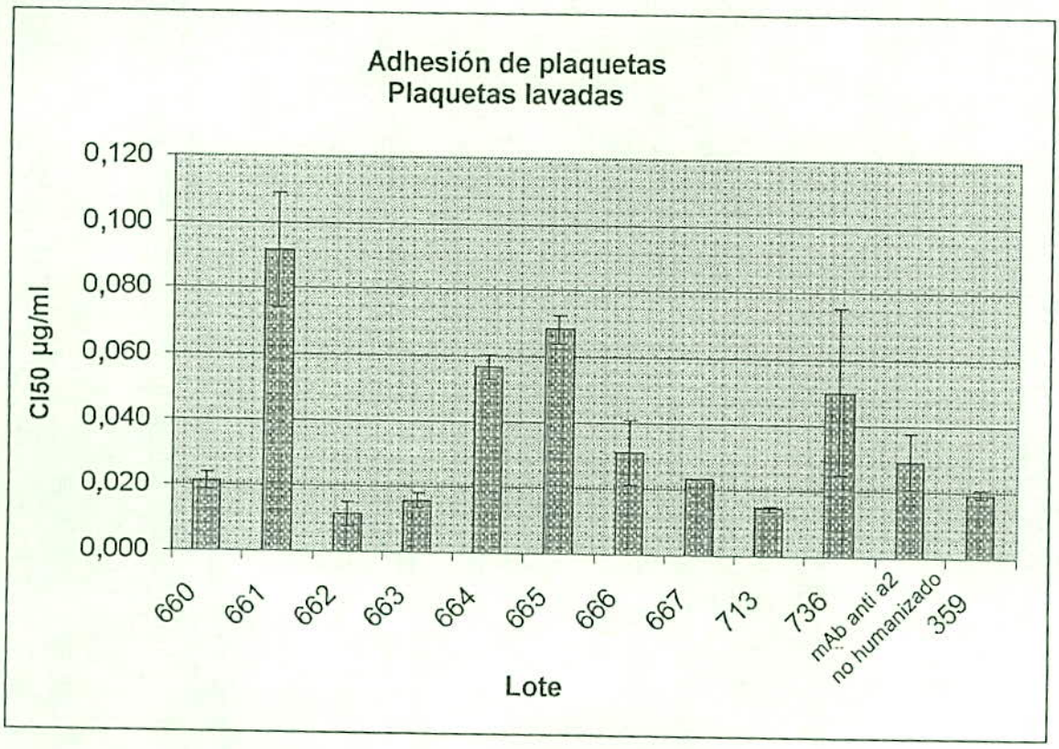
Fig. 13: Unión de Fab no humanizado con dominio I de integrina α_2 preunido por mAb comparador TMC2206



119

Fig.14

Figura 14: Inhibición de adhesión de plaquetas a colágeno en condiciones estáticas usando plaquetas lavadas



PATENT COOPERATION TREATY PCT/EP2011/064926

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

SCHNEIDER, Rudolf
c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
65926 Frankfurt am Main
ALLEMAGNE

Date of mailing *(day/month/year)*
26 April 2012 (26.04.2012)

Applicant's or agent's file reference
DE2010/156

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/EP2011/064926

International filing date *(day/month/year)*
30 August 2011 (30.08.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
SANOFI
Sanofi-Aventis
174 avenue de France
F-75013 Paris
France

State of Nationality: FR
State of Residence: FR
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
SANOFI
54, rue de la Boétie
F-75008 Paris
France

State of Nationality: FR
State of Residence: FR
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☒ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Blanc Veronique
e-mail pt05.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 05

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION _____ PCT X MODELO DE UTILIDAD _____ DISEÑO INDUSTRIAL _____

(21) No. de solicitud (22) Fecha de solicitud
(51) Clasificación internacional A61K 39/395, A61P 17/06, A61P 29/00, A61P 3/10, A61P 35/00, A61P 37/06, A61P 9/10, C07K 16/28, G01N 33/68

(71) Solicitante (s) SANOFI

(72) Inventor (es) CORVEY, Carsten; BLUM, Horst; CAMERON, Béatrice; DABDOUBI, Tarik; DECARY, Stephanie; BAURIN, Nicolas; PAPIN, David; LANGE, Christian

(74) Apoderado DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
		10305929.1		2010-08-31		EP

(85) Fecha inicio fase nacional:
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 30/08/2011
No. de solicitud: PCT/EP2011/064926

(87) Publicación internacional
Fecha: 08/03/2012
Nº publicación: WO/2012/028622 A2

(54) Título: PÉPTIDO O COMPLEJO PEPTÍDICO QUE SE UNE A INTEGRINA α2 Y MÉTODOS Y USOS QUE IMPLICAN A LOS MISMOS

123
122

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN

___ Patente de Invención ___ Patente modelo de utilidad _X_ PCT

(21) No. De solicitud	(51) int. Cl: A61K 39/395, A61P 17/06, A61P 29/00, A61P 3/10, A61P 35/00, A61P 37/06, A61P 9/10, C07K 16/28, G01N 33/68
(22) Fecha de solicitud	(71) Solicitante (s) **SANOFI**
(30) Prioridad (31) No. Prioridad **10305929.1** (32) Fecha **31/08/2010** (33) País **EP**	(72) Interventor (es) **CORVEY, Carsten** **BLUM, Horst** **CAMERON, Béatrice** **DABDOUBI, Tarik** **DECARY, Stephanie** **BAURIN, Nicolas** **PAPIN, David** **LANGE, Christian**
	(74) Apoderado (s) **DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**
(54) Título **PÉPTIDO O COMPLEJO PEPTÍDICO QUE SE UNE A INTEGRINA α2 Y MÉTODOS Y USOS QUE IMPLICAN A LOS MISMOS**	
Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT	
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud **30/08/2011** No. de solicitud **PCT/EP2011/064926**	(87) Publicación internacional Fecha **08/03/2012** No. Publicación **WO/2012/028622 A2**

Resumen reivindicación (es):

1. Péptido o complejo peptídico, preferentemente anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho péptido o complejo peptídico, anticuerpo o fragmento se unen específicamente al dominio I de la integrina α2 humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento un dominio de región variable de la cadena pesada (VH) y un dominio de región variable de la cadena ligera (VL), en el que dicho anticuerpo o fragmento presenta reactividad cruzada con integrina α2 no humana de primate pero no presenta reactividad cruzada con integrina α2 que no sea de primate.

2. Péptido o complejo peptídico, preferentemente anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho péptido o complejo peptídico, anticuerpo o fragmento se unen específicamente al dominio I de la integrina α2 humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento un dominio de región variable de la cadena pesada (VH) y un dominio de región variable de la cadena ligera (VL), en el que dicho anticuerpo o fragmento compite con un anticuerpo de referencia por la unión al epítopo del anticuerpo de referencia, comprendiendo dicho anticuerpo de referencia una cadena ligera codificada por el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de adhesión DSM 23944 y una cadena pesada codificada por (i) el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de adhesión DSM 23946 o bien (ii) el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de adhesión DSM 23945.

3. Péptido o complejo peptídico, preferentemente anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende uno o más de los siguientes componentes a) a f):

a) LCDR1, en el que LDR1 es RASESVESYGNSFIY (SEC ID Nº 6) o una variante funcionalmente activa de la misma,
b) LCDR2, en el que LDR2 es LASNLAS (SEC ID Nº 7) o una variante funcionalmente activa de la misma,
c) LCDR3, en el que LDR3 es QQNNEDPYT (SEC ID Nº 8) o una variante funcional activa de la misma,
d) HCDR1, en el que HDR1 es (GYTFTSYWMN, SEC ID Nº 3) o una variante funcionalmente activa de la misma,
e) HCDR2, en el que HDR2 es RIDPSDSETHYNQKFK (SEC ID Nº 4) o una variante funcionalmente activa de la misma, y
f) HCDR3, en el que HDR3 es VGRGYFDY (SEC ID Nº 5) o una variante funcional activa de la misma,

y en el que el uno o más de los componentes a) a f) se disponen para permitir la unión del péptido o complejo peptídico a la integrina α2...

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:

Fecha: ____/____/____/ (AAAA MM DD)

Recorrido:

Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador:

Planilla:

ID	*No. Radicación*	*Consecutivo*	*Item*
1	1		
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11	13-46963		
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	*Unidad de Conservación*
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	*Soporte Documental*
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:

FOLIO 121

ANEXO CD

ANDRESCH

Fig. 1A

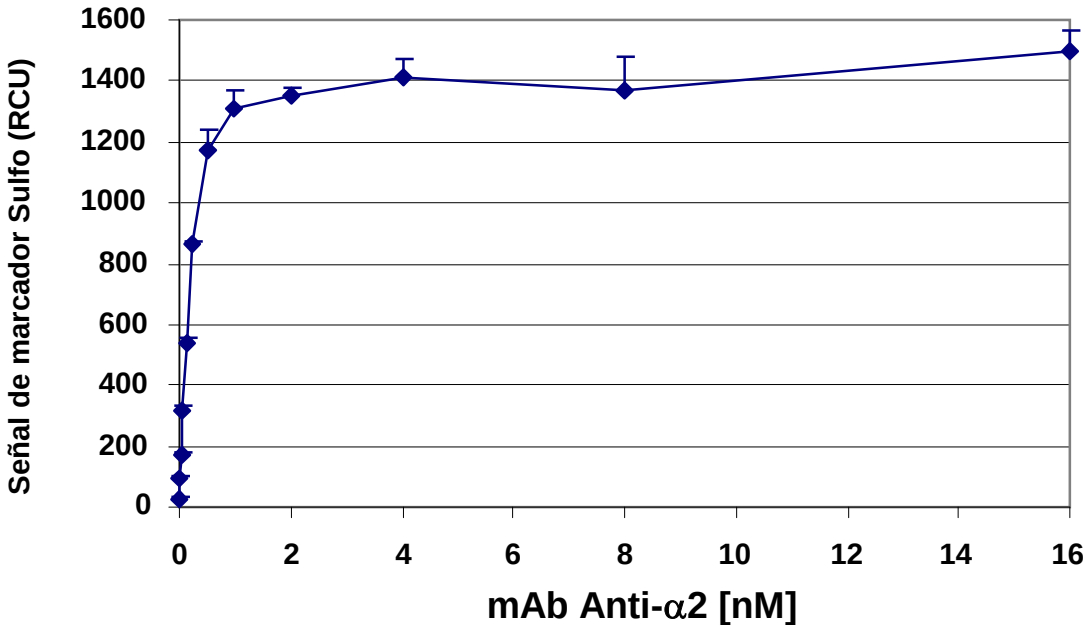
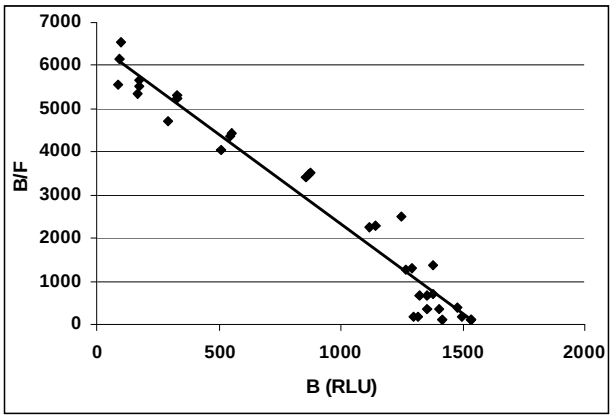


Fig. 1B



Parámetro+	Estimación	DT	CV (%)	CI 95 %
KD (nM)	0,2146	0,01291	6,0	[0,1899 ; 0,2425]

Fig. 2

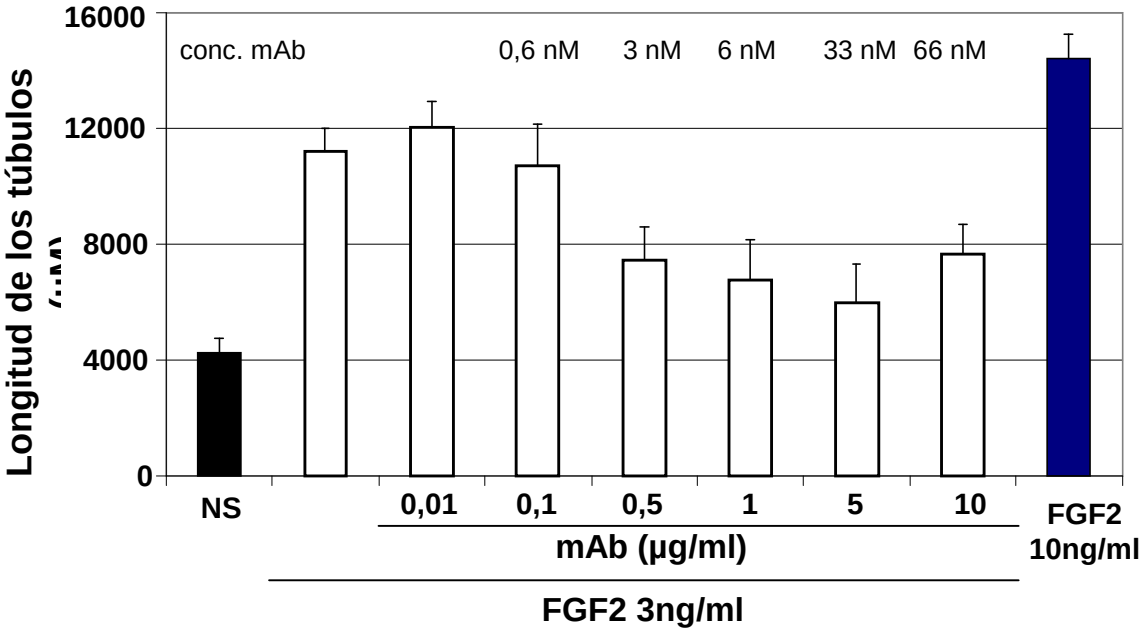

16000
12000
8000
4000
0
Longitud de los túbulos
conc. mAb
0,6 nM
3 nM
6 nM
33 nM
66 nM
NS
0,01
0,1
0,5
1
5
10
FGF2
10ng/ml
mAb (µg/ml)
FGF2 3ng/ml

Fig.3

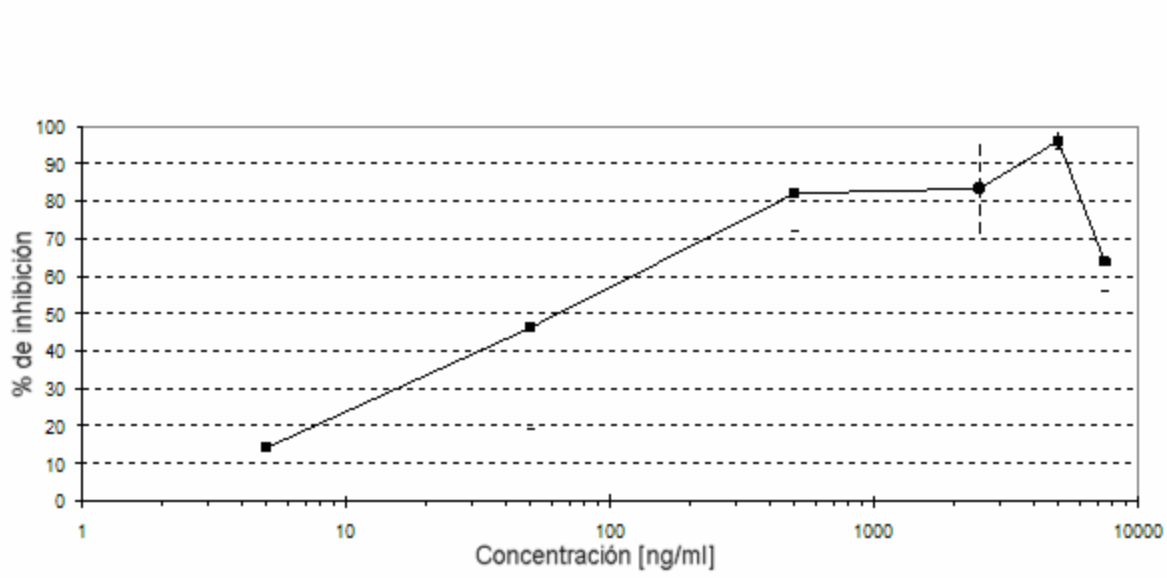

% de inhibición
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
10
100
1000
10000
Concentración [ng/ml]

Fig.4

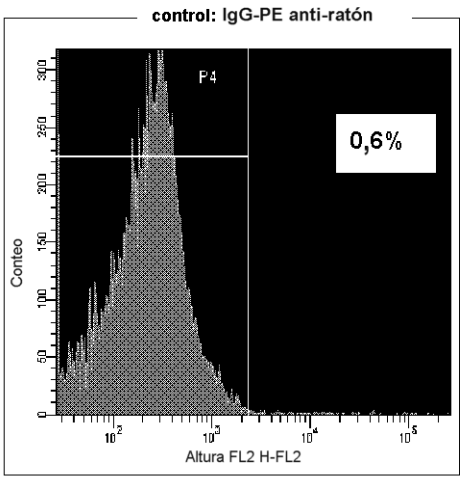


Figura 4A

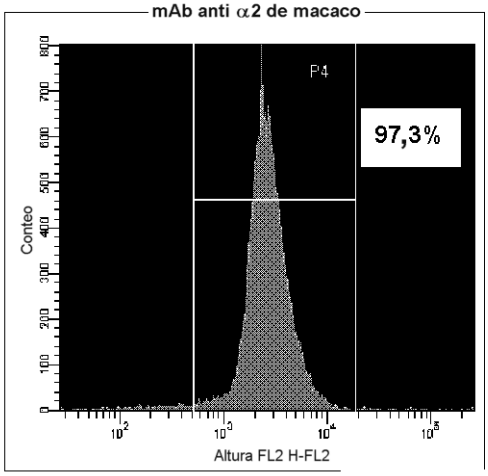


Figura 4B

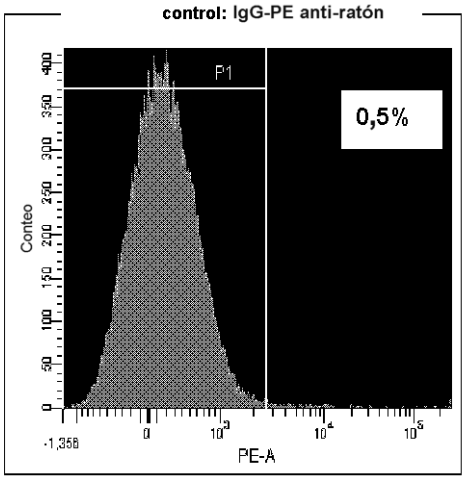


Figura 4C

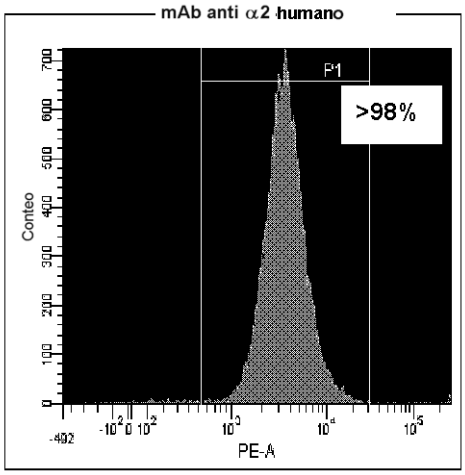


Figura 4D

Fig.5

Fig. 5a) Dominio variable de cadena ligera del mAb anti-integrina α2

NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISC**RASESVE** **SYGNSFIY**WY QQKPGQAPKL LIY**LASNLAS**
GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YC**QQNNEDPY** **T**FGGGTKLEI K

(SEC ID Nº: 1)

AACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATCCTGCAGAG
CCAGTGAAAGTGTTGAGAGTTATGGCAACAGTTTTATTTACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGGCACCCAA
ACTCCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGCATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTAGGACA
GACTTCACCCTCACCATTGATCCTGTGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAATAATGAGG
ATCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

(SEC ID Nº: 12)

Fig. 5b) Dominio variable de cadena pesada del mAb anti-integrina α2-

QVQLHQPGAE LVKPGAPVKL SCKAS**GYTFT** **SYWMN**WVKQR PGRGLEWIG**R** **IDPSDSETHY**
NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAK**VG** **RGYFDY**WGQG TTLTVSS

(SEC ID Nº: 2)

CAGGTCCAACTGCATCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGGCTCCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTT
CTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACGAGGCCTCGAGTGGATTGG
CAGGATTGATCCTTCCGATAGTGAAACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACACTGACTGTAGAC
AAATCCTCCAGCACAGCCTACATCCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAA
AGGTGGGACGGGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

(SEC ID Nº: 13)

Fig.6

Fig. 6a: CDR del dominio variable de cadena pesada

HCDR1

GYTFTSYWMN

(SEC ID Nº: 3)

HCDR2

RIDPSDSETHYNQKFK

(SEC ID Nº: 4)

HCDR3

VGRGYFDY

(SEC ID Nº: 5)

Figure 6b: CDR del dominio variable de cadena ligera

LCDR1:

RASESVESYGNSFIY

(SEC ID Nº: 6)

LCDR2:

LASNLAS

(SEC ID Nº: 7)

LCDR3:

QQNNEDPYT

(SEC ID Nº: 8)

Fig.7

Fig. 7a: Cadena ligera quimérica (anti alfa 2VL-IGKC CL)

NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVESYGNSFIYWYQQKPGQAPKLLIYLASNLASGVPARF
SGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(Secuencia de aminoácidos: SEC ID Nº: 9)

AACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATCCTGCAGAG
CCAGTGAAAGTGTTGAGAGTTATGGCAACAGTTTTATTTACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGGCACCCAA
ACTCCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGCATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTAGGACA
GACTTCACCCTCACCATTGATCCTGTGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAATAATGAGG
ATCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTT
CCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGG
GAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGG
ACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGT
GTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC

(Secuencia codificante: SEC ID Nº: 14)

Fig.7b: mAb quimérico (anti α2 VH-IGHG4 CH1)

QVQLHQPGAELVKPGAPVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPGRGLEWIGRIDPSDSETHYNQKFKD
KATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCAKVGRGYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCS
RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTY
TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

(Secuencia de aminoácidos: SEC ID Nº: 10)

CAGGTCCAACTGCATCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGGCTCCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTT
CTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACGAGGCCTCGAGTGGATTGG
CAGGATTGATCCTTCCGATAGTGAAACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACACTGACTGTAGAC
AAATCCTCCAGCACAGCCTACATCCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAA
AGGTGGGACGGGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAGCACCAAGGG
CCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTG
AAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCC
CTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCAC
CAAGACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGTCCAAGTAC

GGCCCTCCTTGCCCTCCCTGCCCTGCCCCTGAGTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGC
CTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCC
TGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAG
TTCAATTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACA
AGTGTAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAG
GGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTG
GTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGA
CCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTG
GCAGGAGGGCAACGTCTTTTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTG
TCCCTGTCTCTGGGC

(Secuencia codificante: SEC ID Nº: 15)

Fig. 7c: Fragmento Fab de cadena pesada quimérico (anti α2 VH-IGHG1 CH1)

QVQLHQPGAELVKPGAPVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPGRGLEWIGRIDPSDSETHYNQKFKD
KATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCAKVGRGYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT*HHHHHH*

(Secuencia de aminoácidos: SEC ID Nº: 11)

CAGGTCCAACTGCATCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGGCTCCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTT
CTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACGAGGCCTCGAGTGGATTGG
CAGGATTGATCCTTCCGATAGTGAAACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACACTGACTGTAGAC
AAATCCTCCAGCACAGCCTACATCCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAA
AGGTGGGACGGGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAGCACCAAGGG
CCCATCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCTCCAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTG
AAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
CTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCAC
CCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCTAAGTCC
TGTGACAAGACCCACACCCATCACCATCACCATCAC

(Secuencia codificante: SEC ID Nº: 16)

Fig.8

Regiones constantes humanas para generación de construcciones de anticuerpo quimérico

Swiss-Prot: Q502W4

>gi|74740177|sp|Q502W4|Q502W4_**HUMAN proteína IGKC**

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(Secuencia de aminoácidos: SEC ID Nº: 17)

Swiss-Prot: P01861.1 (S108P, L115E)

>gi|121047|sp|P01861.1|**IGHG4_HUMAN** RecName: Full=Región de Cadena C de Ig gamma-4

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP**P**CPAPEF**E**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(Secuencia de aminoácidos: SEC ID Nº: 18)

Swiss-Prot: Q569F4

>gi|74735951|sp|Q569F4|Q569F4_**HUMAN proteína IGHG1**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(Secuencia de aminoácidos: SEC ID Nº: 19)

Fig.9

Secuencias de integrina α2 yβ1 humana

Precursor de integrina α2 de acuerdo con el número de acceso: NP_002194.2:

```
  1 mgpertgaap lplllvlals qgilncclay nvglpeakif sgpsseqfgy avqqfinpkg
 61 nwllvgspws gfpenrmgdv ykcpvdlsta tceklnlqts tsipnvtemk tnmslglilt
121 rnmgtggflt cgplwaqqcg nqyyttgvcs dispdfqlsa sfspatqpcp slidvvvvcd
181 esnsiypwda vknflekfvq gldigptktq vgliqyannp rvvfnlntyk tkeemivats
241 qtsqyggdlt ntfgaiqyar kyaysaasgg rrsatkvmvv vtdgeshdgs mlkavidqcn
301 hdnilrfgia vlgylnrnal dtknlikeik aiasiptery ffnvsdeaal lekagtlgeq
361 ifsiegtvqg gdnfqmemsq vgfsadyssq ndilmlgavg afgwsgtivq ktshghlifp
421 kqafdqilqd rnhssylgys vaaistgest hfvagapran ytgqivlysv nengnitviq
481 ahrgdqigsy fgsvlcsvdv dkdtitdvll vgapmymsdl kkeegrvylf tikegilgqh
541 qflegpegie ntrfgsaiaa lsdinmdgfn dvivgsplen qnsgavyiyn ghqgtirtky
601 sqkilgsdga frshlqyfgr sldgygdlng dsitdvsiga fgqvvqlwsq siadvaieas
661 ftpekitlvn knaqiilklc fsakfrptkq nnqvaivyni tldadgfssr vtsrglfken
721 nerclqknmv vnqaqscpeh iiyiqepsdv vnsldlrvdi slenpgtspa leaysetakv
781 fsipfhkdcg edglcisdlv ldvrqipaaq eqpfivsnqn krltfsvtlk nkresayntg
841 ivvdfsenlf fasfslpvdg tevtcqvaas qksvacdvgy palkreqqvt ftinfdfnlq
901 nlqnqaslsf qalsesqeen kadnlvnlki pllydaeihl trstninfye issdgnvpsi
961 vhsfedvgpk fifslkvttg svpvsmatvi ihipqytkek nplmyltgvq tdkagdiscn
1021 adinplkigq tsssvsfkse nfrhtkelnc rtascsnvtc wlkdvhmkge yfvnvttriw
1081 ngtfasstfq tvqltaaaei ntynpeiyvi edntvtiplm imkpdekaev ptgviigsii
1141 agillllalv ailwklgffk rkyekmtknp deidettels s
```

(SEC ID Nº: 20)

Secuencia codificante de integrina α2 (hs) de acuerdo con el Nº de acceso de NCBI: NM_002203.3:

```
  1 atggggccag aacggacagg ggccgcgccg ctgccgctgc tgctggtgtt agcgctcagt
 61 caaggcattt taaattgttg tttggcctac aatgttggtc tcccagaagc aaaaatattt
```

```
 121 tccggtcctt caagtgaaca gtttggctat gcagtgcagc agtttataaa tccaaaaggc
 181 aactggttac tggttggttc accctggagt ggctttcctg agaaccgaat gggagatgtg
 241 tataaatgtc ctgttgacct atccactgcc acatgtgaaa aactaaattt gcaaacttca
 301 acaagcattc caaatgttac tgagatgaaa accaacatga gcctcggctt gatcctcacc
 361 aggaacatgg gaactggagg ttttctcaca tgtggtcctc tgtgggcaca gcaatgtggg
 421 aatcagtatt acacaacggg tgtgtgttct gacatcagtc ctgattttca gctctcagcc
 481 agcttctcac ctgcaactca gccctgccct tccctcatag atgttgtggt tgtgtgtgat
 541 gaatcaaata gtatttatcc ttgggatgca gtaaagaatt ttttggaaaa atttgtacaa
 601 ggcctggata taggccccac aaagacacag gtggggttaa ttcagtatgc caataatcca
 661 agagttgtgt ttaacttgaa cacatataaa accaaagaag aaatgattgt agcaacatcc
 721 cagacatccc aatatggtgg ggacctcaca aacacattcg gagcaattca atatgcaaga
 781 aaatatgctt attcagcagc ttctggtggg cgacgaagtg ctacgaaagt aatggtagtt
 841 gtaactgacg gtgaatcaca tgatggttca atgttgaaag ctgtgattga tcaatgcaac
 901 catgacaata tactgaggtt tggcatagca gttcttgggt acttaaacag aaacgcccct
 961 gatactaaaa atttaataaa agaaataaaa gcaatcgcta gtattccaac agaaagatac
1021 tttttcaatg tgtctgatga agcagctcta ctagaaaagg ctgggacatt aggagaacaa
1081 attttcagca ttgaaggtac tgttcaagga ggagacaact ttcagatgga aatgtcacaa
1141 gtgggattca gtgcagatta ctcttctcaa aatgatattc tgatgctggg tgcagtggga
1201 gcttttggct ggagtgggac cattgtccag aagacatctc atggccattt gatctttcct
1261 aaacaagcct ttgaccaaat tctgcaggac agaaatcaca gttcatattt aggttactct
1321 gtggctgcaa tttctactgg agaaagcact cactttgttg ctggtgctcc tcgggcaaat
1381 tataccggcc agatagtgct atatagtgtg aatgagaatg gcaatatcac ggttattcag
1441 gctcaccgag gtgaccagat tggctcctat tttggtagtg tgctgtgttc agttgatgtg
1501 gataaagaca ccattacaga cgtgctcttg gtaggtgcac caatgtacat gagtgaccta
1561 aagaaagagg aaggaagagt ctacctgttt actatcaaag agggcatttt gggtcagcac
1621 caatttcttg aaggccccga gggcattgaa aacactcgat ttggttcagc aattgcagct
1681 ctttcagaca tcaacatgga tggctttaat gatgtgattg ttggttcacc actagaaaat
1741 cagaattctg gagctgtata catttacaat ggtcatcagg gcactatccg cacaaagtat
1801 tcccagaaaa tcttgggatc cgatggagcc tttaggagcc atctccagta ctttgggagg
1861 tccttggatg gctatggaga tttaaatggg gattccatca ccgatgtgtc tattggtgcc
1921 tttggacaag tggttcaact ctggtcacaa agtattgctg atgtagctat agaagcttca
1981 ttcacaccag aaaaaatcac tttggtcaac aagaatgctc agataattct caaactctgc
```

2041 ttcagtgcaa agttcagacc tactaagcaa aacaatcaag tggccattgt atataacatc

2101 acacttgatg cagatggatt ttcatccaga gtaacctcca gggggttatt taaagaaaac

2161 aatgaaaggt gcctgcagaa gaatatggta gtaaatcaag cacagagttg ccccgagcac

2221 atcatttata tacaggagcc ctctgatgtt gtcaactctt tggatttgcg tgtggacatc

2281 agtctggaaa accctggcac tagccctgcc cttgaagcct attctgagac tgccaaggtc

2341 ttcagtattc ctttccacaa agactgtggt gaggacggac tttgcatttc tgatctagtc

2401 ctagatgtcc gacaaatacc agctgctcaa gaacaaccct ttattgtcag caaccaaaac

2461 aaaaggttaa cattttcagt aacgctgaaa aataaaaggg aaagtgcata caacactgga

2521 attgttgttg atttttcaga aaacttgttt tttgcatcat tctccctgcc ggttgatggg

2581 acagaagtaa catgccaggt ggctgcatct cagaagtctg ttgcctgcga tgtaggctac

2641 cctgctttaa agagagaaca acaggtgact tttactatta actttgactt caatcttcaa

2701 aaccttcaga atcaggcgtc tctcagtttc caagccttaa gtgaaagcca agaagaaaac

2761 aaggctgata atttggtcaa cctcaaaatt cctctcctgt atgatgctga aattcactta

2821 acaagatcta ccaacataaa tttttatgaa atctcttcgg atgggaatgt tccttcaatc

2881 gtgcacagtt ttgaagatgt tggtccaaaa ttcatcttct ccctgaaggt aacaacagga

2941 agtgttccag taagcatggc aactgtaatc atccacatcc ctcagtatac caaagaaaag

3001 aacccactga tgtacctaac tggggtgcaa acagacaagg ctggtgacat cagttgtaat

3061 gcagatatca atccactgaa aataggacaa acatcttctt ctgtatcttt caaaagtgaa

3121 aatttcaggc acaccaaaga attgaactgc agaactgctt cctgtagtaa tgttacctgc

3181 tggttgaaag acgttcacat gaaaggagaa tactttgtta atgtgactac cagaatttgg

3241 aacgggactt tcgcatcatc aacgttccag acagtacagc taacggcagc tgcagaaatc

3301 aacacctata accctgagat atatgtgatt gaagataaca ctgttacgat tcccctgatg

3361 ataatgaaac ctgatgagaa agccgaagta ccaacaggag ttataatagg aagtataatt

3421 gctggaatcc ttttgctgtt agctctggtt gcaattttat ggaagctcgg cttcttcaaa

3481 agaaaatatg aaaagatgac caaaaatcca gatgagattg atgagaccac agagctcagt

3541 agctga

(SEC ID Nº: 21)

Precursor de isoforma 1A de integrina β1 (hs) de acuerdo con el Nº de acceso de NCBI NP_002202.2:

1 mnlqpifwig lissvccvfa qtdenrclka nakscgeciq agpncgwctn stflqegmpt

61 sarcddleal kkkgcppddi enprgskdik knknvtnrsk gtaeklkped itqiqpqqlv

```
121 lrlrsgepqt ftlkfkraed ypidlyylmd lsysmkddle nvkslgtdlm nemrritsdf
181 rigfgsfvek tvmpyisttp aklrnpctse qnctspfsyk nvlsltnkge vfnelvgkqr
241 isgnldspeg gfdaimqvav cgsligwrnv trllvfstda gfhfagdgkl ggivlpndgq
301 chlennmytm shyydypsia hlvqklsenn iqtifavtee fqpvykelkn lipksavgtl
361 sanssnviql iidaynslss evilengkls egvtisyksy ckngvngtge ngrkcsnisi
421 gdevqfeisi tsnkcpkkds dsfkirplgf teevevilqy icececqseg ipespkcheg
481 ngtfecgacr cnegrvgrhc ecstdevnse dmdaycrken sseicsnnge cvcgqcvcrk
541 rdntneiysg kfcecdnfnc drsnglicgg ngvckcrvce cnpnytgsac dcsldtstce
601 asngqicngr gicecgvckc tdpkfqgqtc emcqtclgvc aehkecvqcr afnkgekkdt
661 ctqecsyfni tkvesrdklp qpvqpdpvsh ckekdvddcw fyftysvngn nevmvhvven
721 pecptgpdii pivagvvagi vliglallli wkllmiihdr refakfekek mnakwdtgen
781 piyksavttv vnpkyegk
```

(SEC ID Nº: 22)

Isoforma 1A de secuencia codificante de integrina β1 (hs) de acuerdo con el Nº de acceso de NCBI NM_002211.3:

```
  1 atcagacgcg cagaggaggc ggggccgcgg ctggtttcct gccggggggc ggctctgggc
 61 cgccgagtcc cctcctcccg cccctgagga ggaggagccg ccgccacccg ccgcgcccga
121 cacccgggag gccccgccag cccgcgggag aggcccagcg ggagtcgcgg aacagcaggc
181 ccgagcccac cgcgccgggc cccggacgcc gcgcggaaaa gatgaattta caaccaattt
241 tctggattgg actgatcagt tcagtttgct gtgtgtttgc tcaaacagat gaaaatagat
301 gtttaaaagc aaatgccaaa tcatgtggag aatgtataca agcagggcca aattgtgggt
361 ggtgcacaaa ttcaacattt ttacaggaag gaatgcctac ttctgcacga tgtgatgatt
421 tagaagcctt aaaaaagaag ggttgccctc cagatgacat agaaaatccc agaggctcca
481 aagatataaa gaaaaataaa aatgtaacca accgtagcaa aggaacagca gagaagctca
541 agccagagga tattactcag atccaaccac agcagttggt tttgcgatta agatcagggg
601 agccacagac atttacatta aaattcaaga gagctgaaga ctatcccatt gacctctact
661 accttatgga cctgtcttac tcaatgaaag acgatttgga gaatgtaaaa agtcttggaa
721 cagatctgat gaatgaaatg aggaggatta cttcggactt cagaattgga tttggctcat
781 ttgtggaaaa gactgtgatg ccttacatta gcacaacacc agctaagctc aggaaccctt
841 gcacaagtga acagaactgc accagcccat ttagctacaa aaatgtgctc agtcttacta
```

```
 901 ataaaggaga agtatttaat gaacttgttg gaaaacagcg catatctgga aatttggatt
 961 ctccagaagg tggtttcgat gccatcatgc aagttgcagt ttgtggatca ctgattggct
1021 ggaggaatgt tacacggctg ctggtgtttt ccacagatgc cgggtttcac tttgctggag
1081 atgggaaact tggtggcatt gttttaccaa atgatggaca atgtcacctg gaaaataata
1141 tgtacacaat gagccattat tatgattatc cttctattgc tcaccttgtc cagaaactga
1201 gtgaaaataa tattcagaca atttttgcag ttactgaaga atttcagcct gtttacaagg
1261 agctgaaaaa cttgatccct aagtcagcag taggaacatt atctgcaaat tctagcaatg
1321 taattcagtt gatcattgat gcatacaatt ccctttcctc agaagtcatt ttggaaaacg
1381 gcaaattgtc agaaggcgta acaataagtt acaaatctta ctgcaagaac ggggtgaatg
1441 gaacagggga aaatggaaga aaatgttcca atatttccat tggagatgag gttcaatttg
1501 aaattagcat aacttcaaat aagtgtccaa aaaaggattc tgacagcttt aaaattaggc
1561 ctctgggctt tacggaggaa gtagaggtta ttcttcagta catctgtgaa tgtgaatgcc
1621 aaagcgaagg catccctgaa agtcccaagt gtcatgaagg aaatgggaca tttgagtgtg
1681 gcgcgtgcag gtgcaatgaa gggcgtgttg gtagacattg tgaatgcagc acagatgaag
1741 ttaacagtga agacatggat gcttactgca ggaaagaaaa cagttcagaa atctgcagta
1801 acaatggaga gtgcgtctgc ggacagtgtg tttgtaggaa gagggataat acaaatgaaa
1861 tttattctgg caaattctgc gagtgtgata atttcaactg tgatagatcc aatggcttaa
1921 tttgtggagg aaatggtgtt tgcaagtgtc gtgtgtgtga gtgcaacccc aactacactg
1981 gcagtgcatg tgactgttct ttggatacta gtacttgtga agccagcaac ggacagatct
2041 gcaatggccg gggcatctgc gagtgtggtg tctgtaagtg tacagatccg aagtttcaag
2101 ggcaaacgtg tgagatgtgt cagacctgcc ttggtgtctg tgctgagcat aaagaatgtg
2161 ttcagtgcag agccttcaat aaaggagaaa agaaagacac atgcacacag gaatgttcct
2221 attttaacat taccaaggta gaaagtcggg acaaattacc ccagccggtc caacctgatc
2281 ctgtgtccca ttgtaaggag aaggatgttg acgactgttg gttctatttt acgtattcag
2341 tgaatgggaa caacgaggtc atggttcatg ttgtggagaa tccagagtgt cccactggtc
2401 cagacatcat tccaattgta gctggtgtgg ttgctggaat tgttcttatt ggccttgcat
2461 tactgctgat atggaagctt ttaatgataa ttcatgacag aagggagttt gctaaatttg
2521 aaaaggagaa aatgaatgcc aaatgggaca cgggtgaaaa tcctatttat aagagtgccg
2581 taacaactgt ggtcaatccg aagtatgagg gaaaatgagt actgcccgtg caaatcccac
2641 aacactgaat gcaaagtagc aatttccata gtcacagtta ggtagcttta gggcaatatt
2701 gccatggttt tactcatgtg caggttttga aaatgtacaa tatgtataat ttttaaaatg
2761 ttttattatt ttgaaaataa tgttgtaatt catgccaggg actgacaaaa gacttgagac
```

2821 aggatggtta ctcttgtcag ctaaggtcac attgtgcctt tttgaccttt tcttcctgga

2881 ctattgaaat caagcttatt ggattaagtg atatttctat agcgattgaa agggcaatag

2941 ttaaagtaat gagcatgatg agagtttctg ttaatcatgt attaaaactg atttttagct

3001 ttacaaatat gtcagtttgc agttatgcag aatccaaagt aaatgtcctg ctagctagtt

3061 aaggattgtt ttaaatctgt tattttgcta tttgcctgtt agacatgact gatgacatat

3121 ctgaaagaca agtatgttga gagttgctgg tgtaaaatac gtttgaaata gttgatctac

3181 aaaggccatg ggaaaaattc agagagttag gaaggaaaaa ccaatagctt taaaacctgt

3241 gtgccatttt aagagttact taatgtttgg taacttttat gccttcactt tacaaattca

3301 agccttagat aaaagaaccg agcaattttc tgctaaaaag tccttgattt agcactattt

3361 acatacaggc catactttac aaagtatttg ctgaatgggg acctttgag ttgaatttat

3421 tttattattt ttattttgtt taatgtctgg tgctttctgt cacctcttct aatcttttaa

3481 tgtatttgtt tgcaattttg gggtaagact ttttttatga gtacttttc tttgaagttt

3541 tagcggtcaa tttgcctttt taatgaacat gtgaagttat actgtggcta tgcaacagct

3601 ctcacctacg cgagtcttac tttgagttag tgccataaca gaccactgta tgtttacttc

3661 tcaccatttg agttgcccat cttgtttcac actagtcaca ttcttgtttt aagtgccttt

3721 agttttaaca gttcactttt tacagtgcta tttactgaag ttatttatta aatatgccta

3781 aaatacttaa atcggatgtc ttgactctga tgtattttat caggttgtgt gcatgaaatt

3841 tttatagatt aaagaagttg aggaaaagca aaaaaaaaa

(SEC ID Nº: 23)

Fig.10

Fig. 10a: ADNc que codifica LC de mAB anti-integrina α2

```
atggagacagacacactcctgctatgggtgctgctgctctgggttccaggttccacaggtaacattgtgctga
cccaatctccagcttctttggctgtgtctctagggcagagggccaccatatcctgcagagccagtgaaagtgt
tgagagttatggcaacagttttatttactggtaccagcagaaaccaggacaggcacccaaactcctcatctat
cttgcatccaacctagcatctggggtccctgccaggttcagtggcagtgggtctaggacagacttcaccctca
ccattgatcctgtggaggctgatgatgctgcaacctattactgtcagcaaaataatgaggatccgtacacgtt
cggaggggggaccaagctggaaataaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagt
gagcagttaacatctggaggtgcctcagtcgtgtgcttcttgaacaacttctaccccaaagacatcaatgtca
agtggaagattgatggcagtgaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaaagacag
cacctacagcatgagcagcaccctcacgttgaccaaggacgagtatgaacgacataacagctatacctgtgag
gccactcacaagacatcaacttcacccattgtcaagagcttcaacaggaatgagtgctag
```

(SEC ID Nº: 45)

Fig. 10b: ADNc que codifica HC de mAB anti-integrina α2

```
atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagccacaggtgtccactcccaggtccaactgcatc
agcctggggctgaacttgtgaagcctggggctccagtgaagctgtcctgcaaggcttctggctacaccttcac
cagctactggatgaactgggtgaagcagaggcctggacgaggcctcgagtggattggcaggattgatccttcc
gatagtgaaactcactacaatcaaaagttcaaggacaaggccacactgactgtagacaaatcctccagcacag
cctacatccaactcagcagcctgacatctgaggactctgcggtctattactgtgcaaaggtgggacgggggta
ctttgactactggggccaaggcaccactctcacagtctcctcagctaaaacaacagccccatcggtctatcca
ctggcccctgtgtgtggagatacaactggctcctcggtgactctaggatgcctggtcaagggttatttccctg
agccagtgaccttgacctggaactctggatccctgtccagtggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagtc
tgacctctacaccctcagcagctcagtgactgtaacctcgagcacctggcccagccagtccatcacctgcaat
gtggcccacccggcaagcagcaccaaggtggacaagaaaattgagcccagagggcccacaatcaagccctgtc
ctccatgcaaatgcccagcacctaacctcttgggtggaccatccgtcttcatcttccctccaaagatcaagga
tgtactcatgatctccctgagccccatagtcacatgtgtggtggtggatgtgagcgaggatgacccagatgtc
cagatcagctggtttgtgaacaacgtggaagtacacacagctcagacacaaacccatagagaggattacaaca
gtactctccgggtggtcagtgccctccccatccagcaccaggactggatgagtggcaaggagttcaaatgcaa
ggtcaacaacaaagacctcccagcgcccatcgagagaaccatctcaaaacccaaagggtcagtaagagctcca
caggtatatgtcttgcctccaccagaagaagagatgactaagaaacaggtcactctgacctgcatggtcacag
acttcatgcctgaagacatttacgtggagtggaccaacaacgggaaaacagagctaaactacaagaacactga
accagtcctggactctgatggttcttacttcatgtacagcaagctgagagtggaaaagaagaactgggtggaa
agaaatagctactcctgttcagtggtccacgagggtctgcacaatcaccacacgactaagagcttctcccgga
ctcccgggaagtga
```

(SEC ID Nº: 46)

Fig. 10c: Secuencia de aminoácidos of LC secretada de mAB anti-integrina α2

```
nivltqspaslavslgqratiscrasesvesygnsfiywyqqkpgqapkllliylasnlasgvparfsgsgsrt
dftltidpveaddaatyycqqnnedpytfgggtkleikradaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfypk
dinvkwkidgserqngvlnswtdqdskdstysmsstltltkdeyerhnsytceathktstspivksfnrnec
```

(SEC ID Nº: 47)

Fig. 10d: Secuencia de aminoácidos de HC secretada de mAB anti-integrina α2

qvqlhqpgaelvkpgapvklsckasgytftsywmnwvkqrpgrglewigridpsdsethynqkfkdkatltvd
kssstayiqlssltsedsavyycakvgrgyfdywgqgttltvssakttapsvyplapvcgdttgssvtlgclv
kgyfpepvtltwnsgslssgvhtfpavlqsdlytlsssvtvtsstwpsqsitcnvahpasstkvdkkieprgp
tikpcppckcpapnllggpsvfifppkikdvlmislspivtcvvvdvseddpdvqiswfvnnvevhtaqtqth
redynstlrvvsalpiqhqdwmsgkefkckvnnkdlpapiertiskpkgsvrapqvyvlpppeeemtkkqvtl
tcmvtdfmpediyvewtnngktelnykntepvldsdgsyfmysklrvekknwvernsyscsvvheglhnhhtt
ksfsrtpgk

(SEC ID Nº: 48)

Fig. 10e: Secuencia de aminoácidos de anticuerpo comparador

Secuencia de aminoácidos de LC del comparador

DFVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCSAQSSVNYIHWYQQKPDQAPKKLIYDTSKLASGVPSR
FSGSGSGTDYTFTISSLEAEDAATYYCQQWTTNPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEC ID Nº: 53)

Secuencia de aminoácidos de HC del comparador

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGIHWIRQPPGKGLEWLGVIWARGFTN
YNSALMSRLTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARANDGVYYAMDYWGQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE
FEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

(SEC ID Nº: 54)

Fig.11

Fig. 11: Constantes de disociación en equilibrio K_D para las variantes humanizadas y el comparador según se determina por Biacore

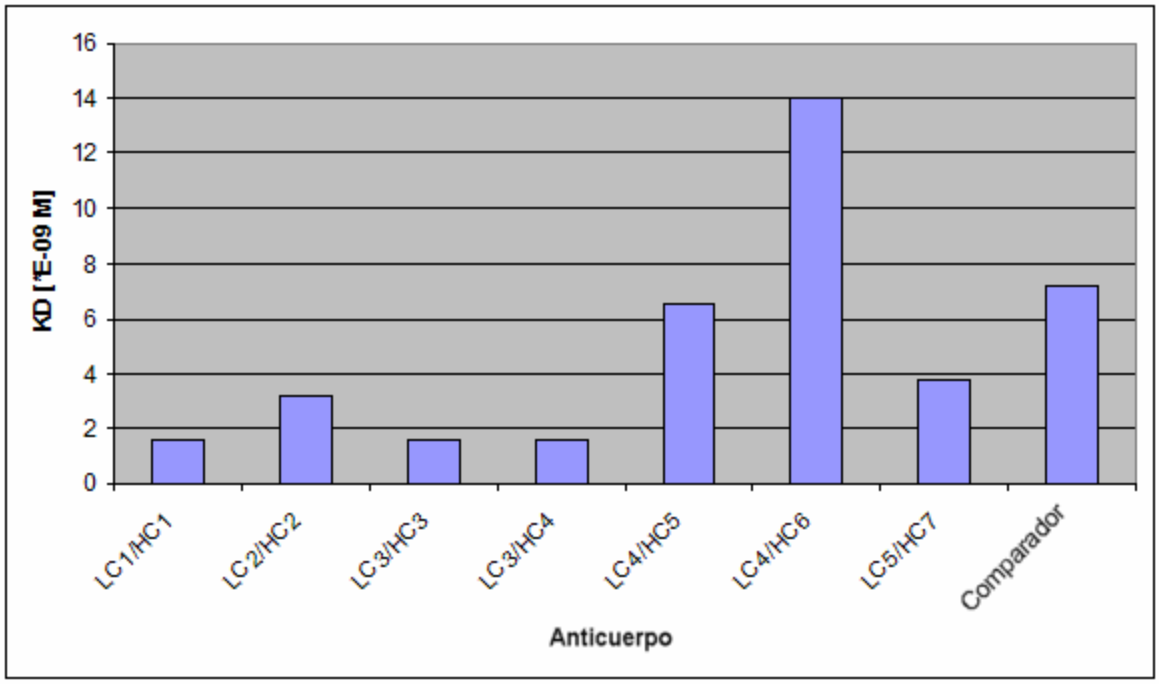


Fig.12

Fig. 12: Unión de mAb comparador TMC2206 con dominio I de integrina α_2 preunido por Fab no humanizado medida usando Biacore

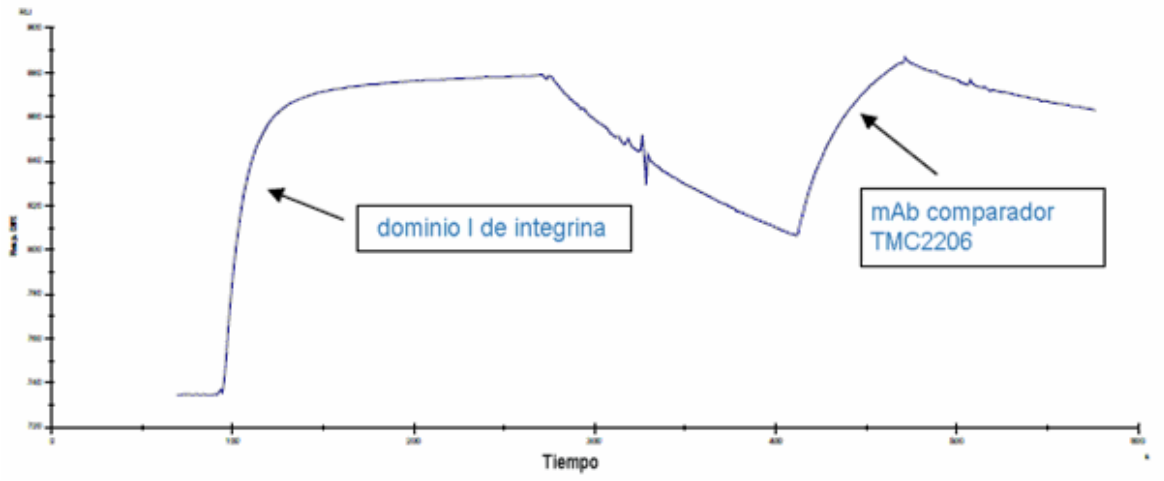


Fig.13

Fig. 13: Unión de Fab no humanizado con dominio I de integrina α_2 preunido por mAb comparador TMC2206

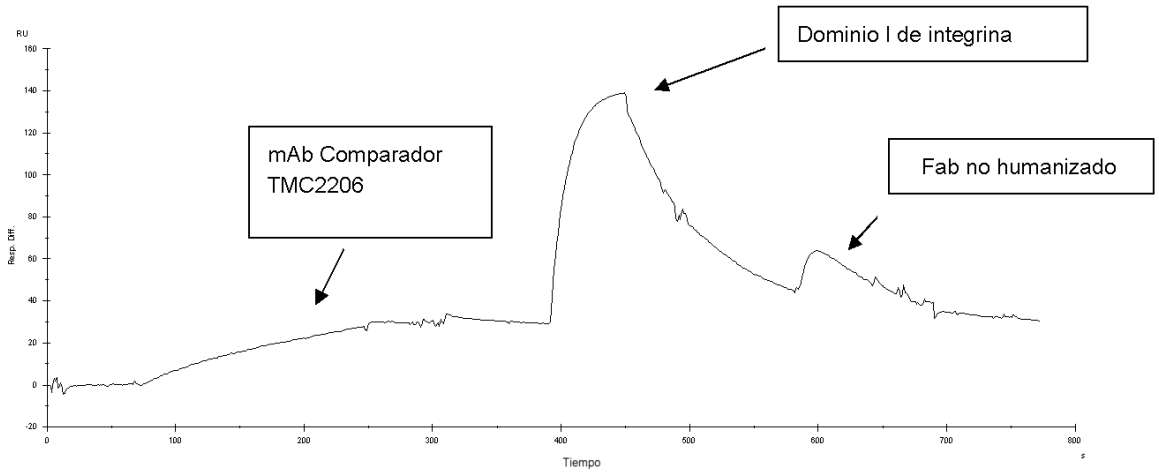
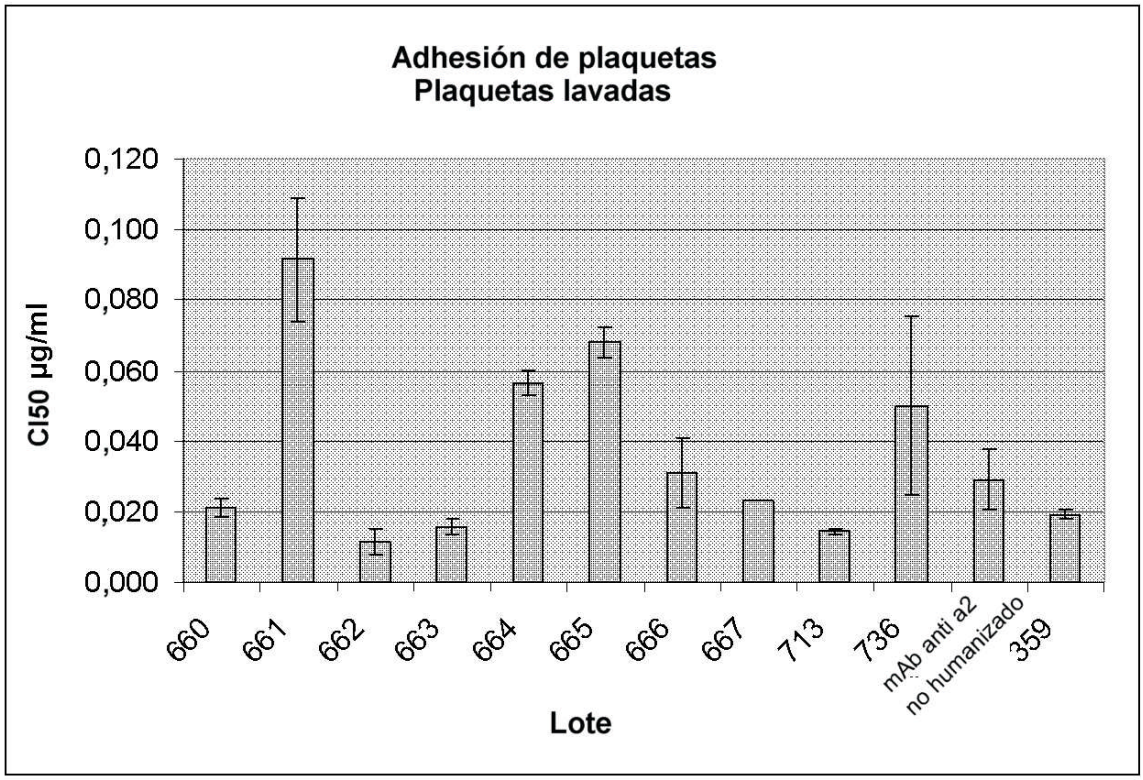


Fig.14

Figura 14: Inhibición de adhesión de plaquetas a colágeno en condiciones estáticas usando plaquetas lavadas



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SANOFI

<120> Péptido o complejo peptídico que se une a integrina alfa 2 y métodos y usos que implican a los mismos

<130> DE2010/156

<140> EP10305929.1
<141> 2010-08-31

<160> 54

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio variable de la cadena ligera de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 1

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 2
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio variable de la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR1 del dominio variable de la cadena pesada

<400> 3

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn
1 5 10

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR2 del dominio variable de la cadena pesada

<400> 4

Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR3 del dominio variable de la cadena pesada

<400> 5

Val Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR1 del dominio variable de la cadena ligera

<400> 6

Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR2 del dominio variable de la cadena ligera

<400> 7

Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR3 del dominio variable de la cadena ligera

<400> 8

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 9
<211> 218
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera (anti-alpha2-VL-IGKC-CL) quimérica

<400> 9

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 10
<211> 443
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> mAb (anti-alpha2-VH-IGHG4-CH1) quimérico

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

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

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

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

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

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

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

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

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

<210> 11
<211> 231
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento Fab de la cadena pesada (anti-alpha2-VH-IGHG1-CH1) quimértico

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr His His His His His His
225 230

<210> 12
<211> 333
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio variable de la cadena ligera del mAb anti-alfa2-integrina

<400> 12
aacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atatcctgca gagccagtga aagtgttgag agttatggca acagttttat ttactggtac 120

cagcagaaac caggacaggc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccaa cctagcatct 180

ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattgat 240

cctgtggagg ctgatgatgc tgcaacctat tactgtcagc aaaataatga ggatccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 13
<211> 351
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio variable de la cadena pesada del mAb anti-alfa2-integrina

<400> 13
caggtccaac tgcatcagcc tggggctgaa cttgtgaagc ctggggctcc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120

cctggacgag gcctcgagtg gattggcagg attgatcctt ccgatagtga aactcactac 180

aatcaaaagt tcaaggacaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240

atccaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaaggtggga 300

cgggggtact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc a 351

<210> 14
<211> 654
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera (anti-alfa2-VL-IGKC-CL) quimérica

<400> 14
aacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atatcctgca gagccagtga aagtgttgag agttatggca acagttttat ttactggtac 120

cagcagaaac caggacaggc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccaa cctagcatct 180

ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattgat 240

cctgtggagg ctgatgatgc tgcaacctat tactgtcagc aaaataatga ggatccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgtacgg tggccgctcc ttccgtgttc 360

atcttccctc cctccgacga gcagctgaag tccggcaccg cctccgtggt gtgtctgctg 420

aacaacttct accctcggga ggccaaggtg cagtggaagg tggacaacgc cctgcagtcc 480

ggcaactccc aggagtccgt caccgagcag gactccaagg acagcaccta ctccctgtcc 540

tccaccctga ccctgtccaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg 600

acccaccagg gcctgtccag ccctgtgacc aagtccttca accggggcga gtgc 654

<210> 15
<211> 1329
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> mAb (anti-alfa2-VH-IGHG4-CH1) quimérico

<400> 15
caggtccaac tgcatcagcc tggggctgaa cttgtgaagc ctggggctcc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120

cctggacgag gcctcgagtg gattggcagg attgatcctt ccgatagtga aactcactac 180

aatcaaaagt tcaaggacaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240

atccaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaaggtggga 300

cgggggtact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agccagcacc 360

aagggccctt ccgtgttccc tctggccccc tgctcccggt ccacctccga gtccaccgcc 420

gctctgggct gcctggtgaa ggactacttc cctgagcctg tgaccgtgtc ctggaactct 480

ggcgccctga cctccggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgcagtcctc cggcctgtac 540

tccctgtcct ccgtggtgac cgtgccttcc tcctccctgg gcaccaagac ctacacctgt 600

aacgtggacc acaagccttc caacaccaag gtggacaagc gggtggagtc caagtacggc 660

cctccttgcc ctccctgccc tgcccctgag ttcgagggcg gacctagcgt gttcctgttc 720

cctcctaagc ctaaggacac cctgatgatc tcccggaccc ctgaggtgac ctgtgtggtg 780

gtggacgtgt cccaggagga ccctgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840

gtgcacaacg ccaagaccaa gcctcgggag gagcagttca attccaccta ccgggtggtg 900

tctgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aagaatacaa gtgtaaggtc 960

tccaacaagg gcctgccctc ctccatcgag aaaaccatct ccaaggccaa gggccagcct 1020

agggagcctc aggtgtacac cctgcctcct agccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg 1080

tccctgacct gtctggtgaa gggcttctac ccttccgaca tcgccgtgga gtgggagtcc 1140

aacggccagc ctgagaacaa ctacaagacc acccctcctg tgctggactc cgacggctcc 1200

ttcttcctgt actccaggct gaccgtggac aagtcccggt ggcaggaggg caacgtcttt 1260

tcctgctccg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca cccagaagtc cctgtccctg 1320

tctctgggc 1329

<210> 16
<211> 693
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento Fab de la cadena pesada (anti-alfa2-VH-IGHG1-CH1) quimérico

<400> 16
caggtccaac tgcatcagcc tggggctgaa cttgtgaagc ctggggctcc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120

cctggacgag gcctcgagtg gattggcagg attgatcctt ccgatagtga aactcactac 180

aatcaaaagt tcaaggacaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240

atccaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaaggtggga 300

cgggggtact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agccagcacc 360

aagggcccat ccgtgttccc tctggccct tcctccaagt ccacctccgg cggcaccgcc 420

gctctgggct gcctggtgaa ggactacttc cctgagcctg tgaccgtgtc ctggaactct 480

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgcagtcctc cggcctgtac 540

tccctgtcct ccgtggtgac cgtgccttcc tcctccctgg gcacccagac ctacatctgt 600

aacgtgaacc acaagccctc caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc taagtcctgt 660

gacaagaccc acacccatca ccatcaccat cac 693

<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína IGKC humana (Swiss-Prot: Q502W4)

<400> 17

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

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

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 18
<211> 327
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína IGHG4 humana (Swiss-Prot: P01861.1 (S108P, L115E))

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 19
<211> 330
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína IGHG1 humana (Swiss-Prot: Q569F4)

<400> 19

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 20
<211> 1181
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Ser Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Val Ala Ala Ile Ser Thr Gly Glu
435 440 445

Ser Thr His Phe Val Ala Gly Ala Pro Arg Ala Asn Tyr Thr Gly Gln
450 455 460

Ile Val Leu Tyr Ser Val Asn Glu Asn Gly Asn Ile Thr Val Ile Gln
465 470 475 480

Ala His Arg Gly Asp Gln Ile Gly Ser Tyr Phe Gly Ser Val Leu Cys
485 490 495

Ser Val Asp Val Asp Lys Asp Thr Ile Thr Asp Val Leu Leu Val Gly
500 505 510

Ala Pro Met Tyr Met Ser Asp Leu Lys Lys Glu Glu Gly Arg Val Tyr
515 520 525

Leu Phe Thr Ile Lys Glu Gly Ile Leu Gly Gln His Gln Phe Leu Glu
530 535 540

Gly Pro Glu Gly Ile Glu Asn Thr Arg Phe Gly Ser Ala Ile Ala Ala
545 550 555 560

Leu Ser Asp Ile Asn Met Asp Gly Phe Asn Asp Val Ile Val Gly Ser
565 570 575

Pro Leu Glu Asn Gln Asn Ser Gly Ala Val Tyr Ile Tyr Asn Gly His
580 585 590

Gln Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Ile Leu Gly Ser Asp
595 600 605

Gly Ala Phe Arg Ser His Leu Gln Tyr Phe Gly Arg Ser Leu Asp Gly
610 615 620

Tyr Gly Asp Leu Asn Gly Asp Ser Ile Thr Asp Val Ser Ile Gly Ala
625 630 635 640

Phe Gly Gln Val Val Gln Leu Trp Ser Gln Ser Ile Ala Asp Val Ala
645 650 655

Ile Glu Ala Ser Phe Thr Pro Glu Lys Ile Thr Leu Val Asn Lys Asn
660 665 670

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Glu Thr Thr Glu Leu Ser Ser
1175 1180

<210> 21
<211> 3546
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 21
atggggccag aacggacagg ggccgcgccg ctgccgctgc tgctggtgtt agcgctcagt 60

caaggcattt taaattgttg tttggcctac aatgttggtc tcccagaagc aaaaatattt 120

tccggtcctt caagtgaaca gtttggctat gcagtgcagc agtttataaa tccaaaaggc 180

aactggttac tggttggttc accctggagt ggctttcctg agaaccgaat gggagatgtg 240

tataaatgtc ctgttgacct atccactgcc acatgtgaaa aactaaattt gcaaacttca 300

acaagcattc caaatgttac tgagatgaaa accaacatga gcctcggctt gatcctcacc 360

aggaacatgg gaactggagg ttttctcaca tgtggtcctc tgtgggcaca gcaatgtggg 420

aatcagtatt acacaacggg tgtgtgttct gacatcagtc ctgattttca gctctcagcc 480

agcttctcac ctgcaactca gccctgccct tccctcatag atgttgtggt tgtgtgtgat 540

gaatcaaata gtatttatcc ttgggatgca gtaaagaatt ttttggaaaa atttgtacaa 600

ggcctggata taggccccac aaagacacag gtggggttaa ttcagtatgc caataatcca 660

agagttgtgt ttaacttgaa cacatataaa accaaagaag aaatgattgt agcaacatcc 720

cagacatccc aatatggtgg ggacctcaca aacacattcg gagcaattca atatgcaaga 780

aaatatgctt attcagcagc ttctggtggg cgacgaagtg ctacgaaagt aatggtagtt 840

gtaactgacg gtgaatcaca tgatggttca atgttgaaag ctgtgattga tcaatgcaac 900

catgacaata tactgaggtt tggcatagca gttcttgggt acttaaacag aaacgccctt 960

gatactaaaa atttaataaa agaaataaaa gcaatcgcta gtattccaac agaaagatac 1020

tttttcaatg tgtctgatga agcagctcta ctagaaaagg ctgggacatt aggagaacaa 1080

attttcagca ttgaaggtac tgttcaagga ggagacaact ttcagatgga aatgtcacaa 1140

gtgggattca gtgcagatta ctcttctcaa aatgatattc tgatgctggg tgcagtggga 1200

gcttttggct ggagtgggac cattgtccag aagacatctc atggccattt gatctttcct 1260

aaacaagcct ttgaccaaat tctgcaggac agaaatcaca gttcatattt aggttactct 1320

gtggctgcaa tttctactgg agaaagcact cactttgttg ctggtgctcc tcgggcaaat 1380

tataccggcc agatagtgct atatagtgtg aatgagaatg gcaatatcac ggttattcag 1440

gctcaccgag gtgaccagat tggctcctat tttggtagtg tgctgtgttc agttgatgtg 1500

gataaagaca ccattacaga cgtgctcttg gtaggtgcac caatgtacat gagtgaccta 1560

aagaaagagg aaggaagagt ctacctgttt actatcaaag agggcatttt gggtcagcac 1620

caatttcttg aaggccccga gggcattgaa aacactcgat ttggttcagc aattgcagct 1680

ctttcagaca tcaacatgga tggctttaat gatgtgattg ttggttcacc actagaaaat 1740

cagaattctg gagctgtata catttacaat ggtcatcagg gcactatccg cacaaagtat 1800

tcccagaaaa tcttgggatc cgatggagcc tttaggagcc atctccagta ctttgggagg 1860

tccttggatg gctatggaga tttaaatggg gattccatca ccgatgtgtc tattggtgcc 1920

tttggacaag tggttcaact ctggtcacaa agtattgctg atgtagctat agaagcttca 1980

ttcacaccag aaaaaatcac tttggtcaac aagaatgctc agataattct caaactctgc 2040

ttcagtgcaa agttcagacc tactaagcaa aacaatcaag tggccattgt atataacatc 2100

acacttgatg cagatggatt ttcatccaga gtaacctcca gggggttatt taaagaaaac 2160

aatgaaaggt gcctgcagaa gaatatggta gtaaatcaag cacagagttg ccccgagcac 2220

atcatttata tacaggagcc ctctgatgtt gtcaactctt tggatttgcg tgtggacatc 2280

agtctggaaa accctggcac tagccctgcc cttgaagcct attctgagac tgccaaggtc 2340

ttcagtattc ctttccacaa agactgtggt gaggacggac tttgcatttc tgatctagtc 2400

ctagatgtcc gacaaatacc agctgctcaa gaacaaccct ttattgtcag caaccaaaac 2460

aaaaggttaa cattttcagt aacgctgaaa aataaaaggg aaagtgcata caacactgga 2520

attgttgttg atttttcaga aaacttgttt tttgcatcat tctccctgcc ggttgatggg 2580

acagaagtaa catgccaggt ggctgcatct cagaagtctg ttgcctgcga tgtaggctac 2640

cctgctttaa agagagaaca acaggtgact tttactatta actttgactt caatcttcaa 2700

aaccttcaga atcaggcgtc tctcagtttc caagccttaa gtgaaagcca agaagaaaac 2760

aaggctgata atttggtcaa cctcaaaatt cctctcctgt atgatgctga aattcactta 2820

acaagatcta ccaacataaa tttttatgaa atctcttcgg atgggaatgt tccttcaatc 2880

gtgcacagtt ttgaagatgt tggtccaaaa ttcatcttct ccctgaaggt aacaacagga 2940

agtgttccag taagcatggc aactgtaatc atccacatcc ctcagtatac caaagaaaag 3000

aacccactga tgtacctaac tggggtgcaa acagacaagg ctggtgacat cagttgtaat 3060

gcagatatca atccactgaa aataggacaa acatcttctt ctgtatcttt caaaagtgaa 3120

aatttcaggc acaccaaaga attgaactgc agaactgctt cctgtagtaa tgttacctgc 3180

tggttgaaag acgttcacat gaaaggagaa tactttgtta atgtgactac cagaatttgg 3240

aacgggactt tcgcatcatc aacgttccag acagtacagc taacggcagc tgcagaaatc 3300

aacacctata accctgagat atatgtgatt gaagataaca ctgttacgat tcccctgatg 3360

ataatgaaac ctgatgagaa agccgaagta ccaacaggag ttataatagg aagtataatt 3420

gctggaatcc ttttgctgtt agctctggtt gcaattttat ggaagctcgg cttcttcaaa 3480

agaaaatatg aaaagatgac caaaaatcca gatgagattg atgagaccac agagctcagt 3540

agctga 3546

<210> 22
<211> 798
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Ser Lys Gly Thr Ala Glu Lys Leu Lys Pro Glu Asp Ile Thr
100 105 110

Gln Ile Gln Pro Gln Gln Leu Val Leu Arg Leu Arg Ser Gly Glu Pro
115 120 125

Gln Thr Phe Thr Leu Lys Phe Lys Arg Ala Glu Asp Tyr Pro Ile Asp
130 135 140

Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Glu
145 150 155 160

Asn Val Lys Ser Leu Gly Thr Asp Leu Met Asn Glu Met Arg Arg Ile
165 170 175

Thr Ser Asp Phe Arg Ile Gly Phe Gly Ser Phe Val Glu Lys Thr Val
180 185 190

Met Pro Tyr Ile Ser Thr Thr Pro Ala Lys Leu Arg Asn Pro Cys Thr
195 200 205

Ser Glu Gln Asn Cys Thr Ser Pro Phe Ser Tyr Lys Asn Val Leu Ser
210 215 220

Leu Thr Asn Lys Gly Glu Val Phe Asn Glu Leu Val Gly Lys Gln Arg
225 230 235 240

Ile Ser Gly Asn Leu Asp Ser Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met
245 250 255

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

Leu Leu Val Phe Ser Thr Asp Ala Gly Phe His Phe Ala Gly Asp Gly
275 280 285

Lys Leu Gly Gly Ile Val Leu Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Leu Glu
290 295 300

Asn Asn Met Tyr Thr Met Ser His Tyr Tyr Asp Tyr Pro Ser Ile Ala
305 310 315 320

His Leu Val Gln Lys Leu Ser Glu Asn Asn Ile Gln Thr Ile Phe Ala
325 330 335

Val Thr Glu Glu Phe Gln Pro Val Tyr Lys Glu Leu Lys Asn Leu Ile
340 345 350

Pro Lys Ser Ala Val Gly Thr Leu Ser Ala Asn Ser Ser Asn Val Ile
355 360 365

Gln Leu Ile Ile Asp Ala Tyr Asn Ser Leu Ser Ser Glu Val Ile Leu
370 375 380

Glu Asn Gly Lys Leu Ser Glu Gly Val Thr Ile Ser Tyr Lys Ser Tyr
385 390 395 400

Cys Lys Asn Gly Val Asn Gly Thr Gly Glu Asn Gly Arg Lys Cys Ser
405 410 415

Asn Ile Ser Ile Gly Asp Glu Val Gln Phe Glu Ile Ser Ile Thr Ser
420 425 430

Asn Lys Cys Pro Lys Lys Asp Ser Asp Ser Phe Lys Ile Arg Pro Leu
435 440 445

Gly Phe Thr Glu Glu Val Glu Val Ile Leu Gln Tyr Ile Cys Glu Cys
450 455 460

Glu Cys Gln Ser Glu Gly Ile Pro Glu Ser Pro Lys Cys His Glu Gly
465 470 475 480

Asn Gly Thr Phe Glu Cys Gly Ala Cys Arg Cys Asn Glu Gly Arg Val
485 490 495

Gly Arg His Cys Glu Cys Ser Thr Asp Glu Val Asn Ser Glu Asp Met
500 505 510

Asp Ala Tyr Cys Arg Lys Glu Asn Ser Ser Glu Ile Cys Ser Asn Asn
515 520 525

Gly Glu Cys Val Cys Gly Gln Cys Val Cys Arg Lys Arg Asp Asn Thr
530 535 540

Asn Glu Ile Tyr Ser Gly Lys Phe Cys Glu Cys Asp Asn Phe Asn Cys
545 550 555 560

Asp Arg Ser Asn Gly Leu Ile Cys Gly Gly Asn Gly Val Cys Lys Cys
565 570 575

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23
<211> 3879
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 23
atcagacgcg cagaggaggc ggggccgcgg ctggtttcct gccgggggggc ggctctgggc 60

cgccgagtcc cctcctcccg cccctgagga ggaggagccg ccgccacccg ccgcgcccga 120

cacccgggag gccccgccag cccgcgggag aggcccagcg ggagtcgcgg aacagcaggc 180

ccgagcccac cgcgccgggc cccggacgcc gcgcggaaaa gatgaattta caaccaattt 240

tctggattgg actgatcagt tcagtttgct gtgtgtttgc tcaaacagat gaaaatagat 300

gtttaaaagc aaatgccaaa tcatgtggag aatgtataca agcagggcca aattgtgggt 360

ggtgcacaaa ttcaacattt ttacaggaag gaatgcctac ttctgcacga tgtgatgatt 420

tagaagcctt aaaaaagaag ggttgccctc cagatgacat agaaaatccc agaggctcca 480

aagatataaa gaaaaataaa aatgtaacca accgtagcaa aggaacagca gagaagctca 540

agccagagga tattactcag atccaaccac agcagttggt tttgcgatta agatcagggg 600

agccacagac atttacatta aaattcaaga gagctgaaga ctatcccatt gacctctact 660

accttatgga cctgtcttac tcaatgaaag acgatttgga gaatgtaaaa agtcttggaa 720

cagatctgat gaatgaaatg aggaggatta cttcggactt cagaattgga tttggctcat 780

ttgtggaaaa gactgtgatg ccttacatta gcacaacacc agctaagctc aggaaccctt 840

gcacaagtga acagaactgc accagcccat ttagctacaa aaatgtgctc agtcttacta 900

ataaaggaga agtatttaat gaacttgttg gaaaacagcg catatctgga aatttggatt 960

ctccagaagg tggtttcgat gccatcatgc aagttgcagt ttgtggatca ctgattggct 1020

ggaggaatgt tacacggctg ctggtgtttt ccacagatgc cgggtttcac tttgctggag 1080

atgggaaact tggtggcatt gttttaccaa atgatggaca atgtcacctg gaaaataata 1140

tgtacacaat gagccattat tatgattatc cttctattgc tcaccttgtc cagaaactga 1200

gtgaaaataa tattcagaca atttttgcag ttactgaaga atttcagcct gtttacaagg 1260

agctgaaaaa cttgatccct aagtcagcag taggaacatt atctgcaaat tctagcaatg 1320

taattcagtt gatcattgat gcatacaatt ccctttcctc agaagtcatt ttggaaaacg 1380

gcaaattgtc agaaggcgta acaataagtt acaaatctta ctgcaagaac ggggtgaatg 1440

gaacagggga aaatggaaga aaatgttcca atatttccat tggagatgag gttcaatttg 1500

aaattagcat aacttcaaat aagtgtccaa aaaaggattc tgacagcttt aaaattaggc 1560

ctctgggctt tacggaggaa gtagaggtta ttcttcagta catctgtgaa tgtgaatgcc 1620

aaagcgaagg catccctgaa agtcccaagt gtcatgaagg aaatgggaca tttgagtgtg 1680

gcgcgtgcag gtgcaatgaa gggcgtgttg gtagacattg tgaatgcagc acagatgaag 1740

ttaacagtga agacatggat gcttactgca ggaaagaaaa cagttcagaa atctgcagta 1800

acaatggaga gtgcgtctgc ggacagtgtg tttgtaggaa gagggataat acaaatgaaa 1860

tttattctgg caaattctgc gagtgtgata atttcaactg tgatagatcc aatggcttaa 1920

tttgtggagg aaatggtgtt tgcaagtgtc gtgtgtgtga gtgcaacccc aactacactg 1980

gcagtgcatg tgactgttct ttggatacta gtacttgtga agccagcaac ggacagatct 2040

gcaatggccg gggcatctgc gagtgtggtg tctgtaagtg tacagatccg aagtttcaag 2100

ggcaaacgtg tgagatgtgt cagacctgcc ttggtgtctg tgctgagcat aaagaatgtg 2160

ttcagtgcag agccttcaat aaaggagaaa agaaagacac atgcacacag gaatgttcct 2220

attttaacat taccaaggta gaaagtcggg acaaattacc ccagccggtc caacctgatc 2280

ctgtgtccca ttgtaaggag aaggatgttg acgactgttg gttctatttt acgtattcag 2340

tgaatgggaa caacgaggtc atggttcatg ttgtggagaa tccagagtgt cccactggtc 2400

cagacatcat tccaattgta gctggtgtgg ttgctggaat tgttcttatt ggccttgcat 2460

tactgctgat atggaagctt ttaatgataa ttcatgacag aagggagttt gctaaatttg 2520

aaaaggagaa aatgaatgcc aaatgggaca cgggtgaaaa tcctatttat aagagtgccg 2580

taacaactgt ggtcaatccg aagtatgagg gaaaatgagt actgcccgtg caaatcccac 2640

aacactgaat gcaaagtagc aatttccata gtcacagtta ggtagcttta gggcaatatt 2700

gccatggttt tactcatgtg caggttttga aaatgtacaa tatgtataat ttttaaaatg 2760

ttttattatt ttgaaaataa tgttgtaatt catgccaggg actgacaaaa gacttgagac 2820

aggatggtta ctcttgtcag ctaaggtcac attgtgcctt tttgaccttt tcttcctgga 2880

ctattgaaat caagcttatt ggattaagtg atatttctat agcgattgaa agggcaatag 2940

ttaaagtaat gagcatgatg agagtttctg ttaatcatgt attaaaactg atttttagct 3000

ttacaaatat gtcagtttgc agttatgcag aatccaaagt aaatgtcctg ctagctagtt 3060

aaggattgtt ttaaatctgt tattttgcta tttgcctgtt agacatgact gatgacatat 3120

ctgaaagaca agtatgttga gagttgctgg tgtaaaatac gtttgaaata gttgatctac 3180

aaaggccatg ggaaaaattc agagagttag gaaggaaaaa ccaatagctt taaaacctgt 3240

gtgccatttt aagagttact taatgtttgg taacttttat gccttcactt tacaaattca 3300

agccttagat aaaagaaccg agcaattttc tgctaaaaag tccttgattt agcactattt 3360

acatacaggc catactttac aaagtatttg ctgaatgggg acctttttgag ttgaatttat 3420

tttattattt ttattttgtt taatgtctgg tgctttctgt cacctcttct aatcttttaa 3480

tgtatttgtt tgcaattttg gggtaagact ttttttatga gtacttttttc tttgaagttt 3540

tagcggtcaa tttgcctttt taatgaacat gtgaagttat actgtggcta tgcaacagct 3600

ctcacctacg cgagtcttac tttgagttag tgccataaca gaccactgta tgtttacttc 3660

tcaccatttg agttgcccat cttgtttcac actagtcaca ttcttgtttt aagtgccttt 3720

agttttaaca gttcactttt tacagtgcta tttactgaag ttatttatta aatatgccta 3780

aaatacttaa atcggatgtc ttgactctga tgtattttat caggttgtgt gcatgaaatt 3840

tttatagatt aaagaagttg aggaaaagca aaaaaaaaa 3879

<210> 24
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador 5`-GeneRacer para amplificar dominios variables de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 24
cgactggagc acgaggacac tga 23

<210> 25
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> RACEMOG2a: cebador 3` internoa la región de bisagra murina para amplificar dominios variables de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 25
aggacagggc ttgattgtgg g 21

<210> 26
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CKFOR: cebador 3` interno a la región CK murina para amplificar dominios variables de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 26
ctcattcctg ttgaagctct tgac 24

<210> 27
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> alpha2mAB-VL FOR: cebador para amplificar la cadenma ligera de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 27
ctggtggcca ccgccaccgg cgtgcacagc aacattgtgc tgacccaatc tc 52

<210> 28
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> alpha2mAB-VL REV: cebador para amplificar la cadena ligera de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 28
accgtacgtt ttatttccag cttggtcccc 30

<210> 29
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> alpha2mAB mAB-VH FOR: cebador para amplificar la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 29
ctggtggcca ccgccaccgg cgtgcacagc caggtccaac tgcatcagcc tg 52

<210> 30
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> alpha2mAB mAB-VH REV: cebador para amplificar la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 30
tagggccctt ggtgctggct gaggagactg tgagagtgg 39

<210> 31
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Leader FOR1-54: cebador para introducir la secuencia líder en las cadenas variables de mAb anti-alfa2-integrina

<400> 31
gctagcacca tgggctggtc ctgcatcatc ctgtttctgg tggccaccgc cacc 54

<210> 32
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Leader FOR1-23: cebador para introducir la secuencia líder en las cadenas variables del mAb anti-alfa2-integrina

<400> 32
caagctagca ccatgggctg gtcctg 26

<210> 33
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC1: Dominio variable de la cadena ligera de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes

<400> 33

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

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

Pro Val Gln Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 34
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC2: Dominio variable de la cadena ligera de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes

<400> 34

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Gln Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 35
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC3: Dominio variable de la cadena ligera de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes y estabilizantes

<400> 35

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 36
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC4: Dominio variable de la cadena ligera de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes y estabilizantes

<400> 36

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 37
<211> 111

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> LC5: Dominio variable de la cadena ligera de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones injertadas

<400> 37

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

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 38
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC1: Dominio variable de la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Val Ser
115

<210> 39
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC2: Dominio variable de la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Val Ser
115

<210> 40
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC3: Dominio variable de la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes y estabilizantes

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Val Ser
115

<210> 41
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC4: Dominio variable de la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes y estabilizantes

<400> 41

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

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

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

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

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

Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Lys Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Leu Thr Val Val Ser
115

<210> 42
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC5: Dominio variable de la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes y estabilizantes

<400> 42

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Val Ser
115

<210> 43
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencioa artificial

<220>
<223> HC6: Dominio variable de la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones humanizantes y estabilizantes

<400> 43

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

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

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

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

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

Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Lys Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Leu Thr Val Val Ser
115

<210> 44
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HC7: Dominio variable de la cadena pesada de mAb anti-alfa2-integrina con mutaciones injertadas

<400> 44

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Lys Val Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 45
<211> 717
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 45
atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt 60

aacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 120

atatcctgca gagccagtga aagtgttgag agttatggca acagttttat ttactggtac 180

cagcagaaac caggacaggc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccaa cctagcatct 240

ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattgat 300

cctgtggagg ctgatgatgc tgcaacctat tactgtcagc aaaataatga ggatccgtac 360

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 420

atcttcccac catccagtga gcagttaaca tctggaggtg cctcagtcgt gtgcttcttg 480

aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaaga ttgatggcag tgaacgacaa 540

aatggcgtcc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc 600

agcaccctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660

actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgctag 717

<210> 46
<211> 1401
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 46
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ccacaggtgt ccactcccag 60

gtccaactgc atcagcctgg ggctgaactt gtgaagcctg gggctccagt gaagctgtcc 120

tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc tactggatga actgggtgaa gcagaggcct 180

ggacgaggcc tcgagtggat tggcaggatt gatccttccg atagtgaaac tcactacaat 240

caaaagttca aggacaaggc cacactgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatc 300

caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaaa ggtgggacgg 360

gggtactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcagc taaaacaaca 420

gccccatcgg tctatccact ggcccctgtg tgtggagata caactggctc ctcggtgact 480

ctaggatgcc tggtcaaggg ttatttccct gagccagtga ccttgacctg gaactctgga 540

tccctgtcca gtggtgtgca caccttccca gctgtcctgc agtctgacct ctacaccctc 600

agcagctcag tgactgtaac ctcgagcacc tggcccagcc agtccatcac ctgcaatgtg 660

gcccacccgg caagcagcac caaggtggac aagaaaattg agcccagagg gcccacaatc 720

aagccctgtc ctccatgcaa atgcccagca cctaacctct tgggtggacc atccgtcttc 780

atcttccctc caaagatcaa ggatgtactc atgatctccc tgagccccat agtcacatgt 840

gtggtggtgg atgtgagcga ggatgaccca gatgtccaga tcagctggtt tgtgaacaac 900

gtggaagtac acacagctca gacacaaacc catagagagg attacaacag tactctccgg 960

gtggtcagtg ccctccccat ccagcaccag gactggatga gtggcaagga gttcaaatgc 1020

aaggtcaaca acaaagacct cccagcgccc atcgagagaa ccatctcaaa acccaaaggg 1080

tcagtaagag ctccacaggt atatgtcttg cctccaccag aagaagagat gactaagaaa 1140

caggtcactc tgacctgcat ggtcacagac ttcatgcctg aagacattta cgtggagtgg 1200

accaacaacg ggaaaacaga gctaaactac aagaacactg aaccagtcct ggactctgat 1260

ggttcttact tcatgtacag caagctgaga gtggaaaaga agaactgggt ggaaagaaat 1320

agctactcct gttcagtggt ccacgagggt ctgcacaatc accacacgac taagagcttc 1380

tcccggactc ccgggaagtg a 1401

<210> 47
<211> 218
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 47

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
115 120 125

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
145 150 155 160

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
180 185 190

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
195 200 205

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 48
<211> 447
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 48

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys
130 135 140

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

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

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp
180 185 190

Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser
245 250 255

Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp
260 265 270

Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln
275 280 285

Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser
290 295 300

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro
340 345 350

Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met
355 360 365

Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn
370 375 380

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

Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn
405 410 415

Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu
420 425 430

His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 49
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IGLKV79_IGLKJ2

<400> 49

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

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Phe Leu
20 25 30

Gly Ile Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Asn Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 50
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IGHV11_IGHD33_IGHJ8

<400> 50

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 51
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Vk1LC

<400> 51

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

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

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

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

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

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

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

<210> 52
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Vh1b

<400> 52

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Trp Gly Tyr Asp Tyr Asp Val Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53
<211> 213
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> dominio variable de la cadena ligera del mAb anti-integrina 2

<400> 53

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 54
<211> 445
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> dominio variable de la cadena pesada del mAb anti-integrina 2

<400> 54

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

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

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

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
8 March 2012 (08.03.2012)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2012/028622 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2011/064926

(22) International Filing Date:
30 August 2011 (30.08.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
10305929.1 31 August 2010 (31.08.2010) EP

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **SANOFI** [FR/FR]; Sanofi-Aventis, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **CORVEY, Carsten** [DE/DE]; c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). **BLUM, Horst** [DE/DE]; c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). **CAMERON, Béatrice** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **DABDOUBI, Tarik** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **DECARY, Stephanie** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **BAURIN, Nicolas** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **PAPIN, David** [FR/FR]; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR). **LANGE, Christian** [DE/DE]; c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE).

(74) Agent: **SCHNEIDER, Rudolf**; c/o Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

— *of inventorship (Rule 4.17(iv))*

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) **Title**: PEPTIDE OR PEPTIDE COMPLEX BINDING TO 2 INTEGRIN AND METHODS AND USES INVOLVING THE SAME

(57) **Abstract**: The present invention relates to a peptide or peptide complex binding to α2 integrin, to one or more nucleic acid(s) coding for the peptide or peptide complex, a recombinant cell producing the peptide or peptide complex, a method for producing the peptide or peptide complex, a pharmaceutical composition comprising the peptide or peptide complex or the nucleic acid(s)for use as a medicament, a method for detecting α2 integrin and a screening method.

WO 2012/028622 A2

PEPTIDE OR PEPTIDE COMPLEX BINDING TO α2 INTEGRIN AND METHODS AND USES INVOLVING THE SAME

The present invention relates to a peptide or peptide complex binding to α2 integrin for use in the treatment, prophylaxis or diagnosis, to one or more nucleic acid(s) coding for the peptide or peptide complex, a recombinant cell producing the peptide or peptide complex, a method for producing the peptide or peptide complex, a pharmaceutical composition comprising the peptide or peptide complex or the nucleic acid(s) for use as a medicament, a method for detecting α2 integrin and a screening method.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Integrins are transmembrane proteins that mediate interactions between adhesion molecules on adjacent cells and/or the extracellular matrix (ECM). Integrins play diverse roles in several biological processes including cell migration during development and wound healing, cell differentiation and apoptosis. Their activities can also regulate the metastatic and invasive potential of tumor cells. They exist as heterodimers consisting of α and β subunits. Some α and β subunits exhibit specificity for one another and may be designated as a VLA (very late antigen) member. Heterodimers often preferentially bind certain cell adhesion molecules, or constituents of the ECM. Although they have no catalytic activity, integrins can be part of multimolecular signaling complexes known as focal adhesions.

Upon binding to ligands, integrins transduce intracellular signals to the cytoskeleton that modify cellular activity in response to these cellular adhesion events, referred to as outside-in signaling. Such signaling can also activate other integrin subtypes expressed on the same cell, referred to as inside-out signaling. Inside-out signaling further occurs via regulatory signals that originate within cell cytoplasm such as a disruption of the clasp between an α and β subunit, which are then transmitted to the external ligand-binding domain of the receptor. Integrins can play important roles in the cell adhesion events that control development, organ morphogenesis, physiology and pathology as well as normal tissue homeostasis, and immune and thrombotic responses, and in addition, they serve as environmental sensors for the cell.

One of the integrin heterodimers is α2β1 integrin. The α2β1 integrin is expressed on several different cell types, including endothelial and epithelial cells, fibroblasts, lymphocytes, and platelets. The ligand specificity of α2β1 varies with cell type. While it serves as a collagen receptor on platelets and fibroblasts, it can serve as both a collagen and as a laminin receptor on endothelial and epithelial cells.

α2β1 integrin is a molecule composed of an α2 integrin subunit of the family of α integrins, and a β1 integrin subunit from the family of β integrins. The sequences of α2 and β1 integrin are known in the art and are published, e.g. in Takada and Hemler J. Cell Biol. 109(1):397-407, 1989 and Argraves, W.S, J. Cell. Biol. Sep 105(3): 1183-90 (1987). Example sequences are denoted in Figure 9 and further sequences can be retrieved from the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) data base, e.g. under NCBI accession Numbers NP_002194 NM_002203, NM_002211, NP_002202 (β 1 integrin isoform 1A) for homo sapiens α 2 and β 1 integrin, see also below.

Alternative splice variants, isoforms are known in the art, as well as sequences of non-human origin (such as rodent – mouse, rat, etc – simian or other) and represent possible alternative embodiments as long as they exhibit at least one of the known functions of α2 or β1 integrin.

The α2 subunit is a member of a subset of integrin α subunits that contain an approximately 200 amino acid domain located near the amino terminus often referred to as the I (or inserted) domain. Many I domains, including the $\alpha_2$and integrin subunit I domain, contain an additional cation binding site, the metal ion-dependent adhesion site (MIDAS) motif. The structural characterisation of the α2 integrin I domain is published, e.g. in Dickeson et. al., J. Biol. Chemistry, 272, 7661-7668 (1997). I domains are important determinants in ligand binding. The amino acid sequence of a human α2 integrin I domain can be gained from Figure 9, as marked in the α2 integrin sequence (SEQ ID 20).

The α2β1 integrin (very late antigen 2; VLA-2) is expressed on a variety of cell types including platelets, vascular endothelial cells, epithelial cells, activated monocytes/macrophages,

fibroblasts, leukocytes, lymphocytes, activated neutrophils and mast cells. The natural ligands for α2β1 include collagen and laminin, both of which are found in extracellular matrix. The α2β1 integrin has been implicated in several biological and pathological processes including collagen-induced platelet aggregation, cell migration on collagen, cell-dependent reorganization of collagen fibers as well as collagen-dependent cellular responses that result in increases in cytokine expression and proliferation, aspects of T-cell, mast cell, and neutrophil function, aspects of delayed type hypersensitivity contact hypersensitivity and collagen-induced arthritis, mammary gland ductal morphogenesis, epidermal wound healing, and processes associated with VEGF-induced angiogenesis.

Platelets normally circulate in the blood in an inactive resting state, however, they are primed to respond rapidly at sites of injury to a wide variety of agonists. Upon stimulation, they undergo shape changes and become highly reactive with plasma proteins, such as fibrinogen and von Willebrand factor (vWf), other platelets, and the endothelial lining of the vessel wall. These interactions all cooperate to facilitate the rapid formation of a hemostatic fibrin platelet plug (Cramer, 2002 in Hemostasis and Thrombosis, 4th edition). Upon binding ligand, platelet receptors transduce outside-in signal pathways which in turn, trigger inside-out signaling that results in activation of secondary receptors such as the platelet fibrinogen receptor, αIIbβ3 integrin, leading to platelet aggregation. Even minor activation of platelets can result in platelet thrombotic responses, thrombocytopenia and bleeding complications.

α2 integrin is the only collagen-binding integrin expressed on platelets and has been implicated to play some role in platelet adhesion to collagen and hemostasis (Santoro et al., Thromb. Haemost. 74:813-821 (1995); Vanhoorelbeke et al., Curr Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord. 3(2): 125-40 (2003); Sarratt et al., Blood 106(4): 1268-1277 (2005)). Therefore, the inactivation of alpha 2 integrin function would be desirable in order to negatively interfere with platelet agreggation. One such kind of inhibition would e.g. be an allosteric inhibition that locks the integrin in the inactive state.

Integrin/ligand interactions can facilitate leukocyte extravasations into inflamed tissues (Jackson et al., J. Med. Chem. 40:3359-3368 (1997); Gadek et al., Science 295(5557):1086-9 (2002), Sircar et al., Bioorg. Med. Chem. 10:2051-2066 (2002)), and play a role in downstream events

following the initial extravasations of leukocytes from the circulation into tissues in response to inflammatory stimuli, including migration, recruitment and activation of pro-inflammatory cells at the site of inflammation (Eble J. A., Curr Pharm Des. 11(7):867-880 (2005)).

Blocking of α2 integrin has been reported to show impact on delayed hypersensitivity responses and efficacy in a murine model of rheumatoid arthritis and a model of inflammatory bowel disease (Kriegelstein et al., J. Clin. Invest. 110(12):1773-82 (2002); de Fougerolles et al., J. Clin. Invest. 105:721-720 (2000) and attenuate endothelial cell proliferation and migration *in vitro* (Senger et al., Am. J. Pathol. 160(1):195-204 (2002), suggesting that the blocking of α2 integrin might prevent/inhibit abnormal or higher than normal angiogenesis, as observed in various cancers. Furthermore, in a rat colorectal cancer surgery model α2-integrin inhibition was shown to be an effective anti-metastatic (van der Bji et al, Hepatology 47(2): 532-543 (2008)). Lineage commitment of colorectal cancer cells could also be shifted away from malignant phenotype (Kirkland et al J Biol Chem 283(41): 27612-27619 (2008)). As α 2 integrin was shown to mediate the malignant phenotype in pancreatic cancer (Grzesiak and Bouvet, Br J Cancer 94: 1311-1319 (2006) validating this target for a therapeutic approach in this type of aggressive cancer. Moreover, α2β1 integrin is interacting with glycosphingolipids in the progression of prostate cancer suggesting that blockade of this interaction will be of therapeutic use for this type of cancer (van Slambrouck et al., Int J Onco 35: 693-699 (2009). In experimental autoimmune encephalitis (EAE), a murine model of multiple sclerosis (MS), α 2 integrin seems to play an important role as treatment with an anti-α2 antibody, given immediately after the onset of the disease, suppressed clinical signs and inflammation of the CNS (Tsunoda et al Brain Pathol 17:45-55 (2007). The mechanism of this therapeutically beneficial action of the anti-α2 antibody is most likely due to the inhibition of the interaction of α2β1 integrin with C1q complement protein. This interaction is a first step in mast-cell-degranulation and mast-cell activation, which is involved in autoimmune and inflammatory diseases, like MS, systemic lupus erythematosus, glomerolonephritis (McCall-Culbreath et al Blood 111(3562-3570) 2008).

Thus, α2 integrin is an interesting medical target. As integrins are difficult targets for the development of specific inhibitors, and in view of the many different possible therapeutic indications, there is a need for alternative inhibitors binding to α2 integrin, especially inhibitors

of alpha 2 integrin exhibiting somewhat different properties when compared with existing α2 integrin inhibitors, which can be used in the treatment of α2 integrin-associated disorders.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a α2 integrin antibodies, antigen binding fragments and other binding molecules for use in the treatment, prophylaxis or diagnosis, to one or more nucleic acid(s) coding for the binding molecule, a recombinant cell producing the binding molecule, a method for producing the binding molecule, a pharmaceutical composition comprising the binding molecule or the nucleic acid(s) for use as a medicament, a method for detecting α2 integrin and a screening method.

To this end, a monoclonal antibody against α2 integrin has been generated and tested for its characteristics. It provides for the advantageous characteristics as described in the examples. Particularly, the anti-α2 integrin antibody and monovalent fragments or derivatives thereof have been characterized by a set of experimental data including binding constants, cross-reactivity, domain mapping and *in vitro* functional data.

It has been found that the monoclonal antibody (mAb) binds to the I-domain of α2-integrin with nM affinities, wherein the binding obviously occurs at an epitope within the I domain that is different from the epitope bound by a comparator antibody of the state of the art that also targets the alpha 2 integrin I domain. All engineered molecules of the antibody according to present invention (IgG4 mAb, Fab) show comparable on- and off-rates in Biacore experiments. They display cross-reactivity to primate α2β1 integrin, whereas no cross-reactivity has been detected against mouse, rat, dog, guinea pig, pig or rabbit α2β1 integrin as tested with platelets from the relevant species.

The tested molecules inhibit the interaction of recombinant α2 integrin with collagen *in vitro* with low nM IC_{50} values. In addition to the inhibition of collagen, the anti-α2β1 integrin mAB or Fab fragments are able to inhibit platelet adhesion to collagen both in isolated human platelets and human platelet-rich plasma under static conditions. They are also able to inhibit the

thrombus formation under flow on a collagen coated surface. The ability to block collagen binding and thus preventing platelet adhesion to collagen is one of the earliest steps in thrombus formation.

Finally, the mAb or Fabs did not cause platelet activation as no increase in GPIIbIIIa activation or P-selectin surface expression observed in ~30 donors for the mAb. Accordingly, the present invention provides monovalent antibodies, antibody fragments or derivatives and their uses to manufacture research, diagnostic and therapeutic agents for the treatment of α2-integrin related disorders as listed below; specific examples include thrombosis, other vascular diseases, cancer and pathological consequences of neo-angiogenesis, auto-inflammatory diseases such as multiple sclerosis.

As known to the skilled person, binding characteristics of antibodies are mediated by the variable domains. For binding to an antigen, a variable domain from the heavy chain and a co-acting variable domain from the light chain are usually present in antibodies and arranged in order to allow for the co-action. The variable domain is also referred to as the FV region. More specifically, variable loops, three each on the light (VL) and heavy (VH) chain, are responsible for binding to the antigen. These loops are referred to as the Complementarity Determining Regions (CDRs), LCDR1, LCDR2 and LCDR3 for VL and HCDR1, HCDR2 and HCDR3 for VH. A variety of different arrangements of variable domain from the heavy chain and a co-acting variable domain from the light chain are known in the art. Therefore, it was important to identify one or more suitable variable domains from the heavy chain and one or more co-acting variable domains from the light chain. By sequence alignment, the CDRs of the heavy and light chains have been identified for the α2 integrin antibody specified above.

In a first aspect, present invention relates to a peptide or peptide complex, preferably an isolated monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof, wherein said peptide or peptide complex, antibody or fragment specifically binds to the I-domain of a human α2-integrin, said antibody or fragment comprising a heavy chain variable region (VH) domain and a light chain variable region (VL) domain, wherein said antibody or fragment cross-reacts with a non-human primate α2-integrin but does not cross-react with a non-primate α2-integrin.

In a second aspect, present inventin relates to a peptide or peptide complex, preferably an isolated monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof, wherein said peptide or peptide complex, antibody or fragment specifically binds to the I-domain of a human α2-integrin, said antibody comprising a heavy chain variable region (VH) domain and a light chain variable region (VL) domain, wherein said antibody or fragment competes with a reference antibody for binding to the epitope of the reference antibody, said reference antibody comprising a light chain encoded by the plasmid as deposited with the DSMZ under accession No. DSM 23944 and a heavy chain encoded by either (i) the plasmid as deposited with the DSMZ under accession DSM 23946 or (ii) the plasmid as deposited with the DSMZ under accession No. DSM 23945.

In a third aspect the present invention relates to a peptide or peptide complex comprising one or more of the following components a to f:

(a) LCDR1, wherein LDR1 is RASESVESYGNSFIY (SEQ ID NO:6) or a functionally active variant thereof,

(b) LCDR2, wherein LDR2 is LASNLAS (SEQ ID NO:7) or a functionally active variant thereof,

(c) LCDR3, wherein LDR3 is QQNNEDPYT (SEQ ID NO:8) or a functional active variant thereof,

(d) HCDR1, wherein HDR1 is (GYTFTSYWMN, SEQ ID NO:3) or a functionally active variant thereof,

(e) HCDR2, wherein HDR2 is RIDPSDSETHYNQKFK (SEQ ID NO:4) or a functionally active variant thereof, and

(f) HCDR3, wherein HDR3 is VGRGYFDY (SEQ ID NO:5) or a functional active variant thereof,

and wherein the one or more of the components a) to f) are arranged to allow for binding of the peptide or peptide complex to α2 integrin.

In a fourth aspect, present invention relates to the above peptide or peptide complex for use in the treatment, prophylaxis or diagnosis of an α 2- integrin –related disorder or disease.

In a fifth aspect, present invention relates to one or more nucleic acid(s) coding for the peptide or peptide complex of present invention.

In a sixth aspect, present invention relates to a cell heterologously expressing one of the nucleic acids of present invention.

In a seventh aspect, present invention relates to a method for producing a peptide or peptide complex of present invention comprising culturing the cell according to present invention under conditions permitting expression of the peptide or peptide complex and optionally recovering the peptide or peptide complex from the host cell.

In an eighth aspect, present invention relates to a pharmaceutical composition comprising at least one peptide or peptide complex of present invention and/or at least one nucleic acid of present invention for use as a medicament.

In a ninth aspect, present invention relates to a method of diagnosing a disease associated with altered α2 integrin, the method comprising

a) contacting a sample comprising α2 integrin with the peptide or peptide complex of any of claims 1 to 3; and

b) detecting binding of α2 integrin to the peptide or peptide complex; and

c) comparing the binding of step b) with a reference,

wherein a altered α2 integrin binding in the sample relative to the reference is indicative of the disease.

In a tenth aspect, present invention relates to an article of manufacture comprising

a) a packaging material,

b) a peptide or peptide complex according to one of the claims 1-3 or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

c) a label or a package insert, the insert contained within said packaging material, indicating that said peptide or peptide complex is effective for treatment of a disease or disorder, especially an α 2 integrin-related disease disorder.

In a eleventh aspect, present invention relates to a diagnostic kit for the diagnosis of an α 2-integrin related disorder or disease comprising a peptide or peptide complex of present invention and a suitable packaging, and possibly suitable instructions for using said peptide or peptide complex in the detection of α 2 integrin.

In a twelveth aspect, present invention relates to a method of treatment or diagnosis of an α 2 integrin-related disorder or disease using one or more peptide or peptide complexes of present invention and/or one or more nucleic acids of present invention or one of the pharmaceutical compositions of present invention.

In an thirteenth aspect, present invention relates to a method of diagnosing a disease associated with altered α2 integrin, the method comprising

a) contacting a taken sample of an individual with the peptide or peptide complex of present invention; and

b) detecting binding of α2 integrin to the peptide or peptide complex; and

c) comparing the binding of step b) with the binding of α2 integrin to the peptide or peptide complex in one or more reference samples,

wherein an altered binding in the taken sample relative to the binding detected in the one or more reference samples is indicative of the disease.

In certain embodiments, the present invention relates to an isolated monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof, wherein said antibody or fragment specifically binds to the I-domain of a human α2-integrin, said antibody or fragment comprising a heavy chain variable region (VH) domain and a light chain variable region (VL) domain, wherein said antibody or fragment cross-reacts with a non-human primate α2-integrin but does not cross-react with a non-primate α2-integrin.

In other embodiments, the present invention relates to an isolated monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof, wherein said antibody or fragment specifically binds to the I-domain of a human α2-integrin, said antibody comprising a heavy chain variable region (VH)

domain and a light chain variable region (VL) domain, wherein said antibody or fragment competes with a reference antibody for binding to the epitope of the reference antibody, said reference antibody comprising a light chain encoded by the plasmid as deposited with the DSMZ under accession No. DSM 23944 and a heavy chain encoded by either (i) the plasmid as deposited with the DSMZ under accession DSM 23946 or (ii) the plasmid as deposited with the DSMZ under accession No. DSM 23945.

In one embodiment, said antibody or fragment specifically binds to the I-domain of the human α2-integrin with nM binding affinity. In another embodiment, said antibody or fragment inhibits the interaction of the human α2-integrin with collagen *in vitro*, thereby inhibiting the activation of platelets due to adhesion of said platelets to said collagen.

In one embodiment, said heavy chain variable region domain comprising the heavy chain HCDR3 of SEQ ID NO:5. In another embodiment, said heavy chain variable region domain comprises the heavy chain CDRs of SEQ ID NO:3 (HCDR1), SEQ ID NO:4 (HCDR2), and SEQ ID NO:5 (HCDR3), or functionally active variants thereof. In one embodiment, the functionally active variant of HCDR2 comprises the mutation Asp→Glu at amino acid position 6.

In one embodiment, the light chain variable region domain comprises the light chain LCDR3 of SEQ ID NO:8. In another embodiment, the light chain variable region domain comprises the light chain CDRs of SEQ ID NO:6 (LCDR1), SEQ ID NO:7 (LCDR2), and SEQ ID NO:8 (LCDR3), or functionally active variants thereof. In one embodiment, the functionally active variant of LCDR1 comprises the mutation Asn→Gln at amino acid position 11.

In one embodiment, the heavy chain variable region (VH) domain has at least 90%, 95%, 97% or 99% sequence identity to the VH sequence of SEQ ID NO: 2. In another embodiment, said heavy chain variable region (VH) domain comprises the sequence of SEQ ID NO:2 or a functionally active thereof.

In one embodiment, the light chain variable region (VL) domain has at least 90%, 95%, 97% or 99% sequence identity to the VL sequence of SEQ ID NO: 1. In another embodiment, said light chain variable region (VL) domain comprises the sequence of SEQ ID NO:1 or a functionally active thereof.

In one embodiment, the heavy chain variable region (VH) domain comprises one or more amino acid substitutions at positions selected from the group consisting of H5, H7, H11, H12, H17, H20, H38, H40, H43, H55, H61, H65, H66, H67, H76, H81, H82, H87, H91, H93, H112, H113 and H116. In one embodiment, the one or more amino acid subsitutions are selected from the group consisting 5His→Val, 7Pro→Ser, 11Leu→Val, 12Val→Lys, 17Pro→Ser, 20Leu→Val, 38Lys→Arg, 40Arg→Ala, 43Arg→Gln, 55Asp→Glu, 61Asn→Ala, 65Lys→Gln, 66Asp→Gly, 67Lys→Arg, 76Ser→Thr, 81Ile→Met, 82Gln→Glu, 87Thr→Arg, 91Ser→Thr, 93Val→Lys, 112Thr→Leu, 113Leu→Val and 116Ser→Val.

In one embodiment, the light chain variable region (VL) domain comprises one or more amino acid substitutions at positions selected from the group consisting of L9, L12, L15, L22, L34, L46, L47, L80, L83, L85, L87, and L89. In one embodiment, the one or more amino acid subsitutions are selected from the group consisting of 9Ala→Ser, 12Ala→Ser, 15Leu→Val, 15Leu→Pro, 22Ser→Thr, 34Asn→Gln, 46Gln→Lys, 47Ala→Pro, 80Asp→Asn, 83Glu→Gln, 85Asp→Glu, 87Ala→Thr and 89Thr→Asn.

In one embodiment, the heavy chain variable region (VH) domain has at least 90%, 95%, 97% or 99% sequence identity to a VH sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 38 (HC1), SEQ ID NO:39 (HC2), SEQ ID NO:40 (HC3), SEQ ID NO:41 (HC4), SEQ ID NO:42 (HC5), SEQ ID NO:43 (HC6), and SEQ ID NO:44 (HC7). In another embodiment, the heavy chain variable region (VH) domain comprises a VH sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 38 (HC1), SEQ ID NO:39 (HC2), SEQ ID NO:40 (HC3), SEQ ID NO:41 (HC4), SEQ ID NO:42 (HC5), SEQ ID NO:43 (HC6), and SEQ ID NO:44 (HC7).

In one embodiment, the light chain variable region (VL) domain has at least 90%, 95%, 97% or 99% sequence identity to a VL sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 33 (LC1), SEQ ID NO:34 (LC2), SEQ ID NO:35 (LC3), SEQ ID NO:36 (LC4), and SEQ ID NO:37 (LC5). In another embodiment, the light chain variable region (VL) domain comprises a VL sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 33 (LC1), SEQ ID NO:34 (LC2), SEQ ID NO:35 (LC3), SEQ ID NO:36 (LC4), and SEQ ID NO:37 (LC5).

In one embodiment, the antibody or binding portion is a chimeric antibody or humanized antibody. In another embodiment, the antigen binding portion is selected from the group consisting of a Fab, a Fab', a F(ab')2, a Fv, a disulfide linked Fv, a scFv, and a $(scFv)_2$. In another embodiment, the antibody or binding portion is selected from the group consisting of a multispecific antibody, a dual specific antibody, a isotype antibody, a dual variable domain antibody and a bispecific antibody. In another embodiment, the antiboyd or binding portion comprises a heavy chain immunoglobulin constant domain selected from the group consisting of: a human IgM constant domain, a human IgGl constant domain, a human IgG2 constant domain, a human IgG3 constant domain, domain, a human IgG4 constant domain, a human IgE constant domain, and a human IgA constant domain. In one embodiment, the antibody or binding portion comprises a human IgG4 constant domain.

In another aspect, the invention provides a nucleic acid encoding the amino acid sequence of the antibody or antigen binding portion of the invention. In another aspect, the invention provides a recombinant expression vector comprising the nucleic acid. In another aspect, the invention provdes a host cell comprising the recombinant expression vector. In another aspect, the invention provdes a method of producing the antibody or antigen binding fragment comprising culturing the host cell under conditions such that an antibody is produced by the host cell.

In another aspect, the invention provides a pharmaceutical composition comprising the antibody, or antigen binding portion and one or more pharmaceutically acceptable carriers. In another aspect, the invention provides a method of treating, preventing or diagnosing an α 2- integrin – related disorder or disease, the method comprising administering to a subject in need of thereof

the pharmaceutical composition. In one embodiment, the α2 integrin-related disease or disorder is selected from the group consisting of thrombosis, a vascular disease, cancer, including neo-angiogenesis and metastasis, inflammation, inflammatory disease, autoimmune disease and a disease characterized by abnormal or increase angiogenesis, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, reactions to transplant, optical neuritis, spinal cord trauma, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus (SLE), ,multiple sclerosis, Reynaud's syndrome, experimental autoimmune encephalomyelitis, Sjorgen's syndrome, scleroderma, cardiovascular disease, psoriasis, and infections that induce an inflammatory response. In another embodiment, the α2 integrin-related disease or disorder is selected from the group consisting of acute coronary syndrome, percutaneous coronary intervention, ischemic stroke, carotid artery stenosis or peripheral arterial occlusive disease.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions

Before the present invention is described in detail below, it is to be understood that this invention is not limited to the particular methodology, protocols and reagents described herein as these may vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments only, and is not intended to limit the scope of the present invention which will be limited only by the appended claims. Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs.

Preferably, the terms used herein are defined as described in "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. and Kölbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland).

Throughout this specification and the claims which follow, unless the context requires otherwise, the word "comprise", and variations such as "comprises" and "comprising", will be understood to imply the inclusion of a stated integer or step or group of integers or steps but not the exclusion of any other integer or step or group of integer or step.

Several documents (for example: patents, patent applications, scientific publications, manufacturer's specifications, instructions, GenBank Accession Number sequence submissions etc.) are cited throughout the text of this specification. Nothing herein is to be construed as an admission that the invention is not entitled to antedate such disclosure by virtue of prior invention. Some of the documents cited herein are characterized as being *"incorporated by reference"*. In the event of a conflict between the definitions or teachings of such incorporated references and definitions or teachings recited in the present specification, the text of the present specification takes precedence.

Sequences: All sequences referred to herein are disclosed in the attached sequence listing that, with its whole content and disclosure, is a part of this specification.

The term "about" when used in connection with a numerical value is meant to encompass numerical values within a range having a lower limit that is 5% smaller than the indicated numerical value and having an upper limit that is 5% larger than the indicated numerical value.

The term "alpha 2 integrin" or "a2 integrin" as used herein, refers to alpha 2 integrin as known in the art, preferably human alpha 2 integrin and especially human alpha 2 integrin having the nucleic acid sequence shown in SEQ ID NO: 21 and the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20, or a biologically active fragment thereof. The term "I domain" refers to the part of alpha 2 integrin as underlined and bold-typed in SEQ ID NO:20.

The terms "specifically binds", "specific binding" or the like, mean that the peptide or peptide complex, e.g. an antibody or antigen-binding fragment thereof forms a complex with an antigen that is relatively stable under physiologic conditions. Specific binding can be characterized by an equilibrium dissociation constant of at least about $1x10^{-6}$ M or less (e.g., a smaller K_D denotes a tighter binding). Methods for determining whether two molecules specifically bind are well known in the art and include, for example, equilibrium dialysis, surface plasmon resonance, and the like. An isolated antibody that specifically binds alpha 2 integrin may, however, exhibit cross-reactivity to other antigens such as alpha 2 integrin molecules from other species. For example, in certain embodiments, the α2 integrin-specific antibodies of the invention bind to bind to both human and non-human primate α2 integrin with an affinity that is at least two-fold regater than its affinity for a non-specific antigen (e.g., a non-primate α2 integrin). Moreover, multi-specific antibodies (e.g., bispecifics) that bind to alpha 2 integrin and one or more additional antigens are nonetheless considered antibodies that "specifically bind" alpha 2 integrin, as used herein.

The term "K_D ", as used herein, is intended to refer to the equilibrium dissociation constant of a particular peptide/peptide-complex – target molecule or antibody-antigen interaction. The equilibrium dissociation constant is typically measured in "mol/L" (abbreviated as "M").

By the term “slow off rate”, “Koff” or “kd” is meant a peptide/peptide complex or antibody that dissociates from alpha 2 integrin with a rate constant of 1 x 10^{-3} s^{-1} or less, preferably 1 x 10^{-4} s^{-1} or less, as determined by surface plasmon resonance, e.g., BIACORE™.

The term “high affinity” antibody refers to those mAbs having a binding affinity to human alpha 2 integrin of at least 10^{-10} M; preferably 10^{-11} M; even more preferably 10^{-12} M, as measured by surface plasmon resonance, e.g., BIACORE™ or solution-affinity ELISA.

The term "surface plasmon resonance", as used herein, refers to an optical phenomenon that allows for the analysis of real-time biospecific interactions by detection of alterations in protein concentrations within a biosensor matrix, for example using the BIACORE™ system (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.).

An “epitope”, also known as antigenic determinant, is the region of an antigen that is recognized by the immune system, specifically by antibodies, B cells, or T cells. As used herein, an “epitope” is the part of an antigen capable of binding to an antibody or antigen-binding fragment thereof as described herein. In this context, the term “binding” preferably relates to a “specific binding”, as defined herein. Epitopes usually consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids, sugar side chains, phosphoryl groups, or sulfonyl groups and may have specific three-dimensional structural characteristics and/or specific charge characteristics. Conformational and non-conformational epitopes can be distinguished in that the binding to the former but not the latter is lost in the presence of denaturing solvents.

A “paratope” is the part of an antibody that specifically binds to the epitope.

The term "antibody", as used herein, is intended to refer to immunoglobulin molecules comprised of four polypeptide chains, two heavy (H) chains and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds. The term “antibody” also includes all recombinant forms of antibodies, in particular of the antibodies described herein, e.g. antibodies expressed in prokaryotes, unglycosylated antibodies, and any antigen-binding antibody fragments and derivatives as described below. Each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region

("HCVR" or "VH") and a heavy chain constant region (comprised of domains CH1, CH2 and CH3). Each light chain is comprised of a light chain variable region ("LCVR or "VL") and a light chain constant region (CL). The VH and VL regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity determining regions (CDR), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each VH and VL is composed of three CDRs and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. The variable regions of the heavy and light chains contain a binding domain that interacts with an antigen. The constant regions of the antibodies may mediate the binding of the immunoglobulin to host tissues or factors, including various cells of the immune system (e.g., effector cells) and the first component (C1q) of the classical complement system.

With respect to the present invention, the terms alpha2 antibody, a2 antibody, α2 antibody, alpha2 integrin antibody, a2 integrin antibody, α2 integrin antibody are used synonymously and refer preferably to an inhibitory, i.e. anti- (alpha2 antibody, a2 antibody, α2 antibody, alpha2 integrin antibody, a2 integrin antibody, α2 integrin antibody).

Substitution of one or more CDR residues or omission of one or more CDRs is also possible. Antibodies have been described in the scientific literature in which one or two CDRs can be dispensed with for binding. Padlan et al. (1995 FASEB J. 9:133-139) analyzed the contact regions between antibodies and their antigens, based on published crystal structures, and concluded that only about one fifth to one third of CDR residues actually contact the antigen. Padlan also found many antibodies in which one or two CDRs had no amino acids in contact with an antigen (see also, Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320:415-428).

CDR residues not contacting antigen can be identified based on previous studies (for example residues H60-H65 in CDRH2 are often not required), from regions of Kabat CDRs lying outside Chothia CDRs, by molecular modeling and/or empirically. If a CDR or residue(s) thereof is omitted, it is usually substituted with an amino acid occupying the corresponding position in another human antibody sequence or a consensus of such sequences. Positions for substitution

within CDRs and amino acids to substitute can also be selected empirically. Empirical substitutions can be conservative or non-conservative substitutions.

The term "antigen-binding fragment" of an antibody (or simply "binding portion"), as used herein, refers to one or more fragments of an antibody that retain the ability to specifically bind to alpha 2 integrin. It has been shown that the antigen-binding function of an antibody can be performed by fragments of a full-length antibody. Examples of binding fragments encompassed within the term "antigen-binding fragment" of an antibody include (i) Fab fragments, monovalent fragments consisting of the VL, VH, CL and CH domains; (ii) $F(ab')_2$ fragments, bivalent fragments comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) Fd fragments consisting of the VH and CH domains; (iv) Fv fragments consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody, (v) dAb fragments (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), which consist of a VH domain; (vi) isolated complementarity determining regions (CDR), and (vii) combinations of two or more isolated CDRs which may optionally be joined by a synthetic linker. Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, VL and VH, are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the VL and VH regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); see e.g., Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; and Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term "antigen-binding fragment" of an antibody. A further example is a binding-domain immunoglobulin fusion protein comprising (i) a binding domain polypeptide that is fused to an immunoglobulin hinge region polypeptide, (ii) an immunoglobulin heavy chain CH2 constant region fused to the hinge region, and (iii) an immunoglobulin heavy chain CH3 constant region fused to the CH2 constant region. The binding domain polypeptide can be a heavy chain variable region or a light chain variable region. The binding-domain immunoglobulin fusion proteins are further disclosed in US 2003/0118592 and US 2003/0133939. These antibody fragments are obtained using conventional techniques known to those with skill in the art, and the fragments are screened for utility in the same manner as are intact antibodies. Further examples of "antigen-binding fragments" are so-called microantibodies, which are derived from single CDRs. For example, Heap et al. describe a 17 amino acid residue microantibody derived from the heavy chain CDR3 of an antibody directed against the gp120 envelope glycoprotein of HIV-1 (Heap CJ

et al. (2005) J. Gen. Virol. 86:1791-1800). Other examples include small antibody mimetics comprising two or more CDR regions that are fused to each other, preferably by cognate framework regions. Such a small antibody mimetic comprising VH CDR1 and VL CDR3 linked by the cognate VH FR2 has been described by Qiu et al. (Qiu X-Q, et al. (2007) Nature biotechnology 25(8):921-929).

Thus, the term "antibody or antigen-binding fragment thereof", as used herein, refers to immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin molecules, i.e. molecules that contain an antigen-binding site that immunospecifically binds an antigen.

Antibodies and antigen-binding fragments thereof usable in the invention may be from any animal origin including birds and mammals. Preferably, the antibodies or fragments are from human, chimpanzee, rodent (e.g. mouse, rat, guinea pig, or rabbit), chicken, turkey, pig, sheep, goat, camel, cow, horse, donkey, cat, or dog origin. It is particularly preferred that the antibodies are of human or murine origin. Antibodies of the invention also include chimeric molecules in which an antibody constant region derived from one species, preferably human, is combined with the antigen binding site derived from another species, e.g. mouse. Moreover antibodies of the invention include humanized molecules in which the antigen binding sites of an antibody derived from a non-human species (e.g. from mouse) are combined with constant and framework regions of human origin.

As exemplified herein, antibodies of the invention can be obtained directly from hybridomas which express the antibody, or can be cloned and recombinantly expressed in a host cell (e.g., a CHO cell, or a lymphocytic cell). Further examples of host cells are microorganisms, such as *E. coli,* and fungi, such as yeast. Alternatively, they can be produced recombinantly in a transgenic non-human animal or plant.

The term "chimeric antibody" refers to those antibodies wherein one portion of each of the amino acid sequences of heavy and light chains is homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular class, while the remaining segment of the chain is homologous to corresponding sequences in another species or class. Typically the variable region of both light and heavy chains mimics the variable regions of

antibodies derived from one species of mammals, while the constant portions are homologous to sequences of antibodies derived from another. One clear advantage to such chimeric forms is that the variable region can conveniently be derived from presently known sources using readily available B-cells or hybridomas from non-human host organisms in combination with constant regions derived from, for example, human cell preparations. While the variable region has the advantage of ease of preparation and the specificity is not affected by the source, the constant region being human is less likely to elicit an immune response from a human subject when the antibodies are injected than would the constant region from a non-human source. However, the definition is not limited to this particular example.

The term "humanized antibody" refers to a molecule having an antigen binding site that is substantially derived from an immunoglobulin from a non-human species, wherein the remaining immunoglobulin structure of the molecule is based upon the structure and/or sequence of a human immunoglobulin. The antigen binding site may either comprise complete variable domains fused onto constant domains or only the complementarity determining regions (CDR) grafted onto appropriate framework regions in the variable domains. Antigen-binding sites may be wild-type or modified by one or more amino acid substitutions, e.g. modified to resemble human immunoglobulins more closely. Some forms of humanized antibodies preserve all CDR sequences (for example a humanized mouse antibody which contains all six CDRs from the mouse antibody). Other forms have one or more CDRs which are altered with respect to the original antibody.

Different methods for humanizing antibodies are known to the skilled person, as reviewed by Almagro and Fransson, the content of which is herein incorporated by reference in its entirety (Almagro JC and Fransson J (2008) Frontiers in Bioscience 13:1619-1633). Almagro and Fransson distinguish between rational approaches and empirical approaches. Rational approaches are characterized by generating few variants of the engineered antibody and assessing their binding or any other property of interest. If the designed variants do not produce the expected results, a new cycle of design and binding assessment is initiated. Rational approaches include CDR grafting, Resurfacing, Superhumanization, and Human String Content Optimization. In contrast, empirical approaches are based on the generation of large libraries of humanized variants and selection of the best clones using enrichment technologies or high-

throughput screening. Accordingly, empirical approaches are dependent on a reliable selection and/or screening system that is able to search through a vast space of antibody variants. *In vitro* display technologies, such as phage display and ribosome display fulfill these requirements and are well-known to the skilled person. Empirical approaches include FR libraries, Guided selection, Framework-shuffling, and Humaneering.

The term "human antibody", as used herein, is intended to include antibodies having variable and constant regions derived from human germline immunoglobulin sequences. The human mAbs of the invention may include amino acid residues not encoded by human germline immunoglobulin sequences (e.g., mutations introduced by random or site-specific mutagenesis *in vitro* or by somatic mutation *in vivo*), for example in the CDRs and in particular CDR3. However, the term "human antibody", as used herein, is not intended to include mAbs in which CDR sequences derived from the germline of another mammalian species (e.g., mouse), have been grafted onto human FR sequences. Human antibodies of the invention include antibodies isolated from human immunoglobulin libraries or from animals transgenic for one or more human immunoglobulin and that do not express endogenous immunoglobulins, as described for example in U.S. Patent No. 5,939,598 by Kucherlapati and Jakobovits.

The term “monoclonal antibody” as used herein refers to a preparation of antibody molecules of single molecular composition. A monoclonal antibody displays a single binding specificity and affinity for a particular epitope. In one embodiment, the monoclonal antibodies are produced by a hybridoma which includes a B cell obtained from a non-human animal, e.g. mouse, fused to an immortalized cell.

The term “recombinant antibody”, as used herein, includes all antibodies that are prepared, expressed, created or isolated by recombinant means, such as (a) antibodies isolated from an animal (e.g., a mouse) that is transgenic or transchromosomal with respect to the immunoglobulin genes or a hybridoma prepared therefrom, (b) antibodies isolated from a host cell transformed to express the antibody, e.g. from a transfectoma, (c) antibodies isolated from a recombinant, combinatorial antibody library, and (d) antibodies prepared, expressed, created or isolated by any other means that involve splicing of immunoglobulin gene sequences to other DNA sequences.

The term “transfectoma”, as used herein, includes recombinant eukaryotic host cells expressing an antibody, such as CHO cells, NS/0 cells, HEK293 cells, HEK293T cells, plant cells, or fungi, including yeast cells.

As used herein, a “heterologous antibody” is defined in relation to a transgenic organism producing such an antibody. This term refers to an antibody having an amino acid sequence or an encoding nucleic acid sequence corresponding to that found in an organism not consisting of the transgenic organism, and being generally derived from a species other than the transgenic organism.

As used herein, a “heterohybrid antibody” refers to an antibody having light and heavy chains of different organismal origins. For example, an antibody having a human heavy chain associated with a murine light chain is a heterohybrid antibody.

Thus, “antibodies and antigen-binding fragments thereof” suitable for use in the present invention include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, monovalent, bispecific, heteroconjugate, multispecific, recombinant, heterologous, heterohybrid, chimeric, humanized (in particular CDR-grafted), deimmunized, or human antibodies, Fab fragments, Fab' fragments, $F(ab')_2$ fragments, fragments produced by a Fab expression library, Fd, Fv, disulfide-linked Fvs (dsFv), single chain antibodies (e.g. scFv), diabodies or tetrabodies (Holliger P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90(14), 6444-6448), nanobodies (also known as single domain antibodies), anti-idiotypic (anti-Id) antibodies (including, e.g., anti-Id antibodies to antibodies of the invention), and epitope-binding fragments of any of the above.

The antibodies described herein are preferably isolated. An "isolated antibody", as used herein, is intended to refer to an antibody that is substantially free of other mAbs having different antigenic specificities (e.g., an isolated antibody that specifically binds alpha 2 integrin is substantially free of mAbs that specifically bind antigens other than alpha integrin). An isolated antibody that specifically binds alpha 2 integrin may, however, have cross-reactivity to other antigens, such as alpha 2 integrin molecules from other species.

The terms “biological function or function of alpha 2 integrin” as used herein, are used synonymously and refer to any function of alpha 2 integrin such as, but not limited to: Binding to and forming a complex with beta1 integrin, binding to any of the known ligands such as binding to collagen, laminin, collagen-induced platelet aggregation, induction of thrombotic responses, thrombocytopenia, cell migration on collagen, cell-dependent reorganization of collagen fibers, collagen-dependent cellular resonses resulting in increases in cytokine expression and proliferation, alpha2 integrin or collagen-dependent aspects of T-cell, mast cell or neutrophil function, alpha 2 integrin or collagen-dependent aspects of delayed type hypersensitivity, alpha 2 integrin or collagen-dependent aspects of contact hypersensitivity, collagen-induced arthritis, mammary gland ductal morphogenesis, epidermal wound healing, and processes associated with VEGF-induced angiogenesis.

As used herein, a “alpha 2 integrin antagonist” denotes a compound that inhibits at least one biological activity of alpha 2 integrin, preferably an activity of alpha 2 integrin present on blood platelets, vascular endothelial cells, epithelial cells, activated monocytes/macrophages, fibroblasts, leukocytes, lymphocytes, activated neutrophils and/or mast cells especially when used in stoichiometric amounts. Preferred alpha 2 antagonists of the present invention are neutralizing antibodies.

A "neutralizing antibody", as used herein (or an "antibody that neutralizes alpha 2 integrin activity"), is intended to refer to an antibody whose binding to alpha 2 integrin results in inhibition of at least one biological activity of alpha 2 integrin, preferably inhibition of the platelet activating activity of alpha 2 integrin. This inhibition of the biological activity of alpha 2 integrin can be assessed by measuring one or more indicators of alpha 2 integrin biological activity by one or more of several standard *in vitro* or *in vivo* assays known in the art. Examples of such assays are described for example in the examples of present invention.

Since alpha 2 integrin has functions such as listed above, the activity of alpha 2 integrin has an effect on several diseases such as those associated with increased platelet activity. Accordingly, alpha 2 integrin antagonists, such as inhibitory peptide or peptide complexes targeting alpha 2 integrin or neutralizing anti-alpha 2 integrin antibodies or antigen-binding fragments thereof, are useful to reduce or inhibit the effects of alpha 2 integrin, such as platelet activity. Consequently,

alpha 2 integrin antagonists are useful for ameliorating, improving, inhibiting or preventing several such diseases, including without limitation thrombosis, a vascular disease, cancer, including neo-angiogenesis and metastasis, inflammation, inflammatory disease, autoimmune disease and a disease characterized by abnormal or increase angiogenesis, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, reactions to transplant, optical neuritis, spinal cord trauma, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus (SLE), multiple sclerosis, Reynaud's syndrome, experimental autoimmune encephalomyelitis, Sjorgen's syndrome, scleroderma, cardiovascular disease, psoriasis, and infections that induce an inflammatory response.

In specific embodiments, the anti- alpha 2 integrin antibodies or antigen-binding fragments thereof described herein may be conjugated to a therapeutic moiety ("immunoconjugate"), such as a cytotoxin, a chemotherapeutic drug, an immunosuppressant or a radioisotope.

A "conservative amino acid substitution" is one in which an amino acid residue is substituted by another amino acid residue having a side chain (R group) with similar chemical properties (e.g., charge or hydrophobicity). In general, a conservative amino acid substitution will not substantially change the functional properties of a protein. In cases where two or more amino acid sequences differ from each other by conservative substitutions, the percent or degree of similarity may be adjusted upwards to correct for the conservative nature of the substitution. Means for making this adjustment are well known to those of skill in the art. See, e.g., Pearson (1994) Methods MoI. Biol. 24: 307- 331. Examples of groups of amino acids that have side chains with similar chemical properties include

1) aliphatic side chains: glycine, alanine, valine, leucine and isoleucine;

2) aliphatic- hydroxyl side chains: serine and threonine;

3) amide-containing side chains: asparagine and glutamine;

4) aromatic side chains: phenylalanine, tyrosine, and tryptophan;

5) basic side chains: lysine, arginine, and histidine;

6) acidic side chains: aspartate and glutamate, and

7) sulfur-containing side chains: cysteine and methionine.

Preferred conservative amino acids substitution groups are: valine-leucine-isoleucine, phenylalanine-tyrosine, lysine-arginine, alanine-valine, glutamate-aspartate, and asparagine-

glutamine. Alternatively, a conservative replacement is any change having a positive value in the PAM250 log-likelihood matrix disclosed in Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-45. A "moderately conservative" replacement is any change having a nonnegative value in the PAM250 log-likelihood matrix. Given the known genetic code, and recombinant and synthetic DNA techniques, the skilled scientist can readily construct DNAs encoding conservative amino acid variants.

As used herein, “non-conservative substitutions” or “non-conservative amino acid exchanges” are defined as exchanges of an amino acid by another amino acid listed in a different group of the seven standard amino acid groups 1) to 7) shown above.

The term "substantial identity" or "substantially identical," when referring to a nucleic acid or fragment thereof, indicates that, when optimally aligned with appropriate nucleotide insertions or deletions with another nucleic acid (or its complementary strand), there is nucleotide sequence identity in at least about 90%, and more preferably at least about 95%, 96%, 97%, 98% or 99% of the nucleotide bases, as measured by any well-known algorithm of sequence identity, such as FASTA, BLAST or GAP, as discussed below.

As applied to polypeptides, the term "substantial similarity" or “substantially similar” means that two peptide sequences, when optimally aligned, such as by the programs GAP or BESTFIT using default gap weights, share at least 90% sequence identity, even more preferably at least 95%, 98% or 99% sequence identity. Preferably, residue positions which are not identical differ by conservative amino acid substitutions.

Sequence similarity for polypeptides is typically measured using sequence analysis software. Protein analysis software matches similar sequences using measures of similarity assigned to various substitutions, deletions and other modifications, including conservative amino acid substitutions. For instance, GCG software contains programs such as GAP and BESTFIT which can be used with default parameters to determine sequence homology or sequence identity between closely related polypeptides, such as homologous polypeptides from different species of organisms or between a wild type protein and a mutein thereof. See, e.g., GCG Version 6.1. Polypeptide sequences also can be compared using FASTA with default or recommended

parameters; a program in GCG Version 6.1. FASTA (e.g., FASTA2 and FASTA3) provides alignments and percent sequence identity of the regions of the best overlap between the query and search sequences (Pearson (2000) *supra*). Another preferred algorithm when comparing a sequence of the invention to a database containing a large number of sequences from different organisms is the computer program BLAST, especially BLASTP or TBLASTN, using default parameters. See, e.g., Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 410 and (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389 402, each of which is herein incorporated by reference.

When percentages of sequence identity are referred to in the present application, these percentages are calculated in relation to the full length of the longer sequence, if not specifically indicated otherwise. This calculation in relation to the full length of the longer sequence applies both to nucleic acid sequences and to polypeptide sequences.

As used herein, "treat", "treating" or “treatment” of a disease or disorder means accomplishing one or more of the following: (a) reducing the severity and/or duration of the disorder; (b) limiting or preventing development of symptoms characteristic of the disorder(s) being treated; (c) inhibiting worsening of symptoms characteristic of the disorder(s) being treated; (d) limiting or preventing recurrence of the disorder(s) in patients that have previously had the disorder(s); and (e) limiting or preventing recurrence of symptoms in patients that were previously symptomatic for the disorder(s).

As used herein, “prevent”, “preventing”, “prevention”, or “prophylaxis” of a disease or disorder means preventing that a disorder occurs in subject.

As used herein, the expressions “is for administration” and “is to be administered” have the same meaning as “is prepared to be administered”. In other words, the statement that an active compound “is for administration” has to be understood in that said active compound has been formulated and made up into doses so that said active compound is in a state capable of exerting its therapeutic activity.

The terms “therapeutically effective amount” or “therapeutic amount” are intended to mean that amount of a drug or pharmaceutical agent that will elicit the biological or medical response of a

tissue, a system, animal or human that is being sought by a researcher, veterinarian, medical doctor or other clinician. The term "prophylactically effective amount" is intended to mean that amount of a pharmaceutical drug that will prevent or reduce the risk of occurrence of the biological or medical event that is sought to be prevented in a tissue, a system, animal or human by a researcher, veterinarian, medical doctor or other clinician. Particularly, the dosage a patient receives can be selected so as to achieve the amount of peptide or peptide complex to exhibit sufficient inhibition of alpha2 integrin function in order to allow for the prophylactic or curative therapy (prevention, improvement or healing) of an $\alpha 2$ integrin-related disease or disorder, preferably selected from the group consisting of thrombosis, a vascular disease, cancer, including neo-angiogenesis and metastasis, inflammation, inflammatory disease, autoimmune disease and a disease characterized by abnormal or increase angiogenesis, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, reactions to transplant, optical neuritis, spinal cord trauma, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus (SLE), multiple sclerosis, Reynaud's syndrome, experimental autoimmune encephalomyelitis, Sjorgen's syndrome, scleroderma, cardiovascular disease, psoriasis, and infections that induce an inflammatory response.

As used herein, a "patient" means any mammal or bird who may benefit from a treatment with the antibodies and antigen-biding fragments thereof described herein. Preferably, a "patient" is selected from the group consisting of laboratory animals (e.g. mouse or rat), domestic animals (including e.g. guinea pig, rabbit, chicken, turkey, pig, sheep, goat, camel, cow, horse, donkey, cat, or dog), or primates including chimpanzees and human beings. It is particularly preferred that the "patient" is a human being.

"Pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia (United States Pharmacopeia-33/National Formulary-28 Reissue, published by the United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville Md., publication date: April 2010) or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans.

Specific populations treatable by the therapeutic methods of the invention include subjects indicated for alpha 2 integrin-activating mutations (gain of function mutations, "GOF"), subjects

with α2 integrin-related disease or disorder, preferably selected from the group consisting of thrombosis, a vascular disease, cancer, including neo-angiogenesis and metastasis, inflammation, inflammatory disease, autoimmune disease and a disease characterized by abnormal or increase angiogenesis, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, reactions to transplant, optical neuritis, spinal cord trauma, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus (SLE), multiple sclerosis, Reynaud's syndrome, experimental autoimmune encephalomyelitis, Sjorgen's syndrome, scleroderma, cardiovascular disease, psoriasis, and infections that induce an inflammatory response.

Embodiments of the Invention

The present invention will now be further described. In the following passages different aspects of the invention are defined in more detail. Each aspect so defined may be combined with any other aspect or aspects unless clearly indicated to the contrary. In particular, any feature indicated as being preferred or advantageous may be combined with any other feature or features indicated as being preferred or advantageous, unless clearly indicated to the contrary.

Accordingly, a first aspect of the present invention relates to a peptide or peptide complex, preferably an isolated monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof, wherein said peptide or peptide complex, antibody or fragment specifically binds to the I-domain of a human α2-integrin, said antibody or fragment comprising a heavy chain variable region (VH) domain and a light chain variable region (VL) domain, wherein said antibody or fragment cross-reacts with a non-human primate α2-integrin but does not cross-react with a non-primate α2-integrin.

A second aspect of the present invention relates to a peptide or peptide complex, preferably an isolated monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof, wherein said peptide or peptide complex, antibody or fragment specifically binds to the I-domain of a human α2-integrin, said antibody comprising a heavy chain variable region (VH) domain and a light chain variable region (VL) domain, wherein said antibody or fragment competes with a reference antibody for binding to the epitope of the reference antibody, said reference antibody comprising a light chain encoded by the plasmid as deposited with the DSMZ under accession No. DSM

23944 and a heavy chain encoded by either (i) the plasmid as deposited with the DSMZ under accession DSM 23946 or (ii) the plasmid as deposited with the DSMZ under accession No. DSM 23945.

In a third aspect, present invention relates to a peptide or peptide complex, wherein the peptide or peptide complex comprises one or more of the following components a to f:
LCDR1, wherein LCDR1 is RASESVESYGNSFIY (SEQ ID NO:6) or a functionally active variant thereof,
LCDR2, wherein LCDR2 is LASNLAS (SEQ ID NO:7) or a functionally active variant thereof,
LCDR3, wherein LCDR3 is QQNNEDPYT (SEQ ID NO:8) or a functional active variant thereof,
HCDR1, wherein HCDR1 is GYTFTSYWMN (SEQ ID NO:3) or a functionally active variant thereof,
HCDR2, wherein HCDR2 is RIDPSDSETHYNQKFK (SEQ ID NO:4) or a functionally active variant thereof, and
HCDR3, wherein HCDR3 is VGRGYFDY (SEQ ID NO:5) or a functional active variant thereof, and wherein the one or more components a) to f) are arranged to allow for binding of the peptide or peptide complex to α2 integrin or as heterodimeric α2β1 integrin.

In a fourth aspect, present invention relates to the above peptide or peptide complex for use in the treatment, prophylaxis or diagnosis of an α 2- integrin –related disorder or disease.

The sequences of SEQ ID NO:6 to 8 are CDRs of light chains and that of SEQ ID NO:3 to 5 are the CDRs of heavy chains of the analysed antibody (as determined by sequence analysis). In accordance with the present invention, the peptide or peptide complex, comprises one of above the light chain CDRs or a functionally active variant thereof and/or one of the heavy chain CDRs or a functionally active variant thereof. Examples include a peptide or peptide complex comprising one or two or three of the above HCDRS and/or one or two or three of the above LCDRs in any of the conceivable combinations. One embodiment of present invention is a peptide or peptide complex comprising 3 LCDRs and 3HCDRs, wherein at least one of them is one of the above CDRs a to f.

In the context of present invention, the terms LCDR and LDR are used synonymously. The same applies for the terms HCDR and HDR.

If the above CDRs are arranged in a suitable way, the arrangement allows for specific binding to α2 integrin. The suitable arrangement of CDRs to allow for binding of an antigen is known in the art. A variety of different antibody formats or formats of binding parameters have been developed or identified so far. Any of these or any other suitable arrangement may be used for the polypeptide or polypeptide complex of the present invention, as long as the format or arrangement allows for specific binding to α2 integrin.

The CDR sequences, as defined by the above SEQ ID NOs or variants thereof, may be arranged in one (poly)peptide-chain or in a polypeptide or peptide complex. If they are arranged within one (poly)peptide-chain, the sequences may be connected by one or more linker sequences, preferably a peptide linker, e.g. as a fusion protein. According to one embodiment, they may be embedded into a natural or artificial antibody scaffold or framework, as known in the art. For natural antibodies, the CDRs are supported within the variable domains by conserved framework regions. The framework can be modified in order to obtain artificial antibodies, such as Fabs, single chain antibodies etc. which are described below in more detail.

If CDRs are arranged in a peptide complex, two or more (poly)peptides are bound to each other by non-covalent bonding including hydrogen bonds, ionic bonds, Van der Waals forces, and hydrophobic interactions.

A peptide is an organic compound made of 2 or more α-amino acids arranged in a linear chain. The amino acids are joined together by peptide bonds between the carboxyl and amino groups of adjacent amino acid residues. In general, the genetic code specifies 20 standard amino acids. After or even during synthesis, the residues in a protein may be chemically modified by post-translational modification, which alter the physical and chemical properties, folding, stability, activity, and ultimately, the function of the proteins. The peptides according to the different

aspects of present invention may be modified or unmodified as long as they are able to bind α 2 integrin.

In the art, the term "polypeptide" refers to a molecule comprising about 20, about 25, about 30 or more amino acids coupled to each other by peptide bonds in a linear mode to form a polypeptide chain. Shorter molecules of this kind comprising at least 2 amino acids are generally referred to as peptides. The term "protein" usually refers to molecules comprising one or more polypeptide chains. In the context of present invention, the terms peptide, polypeptide and protein are used synonymously.

In the context of present invention, the term “peptide” or “polypeptide”according to the different aspects of present invention refers to peptides or polypeptides as defined above, and the term “peptide complex” refers to molecule complexes comprising one or more peptides and/or polypeptides as defined above (e.g., the antibodies, antigen binding fragments and other binding molecules of the invention).

Peptide and peptide complexes thereof as defined herein selectively recognize and specifically bind to a α2 integrin antigen. In the context of present invention, the term “specific binding to α2 integrin” refers to the ability of the peptide or peptide complex according to the invention to bind specifically to α2 integrin or to the α2 integrin I domain or to α2 integrin in the complex with any other polypeptide such as in the heterodimeric complex with another integrin subunit, e.g. the α2β1 integrin complex. In a preferred embodiment, the peptide or peptide complexes of present invention comprises or consists of or is an isolated monoclonal antibody or an antigen binding fragment thereof.

The use of the terms "selective" or "specific" herein, when used to describe the binding characteristics of the peptide or peptide complex according to the invention, refers to the fact that the disclosed peptides or peptide complexes do not show significant binding to other than α2 integrin, except in those specific instances where the peptide/complex is supplemented to confer an additional, distinct specificity to the α2 integrin-specific binding portion (as, for example, in bispecific or bifunctional molecules where the molecule is designed to bind or effect two

functions, at least one of which is to specifically bind α2 integrin). In specific embodiments, α2 integrin-specific peptides or complexes thereof bind to human α2 integrin with a K_D of at least 1.2×10^{-6} . In specific embodiments, α2 integrin-specific peptides or complexes thereof bind to human α2 integrin with a K_D of 5×10^{-7} or more, of 2×10^{-7} or more, or of 1×10^{-7} or more. In additional embodiments, α2 integrin-specific peptides or complexes thereof bind to human α2 integrin with a K_D of 1×10^{-8} or more. In other embodiments, α2 integrin-specific peptides or complexes thereof bind to human α2 integrin with a K_D of 5×10^{-9} or more or of 1×10^{-9} or more. In further embodiments, α2 integrin-specific peptides or complexes thereof bind to human α2 integrin with a K_D of 2×10^{-10} or more. In specific embodiments, α2 integrin-specific peptides or complexes thereof do not bind other proteins at the above K_Ds. In other embodiments, the α2 integrin-specific peptides or complexes thereof binding to an α2 integrin (e.g., human and/or non-human primate α2 integrin) with an affinity that is at least two-fold greater than its affinity for a non-specific antigen.

K_D relates to the dissociation constant obtained from the ratio of k_d (the dissociation rate of a particular binding molecule-target protein interaction; also referred to as k_{off}) to k_a (the association rate of the particular binding molecule-target protein interaction; also referred to as k_{on}), or k_d/k_a which is expressed as a molar concentration (M). K_D values can be determined using methods well established in the art. A preferred method for determining the K_D of a binding molecule is described in Example 1 D.

α2 integrin-specific peptides or complexes thereof have been shown to dose-dependently inhibit α2 integrin/ligand interaction (see Fig. 2 and Examples). Accordingly, α2 integrin-specific peptides or complexes thereof may be characterized by their ability to counteract binding of collagen to α2 integrin. The extent of inhibition by any α2 integrin-specific peptide or complex thereof may be measured quantitatively in statistical comparison to a control, or via any alternative method available in the art. In specific embodiments, the inhibition is about 10 % inhibition or more. In other embodiments, the inhibition is 20 % or more, 30 % or more, 40 % or more 50 % or more, 60 % or more 70 % or more, 80 % or more, 90 % or more, or 95 % or more.

The peptide or peptide complex may also comprise a functionally active variant of the above sequences. A functionally active variant of the peptides or peptide complexes of the invention is characterized by having a biological activity similar to that displayed by the complete peptide, including the ability to bind to α2 integrin, and optionally to inhibit α2 integrin. The variant is functionally active in the context of the present invention, if the activity (e.g. binding activity, optionally expressed as K_D) of the variant amounts to 10 % or more, 25 % or more, 50 % or more, 70 % or more, 80 % or more, 90 % or more, 95% or more, or 99 % or more of the activity of the peptide/complex without sequence alteration. Suitable methods for determining binding activity to α2 integrin are given in the Examples. A functionally active variant may be obtained by a limited number of amino acid substitutions, deletions and/or insertions.

In preferred embodiments of the present invention the peptide or peptide complex of the invention is further characterized by one or more of the following features:

(i) One, two or three components a) to c) are comprised in a variable domain of a light chain (VL)

(ii) One, two or three components d) to f) are comprised in a variable domain of a heavy chain (VH)

(iii) The peptide or peptide complex is an antibody

(iv) The peptide or peptide complex is Fab, a Fab', a F(ab')2, a Fv, a disulfide-linked Fv, a scFv, a $(scFv)_2$, a bispecific antibody, a multispecific antibody, a diabody, a triabody, a tetrabody or a minibody, a monoclonal antibody, a chimeric antibody or a humanized antibody

(v) The peptide or peptide complex comprises a heavy chain immunoglobulin constant domain selected from the group consisting of: a human IgM constant domain, a human IgGl constant domain, a human IgG2 constant domain, a human IgG3 constant domain, domain, a human IgG4 constant domain, a human IgE constant domain, and a human IgA constant domain

(vi) The functionally active variant is a functionally active fragment consisting of 60 % or more, 70 % or more, 80 % or more, 90 % or more, 95 % or more, or 99 % or more of an amino acid sequence of any of SEQ ID NOS: 3 to 8;

(vii) The functionally active variant is a functionally active variant having 60 % or more, 70 % or more, 80 % or more, 90 % or more, 95 % or more, or 99 % or more sequence identity to an amino acid sequence of any of SEQ ID NOS: 3 to 8, particularly wherein the functionally active variant is derived from the amino acid sequence of any of SEQ ID NOS: 3 to 8 by one or more conservative amino acid substitutions

(viii) The peptide or peptide complex comprises the amino acid sequence of

- SEQ ID NO: 1, or a functionally active variant thereof, and/or
- SEQ ID NO: 2, or a functionally active variant thereof, and/or
- SEQ ID NO:9, or a functionally active variant thereof, and/or
- SEQ ID NO:10, or a functionally active variant thereof, and/or
- SEQ ID NO:11, or a functionally active variant thereof, and/or

(ix) The peptide or peptide complex consists of the amino acid sequence of

- SEQ ID NO: 9, or a functionally active variant thereof, and
- SEQ ID NO: 10, or a functionally active variant thereof, and
- optionally 50 or less additional amino acid residue(s), 1 to 40, 1 to 30, 1 to 25, 1 to 15, 1 to 10, or 5, 4, 3, 2, or 1 additional amino acids residue(s)

(x) The peptide or peptide complex consists of the amino acid sequence of

- SEQ ID NO: 9, or a functionally active variant thereof, and
- SEQ ID NO: 11, or a functionally active variant thereof, and
- optionally 50 or less additional amino acid residue(s), 1 to 40, 1 to 30, 1 to 25, 1 to 15, 1 to 10, or 5, 4, 3, 2, or 1 additional amino acids residue(s).

SEQ ID NOs 1 and 2 can be gained from Figure No.5: SEQ ID NO: 1 is the the amino acid sequence of the α2 integrin antibody-variable light chain. SEQ ID NO:2 is the amino acid sequence of the variable heavy chain, respectively.

SEQ ID NOs 9, 10 and 11 can be gained from Figure 7: SEQ ID NO:9 is the amino acid sequence of the chimeric light chain of the antibody produced as an IgG4 format (CDRs underlined), SEQ ID NO:10 is the amino acid sequence of the chimeric heavy chain of the antibody produced as an IgG4 format (CDRs underlined),and SEQ ID NO 11 is the amino acid sequence of the chimeric heavy chain in Fab format with a 6xhis tag. The constant regions were

derived from human sequence backbones (see Examples). The invention also relates to any of the antibody constructs or fragments, peptide or polypeptide complexes without the his tag.

According to one embodiment, the variable domains of the HC and LC are coupled to respective constant regions and to form chimeric HC or LC constructs. Specific embodiments are a chimeric α2 integrin antibody LC variable region fused to the constant region of IGKC protein (such as e.g. in SEQ ID NO:9), a chimeric α2 integrin antibody HC variable region fused to the constant region of IGHG4 (such as e.g. in SEQ ID NO:10) or a chimeric α2 integrin antibody HC variable region furse to the constant region CH1 domain of IGHG1 (such as e.g. in SEQ ID NO:11).

As detailed above, components a) to c) (LC CDRs) and d) to f) (HC CDRs) were obtained by sequencing variable domain of a light chain (VL) and variable domain of a heavy chain (VH), respectively, of the monoclonal antibody produced and tested. Accordingly, they may be comprised in the same. It may be any naturally occurring VL or VH framework or an artificial VL or VH framework. In one embodiment of the present invention, one or more of the CDRs (LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 and HCDR3) are arranged in the framework of the prevailing variable domain, i.e. LCDR1, LCDR2 and LCDR3 in the framework of VL and HCDR1, HCDR2 and HCDR3 in the framework of VH. This means that the CDRs, as identified by any suitable method described above (cf. SEQ ID NOs: 1 and 2) alone, together or in any combination thereof, may be removed from the shown neighborhood and transferred into the framework of another (second) variable domain, thereby substituting the CDRs of the second variable domain. A variety of variable domains or antibody sequences is known in the art and may be used for this purpose. For example, variable domains, into which CDRs of interest are inserted, may be obtained from any germ-line or rearranged human variable domain. Variable domains may also be synthetically produced. The CDR regions can be introduced into the respective variable domains using recombinant DNA technology. One means by which this can be achieved is described in Marks et al., 1992, Bio/Technology 10:779-783. A variable heavy domain may be paired with a variable light domain to provide an antigen binding site. In addition, independent regions (e.g., a variable heavy domain alone) may be used to bind antigen.

Combinations of the above described heavy or light chain chimeras with artificially generated light or heavy chains generated by CDR grafting as described in the previous paragraph are also conceivable as long as they show α2 integrin binding specificity.

The peptides or peptide-complexes of present invention can be glycosylated. The glycosylation of proteins and its physiological affect is known in the art. The oligosaccharide component can significantly (in the positive or negative) affect properties relevant to the efficacy of a therapeutic glycoprotein, including physical stability, resistance to protease attack, interactions with the immune system, pharmacokinetics, and specific biological activity. For the expression of glycosylated proteins, mammalian host cells are commonly used in the art (Cumming et al., 1991, Glycobiology 1: 115-130; Jenkins et al., 1996, Nature Biotechn. 14: 975-981). Examples include Chinese hamster ovary (CHO) cells, baby hamster kidney (BHK) cells, NSO-and SP2/0-mouse myeloma cells. The production of glycosylated proteins from transgenic animals has also been published (Jenkins et al., 1996, supra). Moreover, engineered recombinant host cells heterologously expressing / overexpressing glycosyl transferase genes are known in the art (Bailey, 1991, Science 252: 1668-1675). WO 9954342 (A1) discloses methods for the generation of glycosylated proteins using host cells expressing a range of a glycoprotein-modifying glycosyl transferase activity which increases complex N-linked oligosaccharides carrying bisecting GIcNAc reported to have improved function.

According to one embodiment of the present invention, the peptide or peptide complex can be coupled to one or more molecules that are not identical with the peptide or peptide complex according to present invention (additional moieties), the whole complex being a “conjugate”. Examples of additional moieties comprise, e.g. one or more further biomolecules, as peptides or peptide complexes, nucleic acids (e.g. oligonucleotides, or RNA molecules, such as an RNAi) or organic (small) molecules, radioactive moieties. These additional moieties can have their own function, e.g. cytotoxicity, therapeutic activity, immunosuppressive activity, etc. or they can be beneficial for the whole conjugate for other reason (e.g. improved or decreased stability of the conjugate etc.) Present invention encompasses peptides or peptide complexes conjugated to one or more additional moieties. In the case of the peptide or peptide complex being an antibody, derivative of fragment thereof, this conjugate is an immunoconjugate. Examples of

immunoconjugates are known in the art (see e.g. WO05/103081), e.g. one or more chemotherapeutic substances, prodrugs, cytotoxins, radioisotopes or radioactive nucleotides, immunosuppressive moieties, therapeutic oligonucleotides, inhibitory RNA (RNAi).

According to one embodiment, the peptide or peptide complex is an antibody. Naturally occurring antibodies are globular plasma proteins (~150 kDa) that are also known as immunoglobulins which share a basic structure. As they have sugar chains added to amino acid residues, they are glycoproteins. The basic functional unit of each antibody is an immunoglobulin (Ig) monomer (containing only one Ig unit); secreted antibodies can also be dimeric with two Ig units as with IgA, tetrameric with four Ig units like teleost fish IgM, or pentameric with five Ig units, like mammalian IgM. In the present invention, examples of suitable formats include the format of naturally occurring antibodies including antibody isotypes known as IgA, IgD, IgE, IgG and IgM.

The Ig monomer is a "Y"-shaped molecule that consists of four polypeptide chains; two identical heavy chains and two identical light chains connected by disulfide bonds between cysteine residues. Each heavy chain is about 440 amino acids long; each light chain is about 220 amino acids long. Heavy and light chains each contain intrachain disulfide bonds which stabilize their folding. Each chain is composed of structural domains called Ig domains. These domains contain about 70-110 amino acids and are classified into different categories (for example, variable or V, and constant or C) according to their size and function. They have a characteristic immunoglobulin fold in which two β sheets create a “sandwich” shape, held together by interactions between conserved cysteines and other charged amino acids.

There are five types of mammalian Ig heavy chain denoted by α, δ, ε, γ, and μ. The type of heavy chain present defines the isotype of antibody; these chains are found in IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM antibodies, respectively.

Distinct heavy chains differ in size and composition; α and γ contain approximately 450 amino acids and δ approximately 500 amino acids, while μ and ε have approximately 550 amino acids. Each heavy chain has two regions, the constant region (C_H) and the variable region (V_H). In one species, the constant region is essentially identical in all antibodies of the same isotype, but

differs in antibodies of different isotypes. Heavy chains γ, α and δ have a constant region composed of three tandem Ig domains, and a hinge region for added flexibility; heavy chains μ and ε have a constant region composed of four immunoglobulin domains. The variable region of the heavy chain differs in antibodies produced by different B cells, but is the same for all antibodies produced by a single B cell or B cell clone. The variable region of each heavy chain is approximately 110 amino acids long and is composed of a single Ig domain.

In mammals, there are two types of immunoglobulin light chain denoted by λ and κ. A light chain has two successive domains: one constant domain (CL) and one variable domain (VL). The approximate length of a light chain is 211 to 217 amino acids. Each antibody contains two light chains that are always identical; only one type of light chain, κ or λ, is present per antibody in mammals. Other types of light chains, such as the ι chain, are found in lower vertebrates like Chondrichthyes and Teleostei.

In addition to naturally occurring antibodies, artificial antibody formats including antibody fragments have been developed. Some of them are described in the following. However, any other antibody format comprising or consisting of the above polypeptide(s) and allowing for specific binding to α2 integrins is encompassed by the present invention as well.

Although the general structure of all antibodies is very similar, the unique property of a given antibody is determined by the variable (V) regions, as detailed above. More specifically, variable loops, three each the light (VL) and three on the heavy (VH) chain, are responsible for binding to the antigen, i.e. for its antigen specificity. These loops are referred to as the Complementarity Determining Regions (CDRs). Because CDRs from both VH and VL domains contribute to the antigen-binding site, it is the combination of the heavy and the light chains, and not either alone, that determines the final antigen specificity.

Accordingly, the term "antibody", as used herein, means any polypeptide which has structural similarity to a naturally occurring antibody and is capable of specifically binding to α2 integrins, wherein the binding specificity is determined by the CDRs of in SEQ ID NOs: 3 to 8. Hence, "antibody" is intended to relate to an immunoglobulin-derived structure with specific binding to

α2 integrin including, but not limited to, a full length or whole antibody, an antigen binding fragment (a fragment derived, physically or conceptually, from an antibody structure), a derivative of any of the foregoing, a chimeric molecule, a fusion of any of the foregoing with another polypeptide, or any alternative structure/composition which selectively binds to α2 integrin and optionally inhibits the function of α2 integrin. The antibody may be any polypeptide which comprises at least one antigen binding fragment. Antigen binding fragments consist of at least the variable domain of the heavy chain and the variable domain of the light chain, arranged in a manner that both domains together are able to bind to the specific antigen.

"Full length" or "complete" antibodies refer to proteins that comprise two heavy (H) and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds which comprise: (1) in terms of the heavy chains, a variable region and a heavy chain constant region which comprises three domains, CH1, CH2 and CH3; and (2) in terms of the light chains, a light chain variable region and a light chain constant region which comprises one domain, CL. With regard to the term "complete antibody", any antibody is meant that has a typical overall domain structure of a naturally occurring antibody (i.e. comprising a heavy chain of three or four constant domains and a light chain of one constant domain as well as the respective variable domains), even though each domain may comprise further modifications, such as mutations, deletions, or insertions, which do not change the overall domain structure.

An "antibody fragment" also contains at least one antigen binding fragment as defined above, and exhibits essentially the same function and specificity as the complete antibody of which the fragment is derived from. Limited proteolytic digestion with papain cleaves the Ig prototype into three fragments. Two identical amino terminal fragments, each containing one entire L chain and about half an H chain, are the antigen binding fragments (Fab). The third fragment, similar in size but containing the carboxyl terminal half of both heavy chains with their interchain disulfide bond, is the crystalizable fragment (Fc). The Fc contains carbohydrates, complement-binding, and FcR-binding sites. Limited pepsin digestion yields a single F(ab')2 fragment containing both Fab pieces and the hinge region, including the H-H interchain disulfide bond. F(ab')2 is divalent for antigen binding. The disulfide bond of F(ab')2 may be cleaved in order to obtain Fab'.

Moreover, the variable regions of the heavy and light chains can be fused together to form a single chain variable fragment (scFv).

As the first generation of full sized antibodies presented some problems, many of the second generation antibodies have comprised only fragments of the antibody. Variable domains (Fvs) are the smallest fragments with an intact antigen-binding domain consisting of one VL and one VH. Such fragments, with only the binding domains, can be generated by enzymatic approaches or expression of the relevant gene fragments, e.g. in bacterial and eukaryotic cells. Different approaches can be used, e.g. either the Fv fragment alone or 'Fab'-fragments comprising one of the upper arms of the "Y" that includes the Fv plus the first constant domains. These fragments are usually stabilized by introducing a polypeptide link between the two chains which results in the production of a single chain Fv (scFv). Alternatively, disulfide-linked Fv (dsFv) fragments may be used. The binding domains of fragments can be combined with any constant domain in order to produce full length antibodies or can be fused with other proteins and polypeptides.

A recombinant antibody fragment is the single-chain Fv (scFv) fragment. In general, it has a high affinity for its antigen and can be expressed in a variety of hosts. These and other properties make scFv fragments not only applicable in medicine, but also of potential for biotechnological applications. As detailed above, in the scFv fragment the VH and VL domains are joined with a hydrophilic and flexible peptide linker, which improves expression and folding efficiency. Usually linkers of about 15 amino acids are used, of which the $(Gly_4Ser)_3$ linker has been used most frequently. scFv molecules might be easily proteolytically degraded, depending on the linker used. With the development of genetic engineering techniques these limitations could be practically overcome by research focused on improvement of function and stability. An example is the generation of disulfide-stabilized (or disulfide-linked) Fv fragments where the VH-VL dimer is stabilized by an interchain disulfide bond. Cysteines are introduced at the interface between the VL and VH domains, forming a disulfide bridge, which holds the two domains together.

Dissociation of scFvs results in monomeric scFvs, which can be complexed into dimers (diabodies or $(scFv)_2$), trimers (triabodies) or larger aggregates such as TandAbs and Flexibodies.

Antibodies with two binding domains can be created either through the binding of two scFv with a simple polypeptide link $(scFv)_2$ or through the dimerisation of two monomers (diabodies). The simplest designs are diabodies that have two functional antigen-binding domains that can be either the same, similar (bivalent diabodies) or have specificity for distinct antigens (bispecific diabodies). These bispecific antibodies allow for example the recruitment of novel effector functions (such as cytotoxic T cells) to the target cells, which make them very useful for applications in medicine.

Recently, antibody formats comprising four variable domains of heavy chains and four variable domains of light chains have been developed. Examples of these include tetravalent bispecific antibodies (TandAbs and Flexibodies, Affimed Therapeutics AG, Heidelberg. Germany). In contrast to a bispecific diabody, a bispecific TandAb is a homodimer consisting of only one polypeptide. Flexibodies are a combination of scFv with a diabody multimer motif resulting in a multivalent molecule with a high degree of flexibility for joining two molecules which are quite distant from each other on the cell surface. If more than two functional antigen-binding domains are present and if they have specificity for distinct antigens, the antibody is multispecific.

Certain antibody molecules including, but not limited to, Fv, scFv, diabody molecules or domain antibodies (Domantis) may be stabilized by incorporating disulfide bridges to line the VH and VL domains. Bispecific antibodies may be produced using conventional technologies, specific methods of which include production chemically, or from hybrid hybridomas) and other technologies including, but not limited to, the BiTE™ technology (molecules possessing antigen binding regions of different specificity with a peptide linker) and knobs-into-holes engineering.

Preferably, the antibody may be a Fab, a Fab', a F(ab')2, a Fv, a disulfide-linked Fv, a scFv, a $(scFv)_2$, a bispecific antibody, a multispecific antibody, a diabody, a triabody, a tetrabody or a minibody.

In one embodiment, the antibody is a monoclonal antibody, a chimeric antibody or a humanised antibody. Monoclonal antibodies are monospecific antibodies that are identical because they are produced by one type of immune cell that are all clones of a single parent cell. A chimeric

antibody is an antibody in which at least one region of an immunoglobulin of one species is fused to another region of an immunoglobulin of another species by genetic engineering in order to reduce its immunogenecity. For example murine V_L and V_H regions may be fused to the remaining part of a human immunoglobulin. A particular type of chimeric antibodies is a humanised antibody. Humanised antibodies are produced by merging the DNA that encodes the CDRs of a non-human antibody with human antibody-producing DNA (or vice versa). The resulting DNA construct can then be used to express and produce antibodies that are usually not as immunogenic as the non-human parenteral antibody or as a chimeric antibody, since merely the CDRs are non-human.

According to one embodiment of the different aspects of present inventions, human or humanized antibodies or fragments thereof can be used. Accordingly, the peptide or peptide complex may comprise a heavy chain immunoglobulin constant domain selected from the group consisting of: a human IgM constant domain, a human IgGl constant domain, a human IgG2 constant domain, a human IgG3 constant domain, domain, a human IgG4 constant domain, a human IgE constant domain, and a human IgA constant domain. In the context of the invention, the anti-α 2-Integrin antibody has been humanized using a method previously described in WO2009/032661, but any suitable humanization method known in the art can be used.

As detailed above, the CDR may also be a functionally active variant of any of the CDRs specified in the claims. In one embodiment the functionally active variant is a functionally active fragment consisting of 90 % or more of an amino acid sequence of any of SEQ ID NOS: 3 to 8. Alternatively, the functionally active variant is a functionally active variant having 70 % or more, preferably 80 % or more, more preferably 90 % or 95% or more sequence identity to an amino acid sequence of any of SEQ ID NOS: 3 to 8, particularly wherein the functionally active variant is derived from the amino acid sequence of any of SEQ ID NOS: 3 to 8 by means of one or more conservative amino acid substitution (see below).

In one embodiment of the different aspects of present invention, the peptide or peptide complex comprises the amino acid sequence of

- SEQ ID NO: 1, or a functionally active variant thereof, and/or
- SEQ ID NO: 2, or a functionally active variant thereof and/or

- SEQ ID NO: 9, or a functionally active variant thereof, and/or
- SEQ ID NO: 10, or a functionally active variant thereof, and/or
- SEQ ID NO: 11, or a functionally active variant thereof.

Alternatively, the peptide or peptide complex consists of the amino acid sequence of

- SEQ ID NO: 9, or a functionally active variant thereof, and
- SEQ ID NO: 10, or a functionally active variant thereof, and
- optionally 50 additional amino acid residue(s), or 1 to 40, 1 to 30, 1 to 25, 1 to 15, 1 to 10, 1 or 2, 3, 4 or 5 additional amino acids residue(s).

Alternatively, the peptide or peptide complex consists of the amino acid sequence of

- SEQ ID NO: 9, or a functionally active variant thereof, and
- SEQ ID NO: 11, or a functionally active variant thereof, and
- optionally 50 additional amino acid residue(s), or 1 to 40, 1 to 30, 1 to 25, 1 to 15, 1 to 10, 1 or 2, 3, 4 or 5 additional amino acids residue(s).

The functionally active variant may be a fragment characterized by being derived from any of the sequences of SEQ ID NO: 1 or 2 or 9 or 10 or 11 by one or more deletions. The deletion(s) may be C-terminally, N-terminally and/or internally. The fragment may e.g. be obtained by 10 or less deletions, such as 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 or 10, or by 5 or less, such as 1, 2, 3, 4 or 5, or by 3 or less, such as 1, 2 or 3, or by 2 or less, such as 1 or 2, or by 1 deletion(s). The functionally active fragment of the invention is characterized by having a biological activity similar to that displayed by the complete protein, including the ability to bind to α2 integrin and/or α2β1integrin and optionally to inhibit α2 and/or α2β1 integrin. The fragment of an antigen is functionally active in the context of the present invention, if the activity of the fragment amounts to 10 % or more, preferably 25 % or more, more preferably 50 % or more, more preferably 70 % or more, more preferably 80 % or more, more preferably 90 % or more, more preferably 95 % or more, most preferably or 99 % or more of the activity of the amino acid sequence without sequence alteration. Suitable methods for determining binding activity to α2β1 integrin are given in the Examples, particularly Example 1 D.

The variant may be characterized by being derived from any of the sequences of SEQ ID NO: 1 or 2 or 9 or 10 or 11 by one or more amino acid modifications including deletions, additions and/or substitutions. The modification(s) may be C-terminally, N-terminally and/or internally. The fragment may be obtained by 10 or less deletions, such as 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 or 10, or by 5 or less, such as 1, 2, 3, 4 or 5, or by 3 or less, such as 1, 2 or 3, or by 2 or less, such as 1 or 2, or by 1 deletion(s). The functionally active variant of the invention is characterized by having a biological activity similar to that displayed by the complete protein, including the ability to bind to α2 integrin and/or α2β1integrin and optionally to inhibit α2 and/or α2β1 integrin. The variant is functionally active in the context of the present invention, if the activity of the variant amounts to 10 % or more, preferably 25 % or more, more preferably 50 % or more, even more preferably 70 % or more, still more preferably 80 % or more, especially 90 % or more, particularly 95 % or more, most preferably 99 % or more of the activity of the amino acid sequence without sequence alteration.

The additional amino acids of (ix, x or xi) may be C-terminally, N-terminally and/or internally located. According to one embodiment, there are 50 or less additions, or 40 or less or 30 or less or 20 or less additions or 10 or less additions such as 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 or 10, or 5 or less additions, such as 1, 2, 3, 4 or 5, or 3 or less additions, such as 1, 2 or 3, or 2 or less, such as 1 or 2, or only 1 addition(s).

The additional amino acid residue(s) may be any amino acid, which may be either an L-and/or a D-amino acid, naturally occurring and otherwise. Preferably, the amino acid is any naturally occurring amino acid such as alanine, cysteine, aspartic acid, glutamic acid, phenylalanine, glycine, histidine, isoleucine, lysine, leucine, methionine, asparagine, proline, glutamine, arginine, serine, threonine, valine, tryptophan or tyrosine.

The amino acid may also be a modified or unusual amino acid. Examples of those are 2-aminoadipic acid, 3-aminoadipic acid, β-alanine, 2-aminobutyric acid, 4-aminobutyric acid, 6-aminocaproic acid, 2-aminoheptanoic acid, 2-aminoisobutyric acid, 3-aminoisobutyric acid, 2-aminopimelic acid, 2,4-diaminobutyric acid, desmosine, 2,2'-diaminopimelic acid, 2,3-diaminopropionic acid, N-ethylglycinem N-ethylasparagine, hydroxylysine, allo-hydroxylysine, 3-hydroxyproloine, 4-hydroxyproloine, isodesmosine, allo-isoleucine, N-methylglycine, N-

methylisoleucine, 6-N-Methyllysine, N-methylvaline, norvaline, norleucine or ornithine. Additionally, the amino acid may be subject to modifications such as posttranslational modifications. Examples of modifications include acetylation, amidation, blocking, formylation, γ-carboxyglutamic acid hydroxylation, glycosilation, methylation, phosphorylation and sulfatation. If more than one additional or heterologous amino acid residue is present in the peptide, the amino acid residues may be the same or different from one another.

The percentage of sequence identity can be determined e.g. by sequence alignment. Methods of alignment of sequences for comparison are well known in the art. Various programs and alignment algorithms have been described e.g. in Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981 or Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci.US. A. 85: 2444, 1988.

The NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990) is available from several sources, including the National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) and on the Internet, for use in connection with the sequence analysis programs blastp, blastn, blastx, tblastn and tblastx. Variants of any of the sequences of SEQ ID NOS: 1 to 8 are typically characterized using the NCBI Blast 2.0, gapped blastp set to default parameters. For comparisons of amino acid sequences of at least 30 amino acids, the Blast 2 sequences function is employed using the default BLOSUM62 matrix set to default parameters, (gap existence cost of 11, and a per residue gap cost of 1). When aligning short peptides (fewer than around 30 amino acids), the alignment is performed using the Blast 2 sequences function, employing the PAM30 matrix set t default parameters (open gap 9, extension gap 1 penalties). Methods for determining sequence identity over such short windows such as 15 amino acids or less are described at the website that is maintained by the National Center for Biotechnology Information in Bethesda, Maryland.

In another embodiment of the different aspects of present invention, the functionally active variant, as defined above, is derived from the amino acid sequence of any of the SEQ ID NOS: 1 or 2 or 9 or 10 or 11 of any of said sequences by one or more conservative amino acid substitution.

Conservative amino acid substitutions, as one of ordinary skill in the art will appreciate, are substitutions that replace an amino acid residue with one imparting similar or better (for the intended purpose) functional and/or chemical characteristics. For example, conservative amino acid substitutions are often ones in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine, tryptophan), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine), β-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Such modifications are not designed to significantly reduce or alter the binding or functional inhibition characteristics of the polypeptide (complex), albeit they may improve such properties. The purpose for making a substitution is not significant and can include, but is by no means limited to, replacing a residue with one better able to maintain or enhance the structure of the molecule, the charge or hydrophobicity of the molecule, or the size of the molecule. For instance, one may desire simply to substitute a less desired residue with one of the same polarity or charge. Such modifications can be introduced by standard techniques known in the art, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. One specific means by which those of skill in the art accomplish conservative amino acid substitutions is alanine scanning mutagenesis. The altered polypeptides are then tested for retained or better functioning using functional assays available in the art or described in the Examples. In a more preferred embodiment of the present invention the number of conservative substitutions in any of the sequences of SEQ ID NO: 1 or 2 or 9 or 10 or 20 is 20 or less such as, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 or 11, preferably 10 or less, such as 10, 9, 8, 7 or 6, especially 5 or less, such as 5, 4, 3 particularly 2 or 1.

In yet another embodiment of the different aspects of the present invention, the peptide or peptide complex comprises one or more functionally active variants,

– wherein the functionally active variant of LDR1 comprises the mutation at amino acid position 11, particularly 11Asn→Gln;

– wherein the functionally active variant of HDR2 comprises the mutation at amino acid position 6, particularly 6Asp→Glu;

– wherein the functionally active variant of SEQ ID NO: 1 comprises one or more mutations at amino acid positions 9, 12, 15, 22, 34, 46, 47, 80, 83, 85, 87 and/or 89, preferably selected from the group consisting of 9Ala→Ser, 12Ala→Ser, (15Leu→Val, 15Leu→Pro, 22Ser→Thr, 34Asn→Gln, 46Gln→Lys, 47Ala→Pro, 80Asp→Asn, 83Glu→Gln, 85Asp→Glu, 87Ala→Thr and 89Thr→Asn, or wherein the functionally active variant of SEQ ID NO:1 comprises the following mutations (LC1), i.e. 9Ala→Ser or 15Leu→Val or 46Gln→Lys or 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 15Leu→Val or 9Ala→Ser and 46Gln→Lys or 9Ala→Ser and 83Glu→Gln or 15Leu→Val and 46Gln→Lys or 15Leu→Val and 83Glu→Gln or 46Gln→Lys and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 46Gln→Lys or 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 46Gln→Lys and 83Glu→Gln or 15Leu→Val and 46Gln→Lys and 83Glu→Gln or LC1 of table 5: 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 46Gln→Lys and 83Glu→Gln, or wherein the functionally active variant of SEQ ID NO:1 comprises the following mutations (LC2), i.e. 9Ala→Ser or 15Leu→Val or 34Asn→Gln or 46Gln→Lys or 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 15Leu→Val or 9Ala→Ser and 34Asn→Gln or 9Ala→Ser and 46Gln→Lys or 9Ala→Ser and 83Glu→Gln or 15Leu→Val and 34Asn→Gln or 15Leu→Val and 46Gln→Lys or 15Leu→Val and 83Glu→Gln or 34Asn→Gln and 46Gln→Lys or 34Asn→Gln and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 34Asn→Gln or 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 46Gln→Lys or 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 34Asn→Gln and 46Gln→Lys or 9Ala→Ser and 34Asn→Gln and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 46Gln→Lys and 83Glu→Gln or 15Leu→Val and 34Asn→Gln and 46Gln→Lys or 15Leu→Val and 34Asn→Gln and 83Glu→Gln or 15Leu→Val and 46Gln→Lys and 83Glu→Gln or 34Asn→Gln and 46Gln→Lys and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 34Asn→Gln and 46Gln→Lys or 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 34Asn→Gln and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 46Gln→Lys and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 34Asn→Gln and 46Gln→Lys and 83Glu→Gln or 15Leu→Val and 34Asn→Gln and 46Gln→Lys and 83Glu→Gln or LC2 of table 5: 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 34Asn→Gln and 46Gln→Lys and 83Glu→Gln, or wherein the functionally active variant of SEQ ID NO:1 comprises the following mutations (LC3), i.e. 9Ala→Ser or 12Ala→Ser or 15Leu→Val or 83Glu→Gln or 85Asp→Glu or

9Ala→Ser and 12Ala→Ser or 9Ala→Ser and 15Leu→Val or 9Ala→Ser and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 85Asp→Glu or 12Ala→Ser and 15Leu→Val or 12Ala→Ser and 83Glu→Gln or 12Ala→Ser and 85Asp→Glu or 15Leu→Val and 83Glu→Gln or 15Leu→Val and 85Asp→Glu or 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 15Leu→Val or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 83Glu→Gln or 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 85Asp→Glu or 12Ala→Ser and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or 15Leu→Val and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or (LC3) according to table 5: 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu, or wherein the functionally active variant of SEQ ID NO:1 comprises the following mutations (LC4), i.e. 9Ala→Ser or 12Ala→Ser or 15Leu→Val or 34Asn→Gln or 83Glu→Gln or 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser or 9Ala→Ser and 15Leu→Val or 9Ala→Ser and 34Asn→Gln or 9Ala→Ser and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 85Asp→Glu or 12Ala→Ser and 15Leu→Val or 12Ala→Ser and 34Asn→Gln or 12Ala→Ser and 83Glu→Gln or 12Ala→Ser and 85Asp→Glu or 15Leu→Val and 34Asn→Gln or 15Leu→Val and 83Glu→Gln or 15Leu→Val and 85Asp→Glu or 34Asn→Gln and 83Glu→Gln or 34Asn→Gln and 85Asp→Glu or 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 15Leu→Val or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 34Asn→Gln or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 34Asn→Gln or 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 34Asn→Gln and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 34Asn→Gln and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 34Asn→Gln or 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 83Glu→Gln or 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 85Asp→Glu or 12Ala→Ser and 34Asn→Gln and 83Glu→Gln or 12Ala→Ser and 34Asn→Gln and 85Asp→Glu or 12Ala→Ser and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or 15Leu→Val and 34Asn→Gln and 83Glu→Gln or 15Leu→Val and 34Asn→Gln

and 85Asp→Glu or 15Leu→Val and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or 34Asn→Gln and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 34Asn→Gln or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 34Asn→Gln and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 34Asn→Gln and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 34Asn→Gln and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 34Asn→Gln and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 34Asn→Gln and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 34Asn→Gln and 83Glu→Gln or 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 34Asn→Gln and 85Asp→Glu or 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or 12Ala→Ser and 34Asn→Gln and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 34Asn→Gln and 83Glu→Gln or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 34Asn→Gln and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 34Asn→Gln and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or 9Ala→Ser and 15Leu→Val and 34Asn→Gln and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 34Asn→Gln and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu or (LC4) according to table 5: 9Ala→Ser and 12Ala→Ser and 15Leu→Val and 34Asn→Gln and 83Glu→Gln and 85Asp→Glu, or wherein the functionally active variant of SEQ ID NO:1 comprises the following mutations (LC5), i.e. 15Leu→Pro, 22Ser→Thr, 47Ala→Pro, 80Asp→Asn, 87Ala→Thr, 89Thr→Asn or 15Leu→Pro and 22Ser→Thr or 15Leu→Pro and 47Ala→Pro or 15Leu→Pro and 80Asp→Asn or 15Leu→Pro and 87Ala→Thr or 15Leu→Pro and 89Thr→Asn or 22Ser→Thr and 47Ala→Pro or 22Ser→Thr and 80Asp→Asn or 22Ser→Thr and 87Ala→Thr or 22Ser→Thr and 89Thr→Asn or 47Ala→Pro and 80Asp→Asn or 47Ala→Pro and 87Ala→Thr or 47Ala→Pro and 89Thr→Asn or 80Asp→Asn and 87Ala→Thr or 80Asp→Asn and 89Thr→Asn or 87Ala→Thr and 89Thr→Asn or 15Leu→Pro and 22Ser→Thr and 47Ala→Pro or 15Leu→Pro and 22Ser→Thr and 80Asp→Asn or 15Leu→Pro and 22Ser→Thr and 87Ala→Thr or 15 Leu→Pro and 22Ser→Thr and 89Thr→Asn or 15Leu→Pro and 47Ala→Pro and 80Asp→Asn or 15Leu→Pro and 47Ala→Pro and 87Ala→Thr or 15Leu→Pro and 47Ala→Pro and 89Thr→Asn or 15Leu→Pro and 80Asp→Asn and 87Ala→Thr or 15Leu→Pro and 80Asp→Asn and 89Thr→Asn or 15Leu→Pro and 87Ala→Thr

and 89Thr→Asn or 22Ser→Thr and 47Ala→Pro and 80Asp→Asn or 22Ser→Thr and 47Ala→Pro and 87Ala→Thr or 22Ser→Thr and 47Ala→Pro and 89Thr→Asn or 22Ser→Thr and 80Asp→Asn and 87Ala→Thr or 22Ser→Thr and 80Asp→Asn and 89Thr→Asn or 22Ser→Thr and 87Ala→Thr and 89Thr→Asn or 47Ala→Pro and 80Asp→Asn and 87Ala→Thr or 47Ala→Pro and 80Asp→Asn and 89Thr→Asn or 47Ala→Pro and 87Ala→Thr and 89Thr→Asn or 80Asp→Asn and 87Ala→Thr and 89Thr→Asn or 15Leu→Pro and 22Ser→Thr and 47Ala→Pro and 80Asp→Asn or 15Leu→Pro and 22Ser→Thr and 47Ala→Pro and 87Ala→Thr or 15Leu→Pro and 22Ser→Thr and 47Ala→Pro and 89Thr→Asn or 15Leu→Pro and 22Ser→Thr and 80Asp→Asn and 87Ala→Thr or 15Leu→Pro and 22Ser→Thr and 80Asp→Asn and 89Thr→Asn or 15Leu→Pro and 22Ser→Thr and 87Ala→Thr and 89Thr→Asn or 15Leu→Pro and 47Ala→Pro and 80Asp→Asn and 87Ala→Thr or 15Leu→Pro and 47Ala→Pro and 80Asp→Asn and 89Thr→Asn or 15Leu→Pro and 47Ala→Pro and 87Ala→Thr and 89Thr→Asn or 15Leu→Pro and 80Asp→Asn and 87Ala→Thr and 89Thr→Asn or 22Ser→Thr and 47Ala→Pro and 80Asp→Asn and 87Ala→Thr or 22Ser→Thr and 47Ala→Pro and 80Asp→Asn and 89Thr→Asn or 22Ser→Thr and 47Ala→Pro and 87Ala→Thr and 89Thr→Asn or 22Ser→Thr and 80Asp→Asn and 87Ala→Thr and 89Thr→Asn or 47Ala→Pro and 80Asp→Asn and 87Ala→Thr and 89Thr→Asn or 15Leu→Pro and 22Ser→Thr and 47Ala→Pro and 80Asp→Asn and 87Ala→Thr or 15Leu→Pro and 22Ser→Thr and 47Ala→Pro and 80Asp→Asn and 89Thr→Asn or 15Leu→Pro and 22Ser→Thr and 47Ala→Pro and 87Ala→Thr and 89Thr→Asn or 15Leu→Pro and 22Ser→Thr and 80Asp→Asn and 87Ala→Thr and 89Thr→Asn or 22Ser→Thr and 47Ala→Pro and 80Asp→Asn and 87Ala→Thr and 89Thr→Asn or (LC5) according to table 5: 15Leu→Pro and 22Ser→Thr and 47Ala→Pro and 80Asp→Asn and 87Ala→Thr and 89Thr→Asn and/or wherein the functionally active variant of SEQ ID NO: 2 comprises one or more mutations at amino acids positions 5, 7, 11, 12, 17, 20, 38, 40, 43, 55, 61, 65, 66, 67, 76, 81, 82, 87, 91, 93, 112, 113 and/or 116, particularly selected from the group consisting of 5His→Val, 7Pro→Ser, 11Leu→Val, 12Val→Lys, 17Pro→Ser, 20Leu→Val, 38Lys→Arg, 40Arg→Ala, 43Arg→Gln, 55Asp→Glu, 61Asn→Ala, 65Lys→Gln, 66Asp→Gly, 67Lys→Arg, 76Ser→Thr, 81Ile→Met, 82Gln→Glu, 87Thr→Arg, 91Ser→Thr, 93Val→Lys, 112Thr→Leu, 113Leu→Val and 116Ser→Val or wherein the functionally active variant of SEQ

ID NO:2 comprises the following mutations (HC1), i.e. 43Arg→Gln or 67Lys→Arg or 116Ser→Val or 43Arg→Gln and 67Lys→Arg or 43Arg→Gln and 116Ser→Val or 67Lys→Arg and 116Ser→Val or (HC1) according to table 6: 43Arg→Gln and 67Lys→Arg and 116Ser→Val, or wherein the functionally active variant of SEQ ID NO:2 comprises the following mutations (HC2), i.e. 43Arg→Gln or 55Asp→Glu or 67Lys→Arg or 116Ser→Val or 43Arg→Gln and 55Asp→Glu or 43Arg→Gln and 67Lys→Arg or 43Arg→Gln and 116Ser→Val or 55Asp→Glu and 67Lys→Arg or 55Asp→Glu and 116Ser→Val or 67Lys→Arg and 116Ser→Val or 43Arg→Gln and 55Asp→Glu and 67Lys→Arg or 43Arg→Gln and 55Asp→Glu and 116Ser→Val or 43Arg→Gln and 67Lys→Arg and 116Ser→Val or 55Asp→Glu and 67Lys→Arg and 116Ser→Val or (HC2) according to table 6: 43Arg→Gln and 55Asp→Glu and 67Lys→Arg and 116Ser→Val, or wherein the functionally active variant of SEQ ID NO:2 comprises the following mutations (HC3), i.e. 17Pro→Ser or 116Ser→Val or (HC3) according to table 6: 17Pro→Ser and 116Ser→Val, or wherein the functionally active variant of SEQ ID NO:2 comprises the following mutations (HC4), i.e.: 17Pro→Ser or 93Val→Lys or 116Ser→Val or 17Pro→Ser and 93Val→Lys or 17Pro→Ser and 116Ser→Val or 93Val→Lys and 116Ser→Val or (HC4) according to table 6: 17Pro→Ser and 93Val→Lys and 116Ser→Val, or wherein the functionally active variant of SEQ ID NO:2 comprises the following mutations (HC5), i.e.: 17Pro→Ser or 55Asp→Glu or 116Ser→Val or 17Pro→Ser and 55Asp→Glu or 17Pro→Ser and 116Ser→Val or 55Asp→Glu and 116Ser→Val or (HC5) according to table 6: 17Pro→Ser and 55Asp→Glu and 116Ser→Val, or wherein the functionally active variant of SEQ ID NO:2 comprises the following mutations (HC6), i.e.: 12Val→Lys or 55Asp→Glu or 93Val→Lys or 116Ser→Val or 12Val→Lys and 55Asp→Glu or 12Val→Lys and 93Val→Lys or 12Val→Lys and 116Ser→Val or 55Asp→Glu and 93Val→Lys or 55Asp→Glu and 116Ser→Val or 93Val→Lys and 116Ser→Val or 12Val→Lys and 55Asp→Glu and 93Val→Lys or 12Val→Lys and 55Asp→Glu and 116Ser→Val or 12Val→Lys and 93Val→Lys and 116Ser→Val or 55Asp→Glu and 93Val→Lys and 116Ser→Val or (HC6) according to table 6: 12Val→Lys and 55Asp→Glu and 93Val→Lys and 116Ser→Val, or wherein the functionally active variant of SEQ ID NO:2 comprises 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or all of the following mutations (HC6) 5His→Val, 7Pro→Ser, 11Leu→Val, 12Val→Lys, 17Pro→Ser, 20Leu→Val, 38Lys→Arg, 40Arg→Ala, 43Arg→Gln,

61Asn→Ala, 65Lys→Gln, 66Asp→Gly, 67Lys→Arg, 76Ser→Thr, 81Ile→Met, 82Gln→Glu, 87Thr→Arg, 91Ser→Thr, 112Thr→Leu, 113Leu→Val.

The positions and mutations have been introduced based on the consideration described in the Examples in the context of Tables 4, 5 and 6. There may be only one mutation, or a combination of mutations, particularly any of the combinations given in Tables 4, 5 and 6. Moreover, the peptide or peptide complex may comprise one or more of the mutations of one of the variant light chains as listed above together with one or more of the variant heavy chains as listed above, e.g. comprise or consist of one of the following combinations of mutations/functional variants: LC1 and HC1, LC1 and HC2, LC1 and HC3, LC1 and HC4, LC1 and and HC5, LC1 and HC6, LC1 and HC7, LC2 and HC1, LC2 and HC2, LC2 and HC3, LC2 and HC4, LC2 and HC5, LC2 and HC6, LC2 and HC7, LC3 and HC1, LC3 and HC2, LC3 and HC3, LC3 and HC4, LC3 and HC5, LC3 and HC6, LC3 and HC7, LC4 and HC1, LC4 and HC2, LC4 and HC3, LC4 and HC4, LC4 and HC5, LC4 and HC6, LC4 and HC7, LC5 and HC1, LC5 and HC2, LC5 and HC3, LC5 and HC4, LC5 and and HC5, LC5 and HC6, LC5 and HC7.

Additionally, it may be desirable, to add a marker e.g. for detection or purification of the peptide or peptide complex of the invention. Suitable markers include without limitation a tag (e.g. 6 His (or HexaHis) tag, 7 His, 8 His, GlyGlyGlyGlySer, $(GlyGlyGlyGlySer)_2$ Strep tag, HA tag, c-myc tag or glutathione S-transferase (GST) tag), fluorescence marker (e.g. FITC, fluorescein, rhodamine, Cy dyes or Alexa), enzyme label (e.g. penicillinase, horseradish peroxidase and alkaline phosphatase), a radiolabel (e.g. ^{3}H, ^{32}P, ^{35}S, ^{125}I or ^{14}C). Additionally, the polypeptide (complex) may be add to a support, particularly a solid support such as an array, bead (e.g. glass or magnetic), a fiber, a film etc. The skilled person will be able to adapt the binding molecule comprising the polypeptide or polypeptide complex of the present invention and a further component to the intended use by choosing a suitable further component.

According to another embodiment of present invention, the peptide or peptide complex exhibits one or more of the following characteristics A-E (i.e. A or B or C or D or E or A and B or A and C or A and D or A and E or B and C or B and D or B and E or C and D or C and E or A and B and C or A and B and D or A and B and D or A and B and E or A and C and D or A and C and E

or A and D and E or B and C and D or B and C and E or B and D and E or A and B and C and D or A and B and C and E or A and C and D and E or B and C and D and E or A and B and C and E:

A) kinetic binding constants (as determined by surface plasmon resonance, e.g by Biacore) according to the data provided in table 11.

B) a molecular mass for the light chain as follows: 23.73+/-0.05 kDa or 23.73 kDa (LC1) or of 23.74 +/-0.05 kDa or 23.7 kDa (LC2) or 23.75 +/-0.05 kDa or 23.8 kDa (LC3) or of 23.77 +/-0.05 kDa or of 23.77 kDa (LC4) or of 23.79 +/-0.05 kDa or 23.79 kDa (LC5) of 50.31 +/-0.05 kDA and/or a molecular mass for the heavy chain as follows: 50.31 kDa (HC1) or of 50.33 +/-0.05 kDA or of 50.33 kDa (HC2) or of 50.30 +/- 0.05 kDa or of 50.30 kDa (HC3) or of 50.33 +/-0.05 kDa or of 50.33 kDa (HC4) or of 50.32 +/- 0.05 kDa or of 50.32 kDa (HC5) or of 50.35 +/-0.05 kDa or of 50.35 kDa (HC6) or of 50.19 +/- 0.05 kDa or of 50.19 kDa (HC7),

C) inhibition of binding of washed human platelets to collagen with an IC50 µg/ml value of <0,1, <0,09, <0,08, <0,07, <0,06, <0,05, <0,04, <0,03, <0,02 or < 0,01 as determined under static conditions,

D) inhibition of binding of human platelets from platelet-rich plasma to collagen with an IC50 µg/ml of <0,3, <0,2, <0,1, <0,15, <0,14 or <0,13 as determined under static conditions,

E) an aggregation percentage as determined by size exclusion chromatography of <10, <9, <8, <7, <6, <5, <4, <3, <2,5, <2, <1,5, <1 or <0,5%.

In a fifth aspect, the present invention relates to one or more nucleic acid(s) coding for the peptide or peptide complex according to the present invention.

Nucleic acid molecules of the present invention may be in the form of RNA, such as mRNA or cRNA, or in the form of DNA, including, for instance, cDNA and genomic DNA e.g. obtained by cloning or produced by chemical synthetic techniques or by a combination thereof. The DNA may be triple-stranded, double- stranded or single-stranded. Single-stranded DNA may be the coding strand, also known as the sense strand, or it may be the non-coding strand, also referred to as the anti-sense strand. Nucleic acid molecule as used herein also refers to, among other, single- and double- stranded DNA, DNA that is a mixture of single- and double-stranded RNA, and RNA that is a mixture of single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-stranded or, more typically, double-stranded, or triple-

stranded, or a mixture of single- and double-stranded regions. In addition, nucleic acid molecule as used herein refers to triple-stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA.

Additionally, the nucleic acid may contain one or more modified bases. Such nucleic acids may also contain modifications e.g. in the ribose-phosphate backbone to increase stability and half life of such molecules in physiological environments. Thus, DNAs or RNAs with backbones modified for stability or for other reasons are "nucleic acid molecule" as that feature is intended herein. Moreover, DNAs or RNAs comprising unusual bases, such as inosine, or modified bases, such as tritylated bases, to name just two examples, are nucleic acid molecule within the context of the present invention. It will be appreciated that a great variety of modifications have been made to DNA and RNA that serve many useful purposes known to those of skill in the art. The term nucleic acid molecule as it is employed herein embraces such chemically, enzymatically or metabolically modified forms of nucleic acid molecule, as well as the chemical forms of DNA and RNA characteristic of viruses and cells, including simple and complex cells, inter alia. For example, nucleotide substitutions can be made which do not affect the polypeptide encoded by the nucleic acid, and thus any nucleic acid molecule which encodes an antigen or fragment or functional active variant thereof as defined above is encompassed by the present invention.

Furthermore, any of the nucleic acid molecules encoding one or more polypeptides of the invention including fragments or functionally active variants thereof can be functionally linked, using standard techniques such as standard cloning techniques, to any desired regulatory sequence, leader sequence, heterologous marker sequence or a heterologous coding sequence to create a fusion protein.

The nucleic acid of the invention may be originally formed *in vitro* or in a cell in culture, in general, by the manipulation of nucleic acids by endonucleases and/or exonucleases and/or polymerases and/or ligases and/or recombinases or other methods known to the skilled practitioner to produce the nucleic acids.

In another embodiment of the different aspects of the present invention, the nucleic acid(s) is/are located in a vector. A vector may additionally include nucleic acid sequences that permit it to replicate in the host cell, such as an origin of replication, one or more therapeutic genes and/or

selectable marker genes and other genetic elements known in the art such as regulatory elements directing transcription, translation and/or secretion of the encoded protein. The vector may be used to transduce, transform or infect a cell, thereby causing the cell to express nucleic acids and/or proteins other than those native to the cell. The vector optionally includes materials to aid in achieving entry of the nucleic acid into the cell, such as a viral particle, liposome, protein coating or the like. Numerous types of appropriate expression vectors are known in the art for protein expression, by standard molecular biology techniques. Such vectors are selected from among conventional vector types including insects, e.g., baculovirus expression, or yeast, fungal, bacterial or viral expression systems. Other appropriate expression vectors, of which numerous types are known in the art, can also be used for this purpose. Methods for obtaining such expression vectors are well-known (see, e.g. Sambrook et al, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)). In one embodiment, the vector is a viral vector. Viral vectors include, but are not limited to, retroviral and adenoviral vectors.

Suitable host cells or cell lines for transfection by this method include bacterial cells. For example, the various strains of *E. coli* are well-known as host cells in the field of biotechnology. Various strains of *B. subtilis*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, and other bacilli and the like may also be employed in this method. Many strains of yeast cells known to those skilled in the art are also available as host cells for expression of the peptides of the present invention. Other fungal cells or insect cells such as *Spodoptera frugipedera* (Sf9) cells may also be employed as expression systems. Alternatively, mammalian cells, such as human 293 cells, Chinese hamster ovary cells (CHO), the monkey COS-1 cell line or murine 3T3 cells derived from Swiss, BALB/c or NIH mice may be used. Still other suitable host cells, as well as methods for transfection, culture, amplification, screening, production, and purification are known in the art.

In one embodiment of the different aspects of present invention, a hybridoma cell line can be used, the hybridoma cell line expressing desirable monoclonal antibodies generated by well-known conventional techniques. In the context of the present invention the hybridoma cell is able to produce an antibody specifically binding to $\alpha 2$ integrin, particularly to $\alpha 2\beta 1$ integrin. The hybridoma cell can be generated by fusing a normal-activated, antibody-producing B cell with a myeloma cell. In particular, the hybrodoma cell may be produced as follows: B-cells are

removed from the spleen of an animal that has been challenged with the relevant antigen. These B-cells are then fused with myeloma tumor cells that can grow indefinitely in culture. This fusion is performed by making the cell membranes more permeable. The fused hybrid cells (called hybridomas), being cancer cells, will multiply rapidly and indefinitely and will produce large amounts of the desired antibodies. They have to be selected and subsequently cloned by limiting dilution. Supplemental media containing Interleukin-6 (such as briclone) are usually essential for this step. Selection occurs via culturing the newly fused primary hybridoma cells in selective-media, specifically media containing 1 x concentration HAT for roughly 10–14 days. After using HAT it is often desirable to use HT containing media. Cloning occurs after identification of positive primary hybridoma cells.

A peptide or peptide complex of the invention may be produced by expressing a nucleic acid of the invention in a suitable host cell. Accordingly, in another aspect, the present invention relates to a method for producing a peptide or peptide complex according to the invention comprising culturing the host cell comprising the nucleic acid(s) of the invention under conditions permitting expression of the antibody and optionally recovering the peptide or peptide complex from the host cell.

For this, host cells can be transfected, e.g. by conventional means such as electroporation with at least one expression vector containing a nucleic acid of the invention under the control of a transcriptional regulatory sequence. The transfected or transformed host cell is then cultured under conditions that allow expression of the protein. The expressed protein is recovered, isolated, and optionally purified from the cell (or from the culture medium, if expressed extracellularly) by appropriate means known to one of skill in the art. For example, the proteins are isolated in soluble form following cell lysis, or extracted using known techniques, e.g. in guanidine chloride. If desired, the polypeptide(s) of the invention are produced as a fusion protein. Such fusion proteins are those described above. Alternatively, for example, it may be desirable to produce fusion proteins to enhance expression of the protein in a selected host cell or to improve purification. The molecules comprising the polypeptides of this invention may be further purified using any of a variety of conventional methods including, but not limited to: liquid chromatography such as normal or reversed phase, using HPLC, FPLC and the like; affinity chromatography (such as with inorganic ligands or monoclonal antibodies); size

exclusion chromatography; immobilized metal chelate chromatography; gel electrophoresis; and the like. One of skill in the art may select the most appropriate isolation and purification techniques without departing from the scope of this invention. Such purification provides the antigen in a form substantially free from other proteinaceous and non-proteinaceous materials of the microorganism.

Suitable host cells are e.g. eukaryotic cells or cell lines derived from multicellular organisms (such as defined above, e.g. CHO cells or BHK cells), eukaryotic single cell organisms such as yeast (e.g. s. pombe or *s. cerevisiae*) or procaryotic cells such as e. coli. A big variety of suitable host cells is known in the art.

One embodiment of the different aspects of present invention relates to a recombinant cell producing the peptide or peptide complex, wherein the peptide or peptide complex is heterologously expressed by said cell/host cell. Heterologous expression of a peptide or protein (here: peptide or peptide complex) means that the recombinant cell is derived from a cell that does not naturally express the peptide or protein or peptide complex and which has been modified (e.g. transfected or transformed) to express it; e.g. carrying a nucleic acid (such as an artificial nucleic acid construct (a vector) carrying an insert coding for the peptide or peptide complex) allowing for the expression of said peptide or peptide complex, such as an antibody or fragment thereof, by said cell. The recombinant cell may be derived from any cell, cell line or host cells as defined above, including eukaryotic as well as procaryotic cells.

Accordingly, a sixth aspect of present invention relates to a cell heterologously expressing one of the nucleic acids of present invention.

In a seventh aspect, present invention relates to a method for producing a peptide or peptide complex of present invention comprising culturing the cell according to present invention under conditions permitting expression of the peptide or peptide complex and optionally recovering the peptide or peptide complex from the host cell.

An eighth aspect of the present invention relates to a composition comprising at least one peptide or peptide complex or a conjugate comprising the peptide or peptide complex according the invention and/or at least one nucleic acid according to the invention for use as a medicament.

The (pharmaceutical) composition of the present invention may further encompass pharmaceutically acceptable carriers and/or excipients. The pharmaceutically acceptable carriers and/or excipients useful in this invention are conventional and may include buffers, stabilizers, diluents, preservatives, and solubilizers. Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975), describes compositions and formulations suitable for pharmaceutical delivery of the polypeptides/nucleic acids disclosed herein. The content of the active ingredient (polypeptide or nucleic acid) in the pharmaceutical composition is not limited as far as it is useful for treating or preventing, but preferably contains 0.0000001-10% by weight per total composition.

In general, the nature of the carrier or excipients will depend on the particular mode of administration being employed. For instance, parenteral formulations usually comprise injectable fluids that include pharmaceutically and physiologically acceptable fluids such as water, physiological saline, balanced salt solutions, aqueous dextrose, glycerol or the like as a vehicle. For solid compositions (e. g. powder, pill, tablet, or capsule forms), conventional non-toxic solid carriers can include, for example, pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, or magnesium stearate. In addition to biologically neutral carriers, pharmaceutical compositions to be administered can contain minor amounts of non-toxic auxiliary substances, such as wetting or emulsifying agents, preservatives, and pH buffering agents and the like, for example sodium acetate or sorbitan monolaurate.

Generally, an appropriate amount of a pharmaceutically acceptable salt is used in the carrier to render the formulation isotonic. Examples of the carrier include but are not limited to saline, Ringer's solution and dextrose solution. Preferably, acceptable excipients, carriers, or stabilisers are preferably non-toxic at the dosages and concentrations employed, including buffers such as citrate, phosphate, and other organic acids; salt-forming counter-ions, e.g. sodium and potassium; low molecular weight (> 10 amino acid residues) polypeptides; proteins, e.g. serum albumin, or gelatine; hydrophilic polymers, e.g. polyvinylpyrrolidone; amino acids such as

histidine, glutamine, lysine, asparagine, arginine, or glycine; carbohydrates including glucose, mannose, or dextrins; monosaccharides; disaccharides; other sugars, e.g. sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; chelating agents, e.g. EDTA; non-ionic surfactants, e.g. Tween, Pluronics or polyethylene glycol; antioxidants including methionine, ascorbic acid and tocopherol; and/or preservatives, e.g. octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens, e.g. methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol).

The pharmaceutical composition encompasses at least one peptide, peptide complex or nucleic acid of the invention; however, it may also contain a cocktail (i.e., a simple mixture) containing one or more different peptides and/or peptide complexes and/or nucleic acids of the invention. The peptide(s) or peptide complex(es) of the present invention may also be used in the form of a pharmaceutically acceptable salt. Suitable acids and bases which are capable of forming salts with the peptides of the present invention are well known to those of skill in the art, and include inorganic and organic acids and bases.

Preferably, the pharmaceutical composition may be used for treating or preventing an α2 integrin-related disease or disorder. In the context of present invention, an 2 integrin-related disease or disorder can be understood as any unwanted condition of the body that involves, is caused, contributed to or affected by one or more of α2-integrin functions or activities. Examples include signaling pathways or processes involving α2 integrin mediating aberrant cellular reactions such as collagen-mediated increased or aberrant cellular proliferation or cytokine secretion, resulting e.g. in neo-angiogenesis, inflammatory conditions or wound healing disorders. Specific examples comprise (but are not limited to): Thrombosis, vascular disease, cancer, including neo-angiogenesis and metastasis, pancreatic cancer, colon cancer, e.g. metastatic spreading of colon cancer to other organs (e.g. lung and liver) and melanoma, inflammation, inflammatory disease, autoimmune disease and a disease characterized by abnormal or increase angiogenesis, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, reactions to transplant, optical neuritis, spinal cord trauma, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus (SLE), multiple sclerosis, Reynaud's syndrome, Sjorgen's syndrome, scleroderma, cardiovascular disease, psoriasis, atherosclerosis, and infections that induce an inflammatory response.

In one embodiment of the present invention, the pharmaceutical composition may be used for treating or preventing a vascular disease and/or thrombosis, particularly in the treatment of certain clinical indications, as for example acute coronary syndrome, percutaneous coronary intervention, ischemic stroke, carotid artery stenosis or peripheral arterial occlusive disease.

In the context of present invention, the treatment or prevention can affect any animal (non-human or human, especially mammals such as humans, farm animals or pet animals) in need of treatment (i.e. in order to lessen or abolish the diseased state or disorder or in order to prevent or delay the onset of the diseased state or disorder in inviduals that do not yet display the diseased state or disorder).

$\alpha 2\beta 1$ integrin is an interesting target in the treatment or prevention of thrombosis. In vivo studies with $\alpha 2\beta 1$ knock-out mice showed decreased thrombus formation and increased time to occlusion in arterial thrombosis models as well as prolonged tail bleeding times. In clinical studies relating to $\alpha 2$ integrin deficiency and polymorphisms, patients showed mild to severe bleeding disorder and defective collagen response of platelets. The polymorphism leads to increased expression of $\alpha 2\beta 1$, resulting in an independent risk factor for non fatal myocardial infarction in individuals < age 62, increased risk of stroke in patients < age 50, and increased risk for development of diabetic retinopathy in type II diabetics. Furthermore, platelets and $\alpha 2$ integrin are involved in angiogenesis, tumor progression/metastasis. Accordingly, cancer is a further interesting therapeutic field. Inhibition of $\alpha 2$ integrin has been shown to antagonizes stromal tumor invasion *in vitro* and Integrin-ECM/$\alpha 2$ integrin-mediated type I collagen adhesion in particular is involved in the promotion of the malignant phenotype in pancreatic cancer *in vitro*. *In vivo*, anti-$\alpha 2$ antagonistic mAbs prevent operation-induced augmentation of liver metastases in a rat model inhibit differentiation of multipotent human colorectal cancer cells and suppress the growth and vascularization of human squamous cell carcinoma xenografts.

For colorectal cancer it has been shown that removal of primary colorectal carcinoma may paradoxically increase the risk of metastases development, because accumulating evidence suggests that surgical trauma can stimulate tumor growth. Manipulation of the primary tumour

during surgery results in tumor cell detachment which overcomes the need of complex cellular changes. In addition, operative trauma induces exposure of subendothelial ECM and thereby facilitates binding through commonly expressed integrins, promoting tumor cell adherence. In an animal model, blocking α2 integrin on tumor cells completely abrogated operation-induced adhesion and completely reverted the enhanced outgrowth of liver metastases after abdominal surgery.

For pancreatic cancer, current therapy is often unsufficient, because it extends life by only 4 months. Integrin-ECM and α2β1-integrin mediated type I collagen adhesion in particular are involved in the promotion of the malignant phenotype in pancreatic cancer *in vitro*. Studies in animal models using inhibitors of α2β1 integrin function such as mAbs are warranted and should be evaluated for therapeutic efficacy in the treatment of pancreatic cancer.

Based on these findings, a functional blocking of α2 and/or a2β1 integrin may provide an interesting therapeutic opportunity, in particular for colorectal and pancreatic cancer.

A ninth aspect of the present invention relates to a method of diagnosing a disease associated with altered α2 integrin expression, the method comprising

a) contacting a sample from a subject comprising α2 integrin with the peptide or peptide complex of the invention;

b) detecting binding of α2 integrin to the peptide or peptide complex; and

c) comparing the binding of step b) with a reference,

wherein an altered α2 integrin binding in the sample relative to the reference is indicative of the disease. The altered binding can e.g. be identified by an altered signal (i.e. an increased or decreased signal) as detected in step b in comparison with a reference sample.

The peptide (complex) of the present invention may also be used for diagnostic assays. As detailed above altered expression of α2 integrin and/or mutations thereof may be associate with particular diseases. Accordingly, the peptide (complex) may be used to determine binding to α2 integrin. If binding (quantitatively or qualitatively) relative to a control or reference is changed, this may be indicative of a disease.

Accordingly, another aspect of present invention relates to a method of diagnosing a disease associated with altered α2 integrin, the method comprising

a) contacting a taken sample of an individual with the peptide or peptide complex of present invention; and

b) detecting binding of α2 integrin to the peptide or peptide complex; and

c) comparing the binding of step b) with the binding of α2 integrin to the peptide or peptide complex in one or more reference samples,

wherein an altered binding in the taken sample relative to the binding detected in the one or more reference samples is indicative of the disease.

Generally, a test sample obtained from a subject can be contacted with the peptide (complex) of the invention that specifically binds α2 integrin. Optionally, the peptide (complex) can be fixed to a solid support prior to contacting the antibody with a test sample to facilitate washing and subsequent isolation of the complex. Examples of solid supports include glass or plastic in the form of, for example, a microtiter plate, a glass microscope slide or cover slip, a stick, a bead, or a microbead.

After incubating the sample with antibodies, the mixture is washed and the peptide (complex) /α2 integrin /complexes formed can be detected. This can be accomplished by incubating the washed mixture with a detection reagent. This detection reagent may be by use of a detectable label. A variety of labels and detection methods are known to the skilled person. In terms of the detectable label, any detectable label known in the art can be used. For example, the detectable label can be a radioactive label (such as, e.g., ^{3}H, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, ^{32}P, and ^{33}P), an enzymatic label (such as, for example, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, and the like), a chemiluminescent label (such as, for example, acridinium esters, acridinium thioesters, acridinium sulfonamides, phenanthridinium esters, luminal, isoluminol and the like), a fluorescence label (such as, for example, fluorescein (for example, 5-fluorescein, 6-carboxyfluorescein, 3′6-carboxyfluorescein, 5(6)-carboxyfluorescein, 6-hexachloro-fluorescein, 6-tetrachlorofluorescein, fluorescein isothiocyanate, and the like)), rhodamine, phycobiliproteins, R-phycoerythrin, quantum dots (for example, zinc sulfide-capped cadmium

selenide), a thermometric label, a tag (as defined above) or an immuno-polymerase chain reaction label.

Throughout the assays, incubation and/or washing steps may be required after each combination of reagents. Incubation steps can vary from about 5 seconds to several hours, preferably from about 5 minutes to about 24 hours. However, the incubation time will depend upon the assay format, biomarker (antigen), volume of solution, concentrations and the like. Usually the assays will be carried out at ambient temperature, although they can be conducted over a range of temperatures, such as 10° C. to 40° C.

As a matter of convenience, the peptide (complex) can be provided in a kit, such as a packaged combination of reagents in predetermined amounts with instructions, including for performing a diagnostic assay. Where the peptide (complex) is labeled with an enzyme, the kit will include substrates and cofactors required by the enzyme (e.g., a substrate precursor which provides the detectable chromophore or fluorophore). Other additives may be included in the kit such as stabilizers, buffers (e.g., a block buffer or lysis buffer) and the like. The relative amounts of the various reagents provided in I he kit may be varied widely, for example, to provide for concentrations in solution of the reagents which substantially optimize the sensitivity of the assay. The reagents may be provided as dry powders, usually lyophilized, including excipients, for example, which on dissolution will provide a reagent solution having the appropriate concentration.

The reference may be a sample from a healthy subject or determined at a group of healthy subjects: Alternatively, it may be a known reference value. The person skilled in the art knows statistical procedures to assess whether two values are significantly different from each other such as Student's t-test or chi-square tests. Furthermore, the skilled person knows how to select a suitable control.

The terms "sample from a subject" and "test sample" relates to all biological fluids, excretions and tissues isolated from any given subject, particularly a human. In the context of the present invention such samples include, but are not limited to, blood, blood serum, blood plasma, nipple aspirate, urine, semen, seminal fluid, seminal plasma, prostatic fluid, excreta, tears, saliva, sweat,

biopsy, ascites, cerebrospinal fluid, milk, lymph, bronchial and other lavage samples, or tissue extract samples. Typically, blood samples are preferred test samples for use in the context of the present invention.

In a tenth aspect, present invention relates to an article of manufacture comprising

a) a packaging material (e.g. one or more containers for the peptide or peptide complex and the label or package insert)

b) a peptide or peptide complex of present invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

c) a label (e.g. comprising written information and/or a bar code and/or any other kind of information) or a package insert (i.e. any kind of data carrier such as a chip, a leaflet, a booklet etc.), the insert contained within said packaging material indicating that said peptide or peptide complex is effective for treatment of a disease or disorder, especially an α 2 integrin-related disease disorder, such as herein defined.

In an eleventh aspect, present invention relates to a diagnostic kit for the diagnosis of an α 2-integrin related disorder or disease comprising a peptide or peptide complex of present invention and a suitable packaging, and possibly suitable instructions for using said peptide or peptide complex in the detection of α 2 integrin.

A diagnostic kit according to the ninth aspect of present invention is an article of manufacture that comprises at least the components as defined in the ninth aspect and optionally one or more further components (e.g. buffers and other reagents necessary or suitable for carrying out the detection of alpha 2 integrin in the sample or further means for detecting alpha 2 integrin or other markers of a given disease, or negative/positive standards, one or more secondary antibodies (suitably labelled) for detecting and/or visualising and/or quantifying the alpha 2 integrin-(peptide/peptide complex) complex suitably contained within one or more suitable containers) that are preferably combined to a spatially assembled unit and that is intended for use in the diagnosis of an α 2-integrin related disorder or disease

According to one embodiment of the ninth aspect, the kit further comprises a data carrier comprising instructions for a method according to the seventh or eleventh aspect of present invention and any one its embodiments.

In a twelfth aspect, present invention relates to a method of treatment or diagnosis of an α 2 integrin-related disorder or disease using one or more peptide or peptide complexes of present invention and/or one or more nucleic acids

Accordingly, aspect of present invention relates to a method of diagnosing a disease associated with altered α2 integrin, the method comprising

a) contacting a taken sample of an individual with the peptide or peptide complex of present invention; and

b) detecting and/or quantifying the binding of α2 integrin to the peptide or peptide complex; and

c) comparing the binding of step b) with the binding of α2 integrin to the peptide or peptide complex in one or more reference samples,

wherein an altered binding in the taken sample relative to the binding detected in the one or more reference samples is indicative of the disease. The binding can be detected or quantified in terms of the affinity (e.g. KD, Koff, Kon rate) using known methods or simply by means of the signal (intensity) of the peptide/peptide-complex – alpha 2 integrin complex caused e.g by a labelled antibody against the peptide/peptide complex in comparison to that of the reference sample.

The term "reference", especially in the context of "reference individual", "reference sample" or "reference value" in the context of present invention refers to a comparison or standard that is characteristic or representative for a certain (health) status, disease etc. Thus, a reference value, is a standard value for a certain parameter (e.g. expression level of a certain indicator/biomarker molecule) that is typical for a certain status (e.g. a disease status or health status), a reference individual is an individual that has been selected for comparison and has a certain health state or disease, a reference sample can e.g. be a sample from a reference individual or an artificial

sample with a characteristic level of a certain indicator or biomarker typical for a disease state or health state.

The term "reference sample" as used herein, refers to a sample which is analysed in a substantially identical manner as the sample of interest and whose information is compared to that of the sample of interest. A reference sample thereby provides a standard allowing for the evaluation of the information obtained from the sample of interest.

A reference sample may be derived from a healthy or normal tissue, organ or individual, thereby providing a standard of a healthy status of a tissue, organ or individual. Differences between the status of the normal reference sample and the status of the sample of interest may be indicative of the risk of disease development or the presence or further progression of such disease or disorder.

A reference sample may be derived from an abnormal or diseased tissue, organ or individual thereby providing a standard of a diseased status of a tissue, organ or individual. Differences between the status of the abnormal reference sample and the status of the sample of interest may be indicative of a lowered risk of disease development or the absence or bettering of such disease or disorder.

A reference sample may also be derived from the same tissue, organ, or individual as the sample of interest but has been taken at an earlier time point. Differences between the status of the earlier taken reference sample and the status of the sample of interest may be indicative of the progression of the disease, i.e. a bettering or worsening of the disease over time. A reference sample was taken at an earlier or later time point in case a period of time has lapsed between taking of the reference sample and taking of the sample of interest. Such period of time may represent years (e.g. 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 years), months (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 months), weeks (e.g. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 weeks), days (e.g. 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 days), hours (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 hours), minutes (e.g. 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 minutes), or seconds (e.g. 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 seconds).

The reference sample representative for a status or stage of pain may be from a control subject known to suffer from the disorder or disease that is to be diagnosed, i.e. an alpha-2 integrin related disorder or disease, e.g. such as herein defined. The control subject may be a mammal such as a human, rodent (e.g. rat, hamster, or mouse) or monkey, or may be another animal than a mammal such as an avian.

Preferably, both the sample or value and the reference sample or value are from subjects of the same species (e.g. human), more preferably of the same gender (e.g. female or male) and/or of a similar age or phase of life (e.g. infant, young child, juvenile, adult, or elderly).

The reference or reference sample in the different aspects and embodiments of present invention is preferably derived from a healthy individual, a diseased individual, or from the same individual as the sample of interest. Where the reference (e.g. reference value) or reference sample was taken from the same individual as the sample of interest, the reference (e.g. reference value) or reference sample was preferably taken at an earlier or later time point then the sample of interest. The time period which has lapsed between taking of the the reference (e.g. reference value) or reference sample and taking of the reference (e.g. reference value) or sample or value of interest preferably represents years (e.g. 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 years), months (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 months), weeks (e.g. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 weeks), days (e.g. 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 days), hours (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 hours), minutes (e.g. 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 minutes), or seconds (e.g. 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 seconds). Alternatively or additionally, the reference sample is a reference sample with a level of alpha 2 integrin representative for a healthy individual or representative for the presence or absence of an alpha 2 integrin related disorder or disease or representative for an increased or decreased risk of developing an alpha 2 integrin related disorder or disease.

In embodiments, wherein the reference or reference sample is derived from a healthy individual or an individual with a decreased risk of developing an alpha 2 integrin related disorder or disease or with a level of alpha 2 integrin representative of the absence of an alpha 2 integrin related disorder or disease, an elevated level of alpha 2 integrin in the reference sample or value,

or in the sample or value of interest in comparison to said reference value or reference sample indicates (a) the presence of an alpha 2 integrin related disorder or disease and/or (b) an increased risk to develop an alpha 2 integrin related disorder or disease and/or (c) the progression of an alpha 2 integrin related disorder or disease in the individual. In embodiments, wherein the reference is derived from a diseased individual or an individual with an increased risk of developing an an alpha 2 integrin related disorder or disease or a value representative of the presence of an alpha 2 integrin related disorder or disease, a similar level of alpha 2 integrin indicates (a) the presence of an alpha 2 integrin related disorder or disease and/or (b) an increased risk to develop an alpha 2 integrin related disorder or disease and/or (c) the progression of an alpha 2 integrin related disorder or disease in the individual.

In embodiments, wherein the reference (value) or reference sample is (from) the same individual as the individual of interest at an earlier time point, an elevated level of alpha 2 integrin in the individual/value/sample of interest indicates (a) the presence of an alpha 2 integrin related disorder or disease and/or (b) an increased risk to develop an alpha 2 integrin related disorder or disease and/or (c) the progression of an alpha 2 integrin related disorder or disease in the individual. In embodiments, wherein the reference (value) or reference sample is (from) the same individual as the individual/sample of interest at an earlier time point, a lowered level of alpha 2 integrin in the sample of interest indicates (a) an alteration of the alpha 2 integrin related disorder or disease or an improvement or absence of the alpha 2 integrin related disorder or disease and/or (b) a decreased risk to develop an alpha 2 integrin related disorder or disease and/or (c) a declined progression of the alpha 2 integrin related disorder or disease.

In embodiments, wherein the reference (value) or reference sample is (from) the same individual as the sample/value of interest at an earlier time point, a similar level of alpha 2 integrin in the sample of interest indicates (a) a similar risk to develop an alpha 2 integrin related disorder or disease and/or (b) a stagnation in the progression of an alpha 2 integrin related disorder or disease, and/or (c) a persistence of the alpha 2 integrin related disorder or disease in the individual.

In embodiments, wherein the reference (value) or reference sample is derived from a healthy individual or from an individual with a decreased risk of developing an alpha 2 integrin related

disorder or disease or comprises a level of alpha 2 integrin representative of a healthy individual or of a status of disease-absence or of a decreased risk of developing an alpha 2 integrin related disorder or disease, wherein an elevated level of alpha 2 integrin indicates (a) the presence of an alpha 2 integrin related disorder or disease and/or (b) an increased risk to develop an alpha 2 integrin related disorder or disease and/or (c) the progression of an alpha 2 integrin related disorder or disease in the individual.

In embodiments, wherein the reference (value) or reference sample is derived from a diseased individual or from an individual with an increased risk of developing an alpha 2 integrin related disorder or disease or comprises a level or amount of alpha 2 integrin representative for a diseased individual or for a status of disease-presence or for an increased risk of developing an alpha 2 integrin related disorder or disease, wherein a similar level of alpha 2 integrin indicates (a) the presence of an alpha 2 integrin related disorder or disease and/or (b) an increased risk to develop an alpha 2 integrin related disorder or disease and/or (c) the progression of an alpha 2 integrin related disorder or disease in the individual.

In embodiments, wherein the reference (value) or sample is derived from the same individual as sample of interest and was taken at an earlier time point, an elevated level of alpha 2 integrin in the sample of interest indicates (a) the presence of an alpha 2 integrin related disorder or disease and/or (b) an increased risk to develop an alpha 2 integrin related disorder or disease and/or (c) the progression of an alpha 2 integrin related disorder or disease in the individual.

In embodiments, wherein the reference (value) or reference sample is derived from the same individual as sample of interest and was taken at an earlier time point, a lowered level of alpha 2 integrin in the sample of interest indicates (a) an alteration of the alpha 2 integrin related disorder or disease or an improvement or absence of an alpha 2 integrin related disorder or disease and/or (b) a decreased risk to develop an alpha 2 integrin related disorder or disease and/or (c) a declined progression of the alpha 2 integrin related disorder or disease. In embodiments, wherein the reference sample is derived from the same individual as sample of interest and was taken at an earlier time point, a similar level of alpha 2 integrin in the sample of interest indicates (a) a similar risk to develop an alpha 2 integrin related disorder or disease and/or (b) a stagnation in

the progression of an alpha 2 integrin related disorder or disease, and/or (c) a persistence of the alpha 2 integrin related disorder or disease in the individual.

According to a preferred embodiment of the different aspects of present invention, the peptide or peptide complex comprises or consists of (is) an isolated monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof. In the following, some preferred embodiments relating to an isolated monoclonal antibody or antigen-binding fragment thereof are listed:

1. Isolated monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof, wherein said antibody or fragment specifically binds to the I-domain of a human α2-integrin, said antibody or fragment comprising a heavy chain variable region (VH) domain and a light chain variable region (VL) domain, wherein said antibody or fragment cross-reacts with a non-human primate α2-integrin but does not cross-react with a non-primate α2-integrin.

2. Isolated monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof, wherein said antibody or fragment specifically binds to the I-domain of a human α2-integrin, said antibody comprising a heavy chain variable region (VH) domain and a light chain variable region (VL) domain, wherein said antibody or fragment competes with a reference antibody for binding to the epitope of the reference antibody, said reference antibody comprising a light chain encoded by the plasmid as deposited with the DSMZ under accession No. DSM 23944 and a heavy chain encoded by either (i) the plasmid as deposited with the DSMZ under accession DSM 23946 or (ii) the plasmid as deposited with the DSMZ under accession No. DSM 23945.

3. The antibody, or antigen binding portion thereof, of embodiment 1 or 2, wherein said antibody or fragment specifically binds to the I-domain of the human α2-integrin with nM binding affinity.

4. The antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of the previous embodiments, wherein said antibody or fragment inhibits the interaction of the human α2-integrin with collagen

in vitro, thereby inhibiting the activation of platelets due to adhesion of said platelets to said collagen.

5. The antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of the previous embodiments, said heavy chain variable region domain comprising the heavy chain HCDR3 of SEQ ID NO:5.

6. The antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of the previous embodiments, said heavy chain variable region domain comprising the heavy chain CDRs of SEQ ID NO:3 (HCDR1), SEQ ID NO:4 (HCDR2), and SEQ ID NO:5 (HCDR3), or functionally active variants thereof.

7. The antibody, or antigen binding portion thereof, of embodiment 6, wherein the functionally active variant of HCDR2 comprises the mutation Asp→Glu at amino acid position 6.

8. The antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of the previous embodiments, said light chain variable region domain comprising the light chain LCDR3 of SEQ ID NO:8.

9. The antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of the previous embodiments, said light chain variable region domain comprising the light chain CDRs of SEQ ID NO:6 (LCDR1), SEQ ID NO:7 (LCDR2), and SEQ ID NO:8 (LCDR3), or functionally active variants thereof.

10. The antibody, or antigen binding portion thereof, of embodiment 9, wherein the functionally active variant of LCDR1 comprises the mutation Asn→Gln at amino acid position 11.

11. The antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of the previous embodiments, said heavy chain variable region (VH) domain having at least 90%, 95%, 97% or 99% sequence identity to the VH sequence of SEQ ID NO: 2.

12. The antibody, or antigen binding portion thereof, of embodiment 11, wherein said heavy chain variable region (VH) domain comprises the sequence of SEQ ID NO:2 or a functionally active thereof.

13. The antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of the previous embodiments, said light chain variable region (VL) domain having at least 90%, 95%, 97% or 99% sequence identity to the VL sequence of SEQ ID NO: 1.

14. The antibody, or antigen binding portion thereof, of embodiment 13, wherein said light chain variable region (VL) domain comprises the sequence of SEQ ID NO:1 or a functionally active thereof.

15. The antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of the previous embodiments, wherein said heavy chain variable region (VH) domain comprises one or more amino acid substitutions at positions selected from the group consisting of H5, H7, H11, H12, H17, H20, H38, H40, H43, H55, H61, H65, H66, H67, H76, H81, H82, H87, H91, H93, H112, H113 and H116.

16.The antibody, or antigen binding portion thereof, of embodiment 15, wherein the one or more amino acid subsitutions are selected from the group consisting 5His→Val, 7Pro→Ser, 11Leu→Val, 12Val→Lys, 17Pro→Ser, 20Leu→Val, 38Lys→Arg, 40Arg→Ala, 43Arg→Gln, 55Asp→Glu, 61Asn→Ala, 65Lys→Gln, 66Asp→Gly, 67Lys→Arg, 76Ser→Thr, 81Ile→Met, 82Gln→Glu, 87Thr→Arg, 91Ser→Thr, 93Val→Lys, 112Thr→Leu, 113Leu→Val and 116Ser→Val .

17. The antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of the previous embodiments, wherein said light chain variable region (VL) domain comprises one or more amino acid substitutions at positions selected from the group consisting of L9, L12, L15, L22, L34, L46, L47, L80, L83, L85, L87, and L89.

18. The antibody, or antigen binding portion thereof, of embodiment 17, wherein the one or more amino acid subsitutions are selected from the group consisting of 9Ala→Ser, 12Ala→Ser, 15Leu→Val, 15Leu→Pro, 22Ser→Thr, 34Asn→Gln, 46Gln→Lys, 47Ala→Pro, 80Asp→Asn, 83Glu→Gln, 85Asp→Glu, 87Ala→Thr and 89Thr→Asn.

19. The antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of the previous embodiments, said heavy chain variable region (VH) domain having at least 90%, 95%, 97% or 99% sequence identity to a VH sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 38 (HC1), SEQ ID NO:39 (HC2), SEQ ID NO:40 (HC3), SEQ ID NO:41 (HC4), SEQ ID NO:42 (HC5), SEQ ID NO:43 (HC6), and SEQ ID NO:44 (HC7).

20. The antibody, or antigen binding portion thereof, of embodiment 19 said heavy chain variable region (VH) domain comprising a VH sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 38 (HC1), SEQ ID NO:39 (HC2), SEQ ID NO:40 (HC3), SEQ ID NO:41 (HC4), SEQ ID NO:42 (HC5), SEQ ID NO:43 (HC6), and SEQ ID NO:44 (HC7).

21. The antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of the previous embodiments, said light chain variable region (VL) domain having at least 90%, 95%, 97% or 99% sequence identity to a VL sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 33 (LC1), SEQ ID NO:34 (LC2), SEQ ID NO:35 (LC3), SEQ ID NO:36 (LC4), and SEQ ID NO:37 (LC5).

22. The antibody, or antigen binding portion thereof, of embodiment 21, said light chain variable region (VL) domain comprising a VL sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 33 (LC1), SEQ ID NO:34 (LC2), SEQ ID NO:35 (LC3), SEQ ID NO:36 (LC4), and SEQ ID NO:37 (LC5).

23. The antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of the previous embodiments, wherein said antibody or binding portion is a chimeric antibody or humanized antibody.

24. The antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of the previous embodiments, wherein the antigen binding portion is selected from the group consisting of a Fab, a Fab', a F(ab')2, a Fv, a disulfide linked Fv, a scFv, and a $(scFv)_2$.

25. The antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of the previous embodiments, which is selected from the group consisting of a multispecific antibody, a dual specific antibody, a isotype antibody, a dual variable domain antibody and a bispecific antibody.

26. The antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of the previous embodiments, comprising a heavy chain immunoglobulin constant domain selected from the group consisting of: a human IgM constant domain, a human IgGl constant domain, a human IgG2 constant domain, a human IgG3 constant domain, domain, a human IgG4 constant domain, a human IgE constant domain, and a human IgA constant domain.

27. The antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of the previous embodiments, comprising a human IgG4 constant domain.

28.An isolated nucleic acid encoding the amino acid sequence of the antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of the preceding embodiments.

29. A recombinant expression vector comprising the nucleic acid of embodiment 28.

30. A host cell comprising the recombinant expression vector of embodiment 29.

31. A method of producing the antibody or antigen binding fragment of any one of embodiments 1-26, comprising culturing the host cell of embodiment 30 under conditions such that an antibody is produced by the host cell.

32. A pharmaceutical composition comprising the antibody, or antigen binding portion thereof, of any one of embodiments 1-27 and one or more pharmaceutically acceptable carriers.

33. A method of treating, preventing or diagnosing an α 2- integrin –related disorder or disease, the method comprising administering to a subject in need of thereof the pharmaceutical composition of embodiment 32.

34. The method of embodiment 33, wherein the α2 integrin-related disease or disorder is selected from the group consisting of thrombosis, a vascular disease, cancer, including neo-angiogenesis and metastasis, inflammation, inflammatory disease, autoimmune disease and a disease characterized by abnormal or increase angiogenesis, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, reactions to transplant, optical neuritis, spinal cord trauma, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus (SLE), multiple sclerosis, Reynaud's syndrome, experimental autoimmune encephalomyelitis, Sjorgen's syndrome, scleroderma, cardiovascular disease, psoriasis, and infections that induce an inflammatory response.

35. The method of embodiment 33, wherein the α2 integrin-related disease or disorder is selected from the group consisting of acute coronary syndrome, percutaneous coronary intervention, ischemic stroke, carotid artery stenosis or peripheral arterial occlusive disease.

36. A method of diagnosing a disease associated with altered α2 integrin, the method comprising

a)contacting a sample containing an α2 integrin with the antibody or antigen binding fragment of any one of embodiments 1-27;

b) detecting binding of α2 integrin to the antibody or antigen binding fragment; and

c) comparing the binding of step b) with a reference, wherein a altered α2 integrin binding in the sample relative to the reference is indicative of the disease.

37. An article of manufacture comprising

a) a packaging material,

b) the antibody or antigen binding fragment of any one of embodiments 1-27,

c) a label or a package insert, the insert contained within said packaging material, indicating that said antibody or antigen binding fragment is effective for treatment or diagnosis of an α 2 integrin-related disease disorder.

The invention is not limited to the particular methodology, protocols, and reagents described herein because they may vary. Further, the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments only and is not intended to limit the scope of the present invention. As used herein and in the appended claims, the singular forms "a", "an", and "the" include plural reference unless the context clearly dictates otherwise. Similarly, the words "comprise", "contain" and "encompass" are to be interpreted inclusively rather than exclusively.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms and any acronyms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art in the field of the invention. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice of the present invention, the preferred methods, and materials are described herein.

The invention is further illustrated by the following example, although it will be understood that the examples are included merely for purposes of illustration and are not intended to limit the scope of the invention unless otherwise specifically indicated.

FIGURES:

Figure 1 A and B show binding of anti-α2 integrin mAB purified from hybridoma supernatant on HUVEC MesoScale Technology.

Figure 2 shows the effect of anti-α2 integrin mAb purified from hybridoma supernatant on HUVEC angiogenesis. Anti-α2 integrin mAb was able to inhibit FGF2-induced angiogenesis in a dose-dependent manner.

Figure 3 shows inhibition of platelet adhesion to collagen under flow by anti-α2 integrin mAB-Fab. Anti-coagulated human blood is incubated for 10 min with DiOC6(3) dye and serial dilutions of anti-α2 integrin Fab at 37°C. Then the blood is flown through collagen-coated capillaries at a shear rate of 3000s-1. From 10 pictures as representative examples of the covered area the surface coverage is calculated. The values show the percentage of inhibition of said surface coverage as a dose-dependent effect of anti-α 2 integrin Fab

Figure 4: Shows interspecies cross reactivity studies performed by FACS analyses using α2 mAb from hybridoma supernatant and blood samples from macaca (Fig 4a and b) and human (Fig 4c and d), Figs 4a and 4c represent negative controls only using the secondary antibody without use of primary antibody.

Figure 5: Figure 5a) shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:1) and coding sequence (SEQ ID NO:12) of the variable light chain of the anti-α2 integrin monoclonal mouse antibody produced by hybridoma. Figure 5b) shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:2) and coding sequence (SEQ ID NO:13) of the variable heavy chain of the anti-α2 integrin monoclonal mouse antibody. In the amino acid sequences, the CDRs are marked bold and underligned.

Figure 6: Shows the amino acid sequences of the different CDRs of the anti-α2 integrin monoclonal mouse antibody, wherein Fig. 6a shows the heavy chain CDRs and Fig. 6b shows the light chain CDRs with HCDR1 being SEQ ID NO:3, HCDR2 being SEQ ID NO:4, HCDR3 being SEQ ID NO:5, LCDR1 being SEQ ID NO:6, LCDR2 being SEQ ID NO:7, LCDR3 being SEQ ID NO:8.

Figure 7 Shows the sequences of the chimeric constructs generated by coupling of the above murine variable light chain region (SEQ ID NO: 1) or variable heavy chain regions (SEQ ID NO: 2) to (parts of) a human constant region as detailed in the Examples. Fig.7a shows the amino acid (SEQ ID NO :9) and coding (SEQ ID NO: 14) sequences of the chimeric light chain, Fig.7b shows the amino acid (SEQ ID NO: 10) and coding (SEQ ID NO: 15) sequences of the chimeric heavy chain, Fig.7c shows the amino acid (SEQ ID NO: 11) and coding (SEQ ID NO: 16) sequences of the chimeric heavy chain Fab fragment. In the amino acid sequences, the CDRs have been underlined, the sequence representing the α2 variable domains have been typed bold and the His tag is written in *italics*.

Figure 8 Shows the amino acid sequences of different human constant regions used for generation of the chimeric constructs: SEQ ID NO:17 is the amino acid sequence of human IGKC protein, light chain constant region according to Swiss-Prot accession number Q502W4 as used for the generation of the light chain chimera according to SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:18 is the amino acid sequence of human mutated IGHG4, heavy chain constant region according to Swiss-prot accession number P01861.1 as used for construction of the heavy chain chimera according to SEQ ID NO:10 (the mutated amino acids are typed bold), SEQ ID NO:19 is the amino acid sequence of Human IGHG1 protein, heavy chain constant region according to Swiss-Prot accession number Q569F4 as used for the generation of the heavy chain Fab fragment chimera according to SEQ ID NO:11.

Figure 9 Shows the Amino acid and coding sequences of human α2 and β1 integrin with SEQ ID NO: 20 being the amino acid sequence of α2 integrin precursor protein according to NP__002194.2. The I-Domain , which was used for experiments and recombinantly expressed in e.coli, is underlined and bold-typed. SEQ ID NO: 21 is the coding sequence of α2 integrin according to NCBI accession number: NM_002203.3, SEQ ID NO: 22 is the amino acid

sequence of β1 integrin isoform 1A precursor protein according to NCBI accession number: NP_002202.2 and SEQ ID NO:23 is the coding sequence of β1 integrin isoform 1A according to NCBI accession number: NM_002211.3.

Figure 10 shows the amino acid and coding sequences of the original murine anti-α 2 integrin antibody from mouse hybridoma and verified by MS: SEQ ID NO: 45 (Figure 10a) is the nucleotide sequence of cDNA encoding the LC of the anti-α2 integrin mAB, SEQ ID NO: 46 (Figure 10b) is the nucleotide sequence of cDNA encoding HC anti-α2 integrin mAB, SEQ ID NO: 47 (Figure 10c) is the amino acid sequence of the LC of anti-α2 integrin mAB as secreted from hybridoma, SEQ ID NO:48 (Figure 10d) is the amino acid sequence of the LC of anti-α2 integrin mAB as secreted from hybridoma. SEQ ID NO: 53 (Figure 10e) is the amino acid sequence of the LC of the comparator mAb TMC2206, SEQ ID NO: 54 (Figure 10f) is the amino acid sequence of the HC of the comparator mAb TMC2206.

Figure 11 shows dissociation constants of the different alpha2 integrin antibodies as determined by Biacore. The results exhibit a in many cases better or at least equal disscociation constant as the mAb TMC2206

Figure 12 shows binding of comparator mAb TMC2206 to integrin α_2 I domain pre-bound by non-humanized Fab measured using Biacore (time in (s) seconds (x-axis) versus response difference in (RU) response units (y-axis)). As can be gained from figure 12, TMC2206 binds to the integrin I domain pre-bound by non-humanized Fab.

Figure 13 shows binding of non-humanized Fab to integrin α_2 I domain pre-bound by comparator mAb TMC2206 (time in (s) seconds (x-axis) versus response difference in (RU) response units (y-axis)). As can be gained from figure 13, non-humanized Fab binds to the integrin α_2 I domain pre-bound by comparator mAb TMC2206.

Figure 14 shows the inhibiton of platelet adhesion to collagen under static conditions using washed platelets. Batch 660 corresponds to LC1/HC1, batch 661 corresponds to LC2/HC2, batch 662 corresponds to LC3/HC3, batch 663 corresponds to LC3/HC4, batch 664 corresponds to LC4/HC5, batch 665 corresponds to LC4/HC6, batch 666 corresponds to LC5/HC7, and batch

667 is the comparator. The results can also be derived from table 12. Batch number 660, 662, and 663 show at least equal or better inhibition of the platelet adhesion to collagen as mAb TMC2206.

EXAMPLES

Example 1: Generation and selection of functional anti-α2 integrin mAb and Fab

A - Sequence isolation out of α 2 integrin mAB clone cells

Production and purification of α2 integrin mAb from hybridoma

One cryovial containing $2x10^6$ cells of the α2 integrin mAB cell bank was thawed rapidly at 37°C. Cells were transferred into T-25 cm2 flask in 5 mL of fresh media consisting of Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco 31053-028) supplemented with 10 % FBS, 1X ITS (Gibco 41 400-045), 1 X sodium pyruvate (Gibco 11 360-039), 150 µg/mL of oxaloacetic acid, 2 mM of glutamine (Gibco 25030-024) and 100 U/ml penicillin/streptomycin (Gibco 15070-063) in a 37°C incubator under a humidified atmosphere of 5 % CO_2 in air on an orbital shaker platform rotating at 110 rpm.

Isotyping of purified mAb from hybridoma was performed by using standard commercial isotyping kit from Serotec (Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Test Kit; ref. MMT1) revealed a mCk, mIgG2a isotype.

Cells were subcultured every 2 to 3 days for cell amplification. For production, cells were inoculated at 1.8 x 10^5 C/mL in Iscove's Modified Dulbecco's medium (Sigma I3390) supplemented with 10 % FBS, 1 X ITS, 1 X sodium pyruvate, 150 µg/mL of oxaloacetic acid, 2 mM of glutamine and 100 U/ml penicillin/streptomycin into six T500 flasks (200 mL) for 10 days.

For purification, the anti-α2 integrin mAb was directly captured from supernatant on Protein G affinity chromatography (Hitrap Protein G, GE Healthcare) and eluted by 0.1 M acetic acid.

After polishing the protein by SEC using a Superdex 200 (GE Healthcare) and ultrafiltration the protein was used in indicated experiments.

Determination of the sequence of the heavy and light chains of the α 2 integrin mAb

The cDNA encoding the variable domains of the monoclonal antibody were obtained as follows: mRNA was extracted from hybridoma cells with the Oligotex kit from Qiagen. The corresponding cDNA was amplified by RT-PCR by the RACE method utilizing the Gene Racer kit (Invitrogen), the transcriptase SuperScript III at 55 °C (Invitrogen) and primers described on Table 1 (RACEMOG2a or CKFOR). The cDNA fragments were amplified by PCR with the polymerase Phusion at 55 °C (Finnzymes) and primers also described in Table 1.

Table 1. Primers used for RT-PCR and PCR

Primer	Sequence 5' to 3'
5'-GeneRacer Primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA (SEQ ID NO: 24)
RACEMOG2a: 3'- Primer internal to murine hinge	AGGACAGGGCTTGATTGTGGG (SEQ ID NO: 25)
CKFOR: 3'- Primer internal to murin Ck murine	CTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGAC (SEQ ID NO: 26)

The amplified fragments encoding the variable regions of heavy (VH) and light (VL) chains were cloned into pCR4-Topo plasmids from Invitrogen which were amplified in *E. coli*. Cloned cDNA was then sequenced on both strands.

Protein sequences were translated from plasmid coding sequences and the masses of the heavy (HC) and light (LC) chains were calculated (Table 2). The values obtained were in perfect agreement with mass spectrometry data obtained from preparation of mAb purified from culture of the corresponding hybridoma, see Table 2. Nucleic acid and amino acid sequences of HC and LC are reported in the sequence listing as follows: SEQ ID NOs 46 and 48 correspond to the HC

of the α2-integrin mAb purified from hybridoma supernatant and SEQ ID NOs. 45 and 47 correspond to the LC of α2-integrin mAb purified from hybridoma supernatant.

Table 2: Mass spectrometry analysis of α2-integrin mAb from hybridoma

	Chain	Mass (Da) by LC/MS	Mass (Da) *in silico* value
α2 INTEGRIN mAB	LC	23899	23896
	HC	50728 (G0F)	50725 (G0F)

B - Determination of the sequences of the CDR of the anti-α2-integrin mAbs

The sequences for the CDR regions were deduced from the protein sequence using the KABAT nomenclature.

For the HC, CDR1 corresponds to SEQ ID NO.3, CDR2 corresponds to SEQ ID NO.4, CDR3 corresponds to SEQ ID NO.5.

For the LC, CDR1 corresponds to SEQ ID NO.6, CDR2 corresponds to SEQ ID NO.7, CDR3 corresponds to SEQ ID NO.8.

C - Generation of chimeric anti-α2-integrin mAb expression plasmids

The variable heavy and light chain of the anti-α2-integrin mAb was generated by PCR, using the AccuPrimePfx SuperMix (Invitrogen; Cat. No.: 12344-040) and the anti-α2-integrin mAb heavy and light chain cDNA respectively (for cDNA generation see above). In a 25µl PCR reaction, 5 cycles were run with the primers α2mAB-VH FOR and REV (heavy chain) or primers α2mAB-VL FOR and REV (light chain) primers (95°C, 15sec ; 62°C, 30sec ; 68°C, 1min). To introduce the leader sequence, 0.5µl of each of the first PCR sample were used as template for a second PCR with Leader FOR1-54 and α2mAB -VL (or -VH) REV primers using the same PCR conditions as for the first PCR. Finally, 0.5µl of the second PCR were used as template for a third PCR performing 25 cycles with Leader FOR1-23 and α 2 integrin mAB-VL (or -VH) REV

primers using the same PCR conditions as for the first reaction. The PCR products of the 3rd PCR were purified using the PCR purification kit (Qiagen, Cat.No.28104) as described in the kit protocol). PCR products were cloned into the pCR2.1-TOPO using the Invitrogen TOPO TA cloning kit (Cat # 450001) as described in the vendor's manual and sequenced using M13 forward and M13 reverse primers included in the cloning kit.

The sequences of the murine α2 antibody variable light and heavy chain can be gained from Figure NO: 5 with SEQ ID NO:1 referring to the amino acid sequence and SEQ ID NO:12 referring to the coding sequence of the variable light chain domain and with SEQ ID NO:2 referring to the amino acid sequence and SEQ ID NO:13 referring to the coding sequence of the variable heavy chain domain.

The variable light domain (according to SEQ ID NO:1) was fused to the constant light chain (IGKC, Swiss-Prot: Q502W4), by digesting the VL with NheI/BsiWI and IGKC BsiWI/HindIII giving rise to the α2 antibody VL-IGKC light chain chimera according to SEQ ID NOs:9 and 14. This fusion was ligated into the NheI/HindIII sites of the episomal expression vector pXL (Durocher et al. (2002), Nucl. Acids Res. 30(2)), E9, creating the mammalian expression plasmid of the chimeric α2 antibody light chain "pFF0033_pXLc-AscII-IGKC "as deposited with the DSMZ under accession No. DSM 23944.

The variable heavy domain (according to SEQ ID NO:2) was fused to a mutated variant of the human constant heavy chain (IGHG4, Swiss-Prot P01861, S108P, L115E) giving rise to the α2 integrin VH-IGHG4 constant heavy chain chimera according to SEQ IDs NO: 10/15 or in order to create a Fab, fused to a 6x His tagged CH1 domain from the human constant IGHG1 (Swiss-Prot: Q569F4) giving rise to the α2 integrin VH-IGHG1 constant heavy chain Fab chimera according to SEQ ID NOs:11/16. To this end, the VH was digested NheI/ApaLI and fused to the ApaI/HindIII digested IGHG4 or His tagged CH1 domain respectively. This fusion was ligated into the NheI/HindIII sites of the episomal expression vector pXL, respectively creating for the mammalian expression plasmid of the chimeric α2 antibody heavy chain-IgG4 "pFF0036_pXLc-AscII-IGHG4" as deposited with the DSMZ under accession DSM 23946, or for the mammalian expression plasmid of the chimeric α2 antibody heavy chain-Fab "pFF0035_pXLc-AscII-CH1-Hi" as deposited with the DSMZ under accession No. DSM 23945.

The different plasmids have been deposited with the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig under the following accession numbers: DSM 23945 (plasmid for eucaryotic expression of the chimeric anti α2 antibody heavy chain Fab fragment), DSM 23946 (plasmid for the expression of the chimeric anti α2 antibody IgG4 heavy chain) and DSM 23944 (plasmid for the expression of the chimeric anti α2 antibody IGKC light chain).

Sequences of the above used Primers

	SEQ ID NO:
α2mAB-VL FOR:	
CTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGCACAGCAACATTGTGCTGACCCAATCTC	27
α2mAB -VL REV:	
ACCGTACGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCCC	28
α2mAB mAB-VH FOR:	
CTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGCACAGCCAGGTCCAACTGCATCAGCCTG	29
α2mAB mAB-VH REV:	
TAGGGCCCTTGGTGCTGGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGG	30
Leader for 1-54:	
GCTAGCACCATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACC	31
Leader for 1-23:	
CAAGCTAGCACCATGGGCTGGTCCTG	32

Example 2: Properties of anti α2-integrin mAb and Fab

A - Production of recombinant anti α2 integrin mAB and Fab fragments

Expression of chimeric anti α2integrin-*IgG4 and* anti α2-integrin–*Fab molecules*

The expression plasmids encoding the heavy and light chain of the antibody were propagated in E.coli DH5a. Plasmids used for transfection were prepared from E.coli using the Qiagen EndoFree Plasmid Mega Kit.

HEK 293-FS cells growing in Freestyle Medium (Invitrogen) were transfected with indicated LC and HC plasmids using Fugene (Roche) transfection reagent. After 7 days the cells were removed by centrifugation and the supernatant and passed over a 0.22µm filter to remove particles.

Purification of chimeric anti α2-integrin *-IgG4 and* anti α2-integrin *–Fab molecules*

IgG4 Protein was purified by affinity chromatography on Protein A (HiTrap Protein A HP Columns, GE Life Sciences). After elution from the column with 100 mM acetate buffer with 100 mM NaCl pH 3.5, the monoclonal antibodies were desalted using HiPrep 26/10 Desalting Columns, formulated in PBS at a concentration of 1 mg/mL and 0.22 µm filtered.

Fab proteins were purified by IMAC on HiTrap IMAC HP Columns (GE Life Sciences). After elution from the column with a linear gradient (Elution buffer: 20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 50 - 500 mM imidazole, pH 7.4), the protein containing fractions were pooled and desalted using HiPrep 26/10 Desalting Columns, formulated in PBS at a concentration of 1 mg/mL and 0.22 µm filtered.

Protein concentration was determined by measurement of absorbance at 280 nm. Each batch was analyzed using a Protein 200 Plus LabChip kit on the Agilent 2100 bioanalyzer under reducing and non-reducing conditions to determine the purity and the molecular weight of each subunit and of the monomer.

B - Binding properties of the anti-α2 integrin mAb or Fab

Surface plasmon resonance technology on a Biacore 3000 (GE Healthcare) was used for detailed kinetic characterisation of the purified antibody and the corresponding Fab fragment. A direct binding assay was used with the anti-integrin antibody or the Fab fragment as the ligand and the integrin α2β1 I-domain as analyte. Typically, 600 RU of antibody or Fab fragment were immobilised on a research grade CM5 chip by amine reactive coupling, resulting in an Rmax of

80 and 140 RU for the I domain bound to the antibody and the Fab fragment, respectively. Binding kinetics were measured over a concentration range between 0.4 to 28 nM I-domain in HBS-P buffer supplemented with 4 mM MgCl2 (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005 % Surfactant P20) at a flow rate of 30 µl/min. Chip surfaces were regenerated with 10 mM glycine pH 2.2. Kinetic parameters were analysed and calculated in the BIAevaluation program package (version 4.1) using a flow cell without immobilised anti-integrin antibody or Fab fragment as reference. A 1:1 binding model with mass transfer was applied for a global fit of the data for curves corresponding to analyte concentrations from 0.4-28 nM of antibody or Fab fragment.

Table 3: The binding kinetics of anti-α2-integrin mAb and Fab fragment against the integrin I-domain.

Ligand	ka (1/Ms) E+05	kd (1/s) E-04	KD (M) E-10
Antibody	8.6	11.7	13.5
Fab frament	9.9	8.3	8.4

The blocking mAb and Fab displayed affinities in the nanomolar range to human α2β1-domain (Table 3).

To further assess the binding properties of the anti-a2 integrin mAb, a cell based assay with HUVEC cells (promocell C12200, lot 6062203) was performed. Cells were coated onto high binding plates (Meso Scale Discovery (MSD), L15XB-3) in PBS (10.000 cells/well) and incubated for 2hrs at room temperature. Then the plates were emptied, washed twice with PBS and blocked with blocking solution (MSD, R93BA-4) for 90 min. After emptying and washig the plates again as described above, serial dilutions of anti α2-mAb were added and incubated with the cells for 1h at room temperature. Following another washing step as above Read buffer T without surfactant (Meso scale Discovery, R92TD-2) was added. Electrochemilumenescence

was read in a suitable device (Meso scale Discovery, Sector imager). Scatchard plot analysis was used to determine KD of the tested mAbs (see Fig.1).

C - Cross-reactivity properties of the anti-α2-integrin mAb

The anti α2 integrin mAb was assessed for its ability to specifically interact with platelets from macaca and man by means of FACS experiments using blood samples or human platelets. The mAb was incubated with samples of human blood, macaca blood or human platelets and with goat-anti-mouse-IGg Phycoerithrin (PE) coupled secondary mAbs (Beckman Coulter #731856). The samples were treated with Lysing Solution (BD #349202) and the platelets spun down, resuspended and analysed by FACS.

The anti α2 integrin mAb showed similar reactivity with blood samples of macaca fascicularis (97.3% positives, Fig 4b) as with human whole blood sample (>98% positives, Fig. 4d), whereas no reactivity has been detected against mouse, rat, dog, guinea pig, pig or rabbit α2β1 integrin as tested with whole blood from those species (data not shown). Thus, according to the FACS analyses, there appears to be interspecies crossreactivity of the antibody with primate α2β1 integrin on platelets from macaca blood, whereas no cross-reactivity has been detected against mouse, rat, dog, guinea pig, pig or rabbit α2β1 integrin as tested with whole blood from those species.

Example 3- Humanization and engineering of the Fv domain of anti-α2 IgG and Fab

Humanization

The 3D homology models of the VL and VH sequences of the anti-α2 integrin mAB antibody were built using the antibody modeller application in MOE 2008. Several PDB templates were identified to build the LC and HC frameworks and CDR loops. All templates had an identity above 83% vs. the VL and VH anti-α2 integrin mAB sequences, except the best template vs. the H3 loop (56% identity). The resulting LC and HC models were subsequently energy minimized using the standard procedure implemented in MOE. A molecular dynamic (MD) calculation of the minimized 3D homology model of the murine VL/VH was subsequently performed, with

constraints on the protein backbone and at 500K temperature, for 1.1 nanoseconds in Generalized Born implicit solvent. 10 diverse conformations were extracted from this first MD run every 100 ps for the last 1ns. These 10 diverse conformations were then each submitted to a MD, with no constraints on the protein backbone and at 300K temperature, for 2.3 nanoseconds in Generalized Born implicit solvent. For each of the 10 MD runs, the last 2,000 snapshots, one every picoseconds, from the MD trajectory were then used to calculate, for each anti-α 2 integrin mAB amino-acid, its root mean square deviations (rmsd) compared to a reference medoïd position. By comparing the average rmsd on the 10 separate MD runs of a given amino-acid to the overall average rmsd of all anti- α 2 integrin mAB murine amino-acids, one decides if the amino-acid is flexible enough, as seen during the MD, to be considered as likely to interact with T-cell receptors and responsible for activation of the immune response. 64 amino-acids are finally identified as flexible in the anti-α 2 integrin mAB antibody, of which 34 are not located in the CDRs or their immediate vicinity (5Å). Amino-acids located in the "Vernier" zone are also not considered (J. Mol. Biol. 1992, 224, 487-499).

The motion of the most 34 flexible anti- α2 integrin mAB amino-acids (excluding the CDR+5Å region), during the 20 ns (10x2ns), were then compared to the motion of the corresponding flexible amino-acids of 49 human germlines homology models, for each of which were run the 10x2ns MD simulations. The 49 human germlines models were built by systematically combining the 7 most common human germline light chains (vk1, vk2, vk3, vk4, vlambda1, vlambda2, vlambda3) and 7 most common human germline heavy chains (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6). The vk1-vh1b human germline antibody showed a 62% 4D similarity of its flexible amino-acids compared to the flexible amino-acids of the anti- α2 integrin mAB; the vk1-vh1b germline antibody was therefore used to humanize the anti- α2 integrin mAB antibody focusing on the flexible amino-acids. For the pairwise amino-acid association between anti- α2 integrin mAB and vk1-vh1b amino-acids, the 2 sequences were aligned based on the optimal 3D superposition of the α carbons of the 2 corresponding homology models.

Stabilisation

The amino-acids of the light and heavy chains with low frequency of occurrence vs. their respective canonical sequences, excluding the CDRs, are originally proposed to be mutated into the most frequently found amino-acids ($\Delta\Delta G_{th} > 0.5$ kcal/mol; [E. Monsellier, H. Bedouelle.

Improving the stability of an antibody variable fragment by a combination of knowledge-based approaches: validation and mechanisms. J. Mol. Biol. 2006, 362,580-593]). A first list of consensus mutations for the LC and for the HC has been restricted to the amino-acids found in the closest human germline (i.e vk1-vh1b), i.e. to 4 potential mutations in the LC and 3 in the HC. None of these mutations are located in the CDRs, its immeditate vicinity (+5 Angstroms) or in the "Vernier" zone (J. Mol. Biol. 1992, 224, 487-499). Other criteria are taken into account to consider these consensus mutations for potentially stabilizing the anti-alpha2 integrin antibody. These criteria are a favourable change of hydropathy at the surface or a molecular mechanics based predicted stabilisation of the mutant.

Humanization by Grafting

The humanization starts by identifying the closest human germlines to, respectively, the anti-α 2 integrin mAB light and heavy chains. This is done by performing a BLAST search vs. all the human germlines which were systematically enumerated (all possible combinations of the V and J domains for the kappa and lambda chains; V, D and J domains for the heavy chains). The BLAST searches were performed using an in-house intranet application.

The following closest human germlines were identified with respectively 77% and 68% identity to the anti-α2 integrin light and heavy chains:

```
α2_lc                NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QQKPGQAPKL LIYLASNLAS
IGLKV79_IGLKJ2       DIVLTQSPAS LAVSPGQRAT ITCRASESVS FLGINLIHWY QQKPGQPPKL LIYQASNKDT

α2_lc                GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K
IGLKV79_IGLKJ2       GVPARFSGSG SGTDFTLTIN PVEANDTANY YCLQSKNFPY TFGQGTKLEI K

α2_hc                  QVQLHQPGAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR IDPSDSETHY
IGHV11_IGHD33_IGHJ8    QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYYMHWVRQA PGQGLEWMGI INPSGGSTSY

α2_hc                  NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG RGYFDYWGQG TTLTVSS
IGHV11_IGHD33_IGHJ8    AQKFQGRVTM TRDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARL- TGYFDYWGQG TLVTVSS
```

IGLKV79_IGLKJ2 corresponds to SEQ ID NO: 49. IGHV11_IGHD33_IGHJ8 corresponds to SEQ ID NO. 50.

The humanizing mutations are obtained by performing a pairwise comparison of the 2 aligned sequences, excluding the CDR (Kabat numbering) and Vernier zone residues.

Mutation of unwanted sequence motifs

The following motifs of sequences were considered: Asp-Pro (acide labile bond), Asn-X-Ser/Thr (glycosylation, X=any amino-acid but Pro), Asp-Gly/Ser/Thr (succinimide/iso-asp formation in flexible areas), Asn-Gly/His/Ser/Ala/Cys (exposed deamidation sites), Met (oxidation in exposed area). The resulting humanised sequences were blasted for sequence similarity against the IEDB database (http://www.immuneepitope.org/home.do; version June 2009) to ensure that none of the sequences contain any known B- or T-cell epitope.

1. Original sequences of the anti-a2b1 integrin variable domains

    a. Light Chain (CDRs+5Å are highlighted, 1 NS potential problematic motif in the CDRs region underlined)

NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QQKPGQAPKL LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K

    b. Heavy Chain (CDRs+5Å are highlighted, 1 problematic site in the CDRs region [DS succinimide and iso-Asp formation site] underlined)

QVQLHQPGAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR IDPSDSETHY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG RGYFDYWGQG TTLTVSS

Engineered sequences

Five versions for the light chain (light chain variants LC1, LC2, LC3, LC4, LC5) and seven versions for the heavy chain were designed (heavy chain variants HC1, HC2, HC3, HC4, HC5, H6, H7). The LC1 version displays 4 mutations which derive from the direct comparison between the non-CDR most flexible amino-acids of the anti- α 2 integrin mAB light chain and

the VK1 human germline light chain. The LC2 version includes one additional mutation to remove a potentially deamidation site in the CDRs region (N34Q). The LC3 version includes humanizing and stabilizing mutations predicted to optimally stabilize the anti- α2 integrin mAB light chain. The LC4 version includes one additional mutation to remove the potentially (N34Q) deamidation site. The LC5 version displays 6 mutations which derive from the grafting method.

The HC1 version displays 3 mutations, which derive from the direct comparison between the non-CDR most flexible amino-acids of the anti- α 2 integrin mAB heavy chain and the VH1b human germline. The HC2 version includes another additional mutation to remove a potentially problematic succinimide Iso-Asp formation site in the CDRs region (D55E). The HC3 version includes humanizing and stabilizing mutations predicted to optimally stabilize the anti- α2 integrin mAB heavy chain. The HC4 version includes an additional mutation to address a potential aggregation issue. The HC5 version includes HC3 mutations and an additional mutation to remove a potentially problematic succinimide Iso-Asp formation site in the CDRs region (D55E). The HC6 version includes an additional mutation to address the potential aggregation issue. The HC7 version displays 20 mutations which derive from the grafting method.

In total seven combinations have been prepared:

- LC1/HC1 (mutations addressing humanization only)
- LC2/HC2 (mutations addressing humanization and LC/HC potentially problematic site [NS and DS])
- LC3/HC3 (mutations addressing humanization and stabilization)
- LC3/HC4 (mutations addressing humanization and stabilization and anti-aggregation)
- LC4/HC5 (mutations addressing humanization and stabilisation and LC potentially problematic site [NS] and HC potentially problematic site [DS])
- LC4/HC6 (mutations addressing humanization, stabilisation, anti-aggregation and LC potentially problematic site [NS] and HC potentially problematic site [DS])
- LC5/HC7 (mutations addressing humanization by grafting)

Table 4: summary of the 7 LCxHC combinations

	(LC1) Humanization	LC2 humanization and NS site in CDRs	LC3 humanization and stabilization	LC4 humanization and NS site in CDRs and stabilization	LC5 (grafting)
(HC1) Humanization	x				
(HC2) Humanization and DS in CDRs		x			
(HC3) Humanization and stabilization			x		
(HC4) Humanization and stabilization and "anti-aggregation"			x		
(HC5) Humanization and DS in CDRs and stabilization				x	
(HC6) Humanization and stabilization and "anti-aggregation"and DS in CDRs				x	
HC7 (grafting)					x

Table 5: Summary of the mutations introduced for the engineered light chain of the anti-α2β1 Fab

Light Chain (Sequential numbering)	(LC1) Humanization	(LC2) humanization and NS in CDRs	(LC3) humanization and stabilization	(LC4) humanization and NS in CDRs and stabilization	(LC5) grafting
ALA9	SER	SER	SER	SER	
ALA12			SER	SER	
LEU15	VAL	VAL	VAL	VAL	PRO
SER22					THR
ASN34		GLN		GLN	

GLN46	LYS	LYS			
ALA47					PRO
ASP80					ASN
GLU83	GLN	GLN	GLN	GLN	
ASP85			GLU	GLU	
ALA87					THR
THR89					ASN

Table 6: Mutations of the 7 HC variants of the anti- α 2 integrin antibody

Heavy Chain (Sequential numbering)	(HC1) Humani-zation	(HC2) Humani-zation and DS in CDRs	(HC3) Humani-zation and stabili-zation	(HC4) Humani-zation and stabilization and " anti-aggregation"	(HC5) Humani-zation and DS in CDRs and stabilization	(HC6) Humani-zation and stabilization and " anti-aggregation" and DS in CDRs	(HC7) grafting
HIS5							VAL
PRO7							SER
LEU11							VAL
VAL12							LYS
PRO17			SER	SER	SER	SER	SER
LEU20							VAL
LYS38							ARG
ARG40							ALA
ARG43	GLN	GLN					GLN
ASP55		GLU			GLU	GLU	
ASN61							ALA
LYS65							GLN
ASP66							GLY
LYS67	ARG	ARG					ARG
SER76							THR
ILE81							MET
GLN82							GLU
THR87							ARG
SER91							THR
VAL93				LYS		LYS	
THR112							LEU
LEU113							VAL
SER116	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	
	3 muta-tions	4 muta-tions	2 muta-tions	3 muta-tions	3 muta-tions	4 muta-tions	20 muta-tions

PAGE INTENTIONALLY LEFT BLANK

Humanized variable sequences were generated by gene synthesis and cloned into the corresponding heavy and light chain expression vectores as described in example 1C.

Engineered light chain sequences

Five versions light chain variants were cloned (LC1, LC2, LC3, LC4, LC5). Mutations introduced through the engineering of the variable chains are highlighted or underlined.

LC1 (humanizing mutations bold underlined):

NIVLTQSPSS LAVSVGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QQKPGKAPKL LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQADDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K (SEQ ID NO:33)

LC2 (humanizing mutations are highlighted, mutation for CDR NS site typed bold underlined):

NIVLTQSPSS LAVSVGQRAT ISCRASESVE SYGQSFIYWY QQKPGKAPKL LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQADDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K (SEQ ID NO:34)

LC3 (humanizing and stabilizing mutations highlighted):

NIVLTQSPSS LSVSVGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QQKPGQAPKL LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQAEDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K (SEQ ID NO:35)

LC4 (humanizing and stabilizing mutations are highlighted, mutation for CDR NS site bold underlined):

NIVLTQSPSS LSVSVGQRAT ISCRASESVE SYGQSFIYWY QQKPGQAPKL LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQAEDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K (SEQ ID NO:36)

LC5 (grafted mutations are highlighted):

NIVLTQSPAS LAVSPGQRAT ITCRASESVE SYGNSFIYWY QQKPGQPPKL
LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTIN PVEADDTANY YCQQNNEDPY
TFGGGTKLEI K (SEQ ID NO:37)

Below is the alignment of the LC anti-α2β1 integrin vs. the VK1-Vh1b human germline:

```
LC_anti_a2b1      NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QQKPGQAPKL
Vk1LC             DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS SYLN----WY QQKPGKAPKL

LC_anti_a2b1      LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPY
Vk1LC             LIYAASSLQS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDLATY YCQQSYSTPP

LC_anti_a2b1      TFGGGTKLEI K-
Vk1LC             TFGQGTKVEI KR (SEQ ID NO:51)
```

Engineered heavy chain sequences

Seven versions of heavy chain variants (HC1, HC2, HC3, HC4, HC5, HC6, HC7) were cloned. Mutations introduced through the engineering of the variable chains are highlighted.

HC1 (humanizing mutations highlighted):

QVQLHQPGAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGQGLEWIGR
IDPSDSETHY NQKFKDRATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG
RGYFDYWGQG TTLTVVS (SEQ ID NO:38)

HC2 (humanizing mutations are highlighted, potentially problematic motifs [CDR DS site]):

QVQLHQPGAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGQGLEWIGR
IDPSESETHY NQKFKDRATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG
RGYFDYWGQG TTLTVVS (SEQ ID NO:39)

HC3 (humanizing and stabilizing mutations highlighted):

QVQLHQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR
IDPSDSETHY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG
RGYFDYWGQG TTLTVVS (SEQ ID NO:40)

HC4 (humanizing and stabilizing mutations are highlighted, anti-aggregation mutation):

QVQLHQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR
IDPSDSETHY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAKYYCAKVG
RGYFDYWGQG TTLTVVS (SEQ ID NO:41)

HC5 (humanizing and stabilizing mutations are highlighted, potential problematic motifs [CDR DS site]):

QVQLHQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR
IDPSESETHY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG
RGYFDYWGQG TTLTVVS (SEQ ID NO:42)

HC6 (humanizing and stabilizing mutations are highlighted, potential problematic motifs [CDR DS site], *anti-aggregation mutation*):

QVQLHQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR
IDPSESETHY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SA*K*YYCAKVG
RGYFDYWGQG TTLTVVS (SEQ ID NO:43)

HC7 (grafted mutations are highlighted):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGR
IDPSDSETHY AQKFQGRATL TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAKVG
RGYFDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:44)

Below is the alignment of the HC anti-α21 integrin mAb vs. the HC Vk1_Vh1b human germline:

HC2_anti_α2 QVQLHQPGAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR
Vh1b QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYYMHWVRQA PGQGLEWMGW
HC2_anti_α2 IDPSDSETHY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG
Vh1b INPNSGGTNY AQKFQGRVTM TRDKSSSTAY MELSSLRSED TAVYYCARWG
HC2_anti_α2 RGY------F DYWGQGTTLT VSS
Vh1b YDYDVFYYAM DYWGQGTLVT VSS (SEQ ID NO:52)

The variable heavy and light chains of each anti-integrin α_2 mAb variant (5 different light chains: VL1-VL5 and 7 different heavy chains: VH1-VH7) were generated by gene synthesis including a 5'UTR-Sequence (5'-GTGCACAGC-3') with ApaLI and a 3'UTR (5'-GCTTCCACCAAGGGCCC-3') with ApaI (heavy chain) or BsiWI (light chain). The variable heavy domains were ligated into the ApaLI/ApaI sites of a modified pXL expression vector which contains a mutated variant of the human constant heavy chain (IGHG4, Swiss-Prot P01861, S108P, L115E) giving rise to an anti-integrin α_2 VH-IGHG4 constant heavy chain mAb.

The variable light domains were ligated into the ApaLI/BsiWI sites of a modified pXL expression vector which contains the human constant light chain (IGKC, Swiss-Prot: Q502W4) giving rise to an anti-integrin α_2 VL-IGKC constant light chain mAb. The complete process of gene synthesis, cloning and DNA production was realized by a commercial vendor (Geneart AG).

For comparison, a humanized hIgG4 anti-alpha 2 integrin antibody known in the art (TMC2206) was used ("the comparator"). The comparator light- and heavy chain amino acid sequences are listed herein as SEQ IDs NO: 53 and 54 in Figure 10e.

Table 7: List of humanization variants of anti- α_2-integrin mAb

LC/HC combination	Humanization variant
LC1/HC1	Mutations adressing humanization only
LC2/HC2	Mutations adressing humanization only and LC/HC potentially problematic sites (NS; DS)
LC3/HC3	Mutations adressing humanization and stabilization
LC3/HC4	Mutations adressing humanization and stabilization and anti-aggregation
LC4/HC5	Mutations adressing humanization and stabilization and LC/HC potentially problematic sites (NS; DS)
LC4/HC6	Mutations adressing humanization and stabilization and anti-aggregation and LC/HC potentially problematic sites (NS; DS)
LC5/HC7	Mutations adressing humanization by grafting
TMC2206	Comparator according to SEQ ID NO:53

In order to verify the sequences, the mAbs were analyzed using mass spectrometry. For intact mass measurements the sample was trapped for 20 minutes and desalted with 20 µl/min on a monolithic trap column with 2% Acetonitrile / 0.1% TFA (v/v) prior to elution with a gradient ranging from 15 % Eluent A (H2O / 0.05 %TFA) to 50 % Eluent B (Acetonitrile / 0.05% TFA).

The sample was separated operating in nanoflow (300 nl/min) on an monolithic column (PS-DVB; 100µm I.D. x 5 cm) with a temperature of 37°C. Introduction of the sample was carried out using electrospray needles from new objective with an outer diameter of 365µm, inner diameter of 75 µm and an end tip diameter of 15 µm plus sheath gas. After acquisition the

spectra were summed over the corresponding time range and deconvoluted using the protein reconstruction tool delivered with BioAnalyst from Applied Biosystems/MDS Sciex.

Protein sequences were translated from plasmid coding sequences and the masses of the HC and LC were calculated (Table 8).

Table 8: Mass spectrometric analysis of the purified humanized anti-α_2-integrin mAbs.

LC/HC combination	Light chain			Heavy chain		
	Expected Da	Measured Da	ppm	Expected Da (G0F)	Measured Da	ppm
LC1/HC1	23727.38	23724.56	119	50314.47	50311.80	53
LC2/HC2	23741.41	23738.26	130	50328.5	50327.52	19
LC3/HC3	23757.36	23753.89	146	50304.47	50301.96	50
LC3/HC4	23757.36	23754.17	134	50333.52	50331.29	44
LC4/HC5	23771.39	23769.87	64	50318.5	50317.68	16
LC4/HC6	23771.39	23768.13	137	50347.54	50350.26	54
LC5/HC7	23792.41	23789.01	142	50187.3	50184.84	49
TMC2206	23378.01	23374.51	150	50237.54	50233.48	81

The observed values were in good agreement with the calculated masses and verify the cloned constructs.

Example 4 - Evaluation of α2 integrin mAB in biochemical and cell-based assays *in vitro*

For the Solid Phase Assay, integrin (α_2-I-domain: α_2-I-domain GST aa 140-339 in TBS/5mM Mn^{2+}, 50µl/well;) was immobilized on 96-well plate (Corning Costar, 3690), at room temperature overnight. Then, 25µl/well of blocking solution (5 % BSA (crude) (A7906), 1xTBS) were added and discarded. 200µl/well of blocking solution were added and left for 3h at room temperature. After a washing step (3 times with 200µl/well binding buffer: 1xTBS and 0,1% BSA (A7638) and 2mM Mn^{2+}; TBS: 150mM NaCl, 25mM Tris (Fluka 93371) pH7.4), samples were incubated at RT for 3h stationary with 50 µl of:

a) biotinylated collagen only - control (10µl binding buffer and 40µl biot. collagen)

b) 10µl/well compound, 40µl/well biotinylated collagen

c) Blank: 50µl/well binding buffer

After a washing step (3 times with 200µl/well binding buffer), samples were incubated with 50µl/well ExtrAvidin Peroxidase (Peroxidase conjugate, Sigma E2886; 1:500 in binding buffer) for 30 min at RT and again washed 4 times with 200µl/well binding buffer. After addition of 50 µl/well peroxidase substrate (ABTS solution; 2,2'-Azino-bis 3-Ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), Sigma A-1888; 275µl (11mg ABTS dissolved in 0,5ml dH_2O; and5,5ml 0.1M Sodium-acetate (Sigma S-3272) / 0.05M NaH_2PO_4 (Riedel de Haen 04270) pH5.0; and 55µl H_2O_2 Sigma H-1009 (10µl (= 30%) and 1045µl dH_2O) for 10 - 30 min at RT, stationary (untill green staining is obtained) and addition of 50 µl/well 2 % SDS, absorbance was read out at 405 nm (SpectraMax 190). % Inhibition is calculated as 100-((mean value compounds*100)/mean value collagen positive control) after blank subtraction.

Table 9: Inhibition of collagen interaction by α 2 integrin mAB

Assay	α2β1-collagen interaction	α2-I-domain-collagen interaction	α2β1-collagen interaction (4% HSA)	Static human plateletadhesion to collagen (washed plt)	Static human platelet adhesion to collagen (PRP)	Human platelet adhesion to collagen under shear (whole blood) 3000 s-1
IgG4 IC50 (µg/mL)	0.05	0.2	na	0.017	0.3	na
IgG4 IC50 (nM)	0.3	1.5	na	0.1	6.7	na
Fab IC50 (µg/mL)	0.2	na	0.4	0.04	0.3	0.06
Fab IC50 (nM)	4.2	na	8.2	0.8	6.7	1.3

In summary, α 2 integrin mAB showed no effect on α1β1/collagen interaction (solid phase assay), α5β1/fibronectin interaction (solid phase assay), aIIbb3 (GPIIbIIIa) activation (FACS-

assay), P-selectin expression on hu plt (FACS-assay), human platelet aggregation in whole blood alone or after stimulation with ADP, TRAP, collagen, LDH-, TNFα-, or IL1β-release from hu PBL (alone or in combination with LPS).

Huvec tubule length formation

To assess the activity of the integrin anti-a2 mab in angiogenesis an in vitro assay with HUVEC cells was performed. Matrigel (BD Biosciences, #354230) was mixed with collagen type I (BD Biosciences #35429) (matrigel 1/3.25, PBS 5x 1/5, collagen I 1mg/ml, qsp water) and incubated for 1h at 37°C, 5% CO2. The adherent HUVEC cells were carefully detached from culture flasks with Acutase solution, centirfuged and resuspended in culture medium (EBM, FCS 2%, EGF bullet kit) at 1.2 105 cells/ml. 100µl of the cell suspension were added to the wells with the matrix in the presence or absence of serial dilutions of anti-a2 mab and FGF2 (Peptrotech, 10ng/ml) and incubated for 18h at 37°C, 5% CO2. For detection of tubule formation, cresyl violet solution was added and incubated for 30 min at 37°C. The tubule formation was determined by measuring the sum of the tubule length per well. Calculations were performed versus negative control (without FGF2) and positive controls (with FGF2 abut without anti-a2 mab) using Image Proand software (MediaCybernetics), measuring 6 replicats per condition. The according results are shown in Fig. 2. Anti-alpha2-Integrin mAB was able to inhibit FGF2-induced angiogenesis in a dose dependent manner.

Example 5 - Inhibition of platelet adhesion to collagen by anti- α2 integrin mAB-Fab under flow and under static conditions

For protein-protein interaction studies either recombinantly expressed integrin α2β1 integrin or the I-domain of integrin α2β1 integrin was coated to 96-well plates (Corning Costar 3690) in TBS buffer over night at 4°C. After washing off excessive protein, the plates were blocked with BSA solution (5% Sigma A7906) and washed again. Serial dilutions of α2 integrin Mab were added to the plates as well as biotinylated collagen (rat tail, Sigma C8897). This was performed in the presence or absence of 4% HSA. After an incubation of 2h at room temperature the plates were washed again. Extravidin Peroxidase solution (Sigma E2886) was added and the plates are incubated for 20 min in the dark. Measurement was performed in an Elisa reader

(SpectraMax190 Molecular Devices) at 405nM. Percentage of inhibition and IC50s are calculated versus known standards.

For platelet binding studies to collagen, plates (Isoplate, Perkin Elmer, F1450 571) were coated with collagen (Sigma C8897) in TBS for 1 h at room temperature. The wells were washed with TBS repeatedly before serial dilutions of anti-α2 integrin MAb were added. Freshly prepared human platelet rich plasma or isolated human platelets, which were anticoagulated with hirudin, PGE1 and ReoPro and labelled with CalceinAM (C-3099 Molecular Probes were added and incubated for 90 min at room temperature protected from light. After washing, the plates were measured in an M5 reader (Molecular Devices) at 492 nM EX, 535 nM EM. Percentage of inhibition and IC50s are calculated versus known standards.

In experiments under shear, anti-α2 integrin mAB was analysed for its ability to inhibit platelet adhesion to collagen under flow. Glass capillaries were coated with collagen over night at 4°C. After washing and blocking with BSA, they were installed in a flow device. Freshly drawn anti-coagulated human blood from volonteers was labelled with DiOC6(3) and incubated for 10 min with serial dilutions of anti-α2 integrin mAB at 37°C. The samples were flown through the capillaries at a shear rate of 3000s-1 mimicking arterial flow. After rinsing the capillaries, 10 pictures were taken representing the surface of the capillary which was in contact with the flowing blood. Using an imaging software, surface coverage was determined and percentage of inhibition and IC50s were calculated versus known standards.

For the thrombocyte adhesion assay, thrombocytes were enriched as follows: Hirudin (20µg/ml; Refludan (Pharmion)) and blood was centrifuged at 150g for 20min to produce anticoagulated human blood. platelet rich plasma (PRP) was collected and again centrifuged and collected as above. Platelet poor plasma was obtained from the remaining blood by centrifugation at 1940 g for 10 min (2 times). PPP was added to the diluted cells (2mM Mg) and concentration of cells was adjusted to 2 x 10^5/µl. Cells were left for 0.5 hrs and diluted to 5x10^4 / µl. Thereafter cells were contacted with 3µg/ml ReoPro (2.5µg/ml; Centocor B.V., Leiden, NL) (10 min, RT), 6mM $MnCl_2x4H_2O$ (5mM) was added (incubation for 10 min).

Plates were prepared as follows: Plates (Perkin Elmer, IsoPlate, 1450-571) were incubated with 100µl / well collagen Type I 10µg/ml (Type I from rat tail C8897 Sigma Stock 200µg/ml in 0,01M in acetic acid) at RT for 1 hr. Then, they were washed 3 times with 200µl / well TBS (50mM Tris-HCl pH 7.4, 120mM NaCl, 2,7mM KCl, 0.05mM $CaCl_2$, 2mM $MgCl_2$ x 6 H_2O, 0.1 % BSA. Thereafter, 10µl/well compound and ReoPro- and Mn-treated thrombocytes ($5x10^4$ cells/µl, 50µl/well) were added. Cells were incubated for 1.5 hrs (darkness) and washed 3 times with 200µl/well TBS. 2.5µM Calcein AM (50µl/well, C-3099, Molecular Probes, MW 994.87, 30 min, RT) was added, followed by a washing step. The read out step was carried out using a SpectraMax M5: Fluoreszenz EX 492 EM 535 Cutoff: 530 Automatic in the absence of cells. % Inhibition is calculated as 100-((mean value compounds*100)/mean value control) after blank subtraction.

As can be gained from figure 3, anti-α2 integrin mAB dose dependently inhibits platelet adhesion under shear stress, with a nanomolar IC50.

Example 6 - Aggregation behaviour of anti-α_2-integrin mAbs as determined by size exclusion chromatography

All humanized variants and the comparator were tested for the aggregation percentage. Size exclusion chromatography was performed on an ÄKTA explorer 10 (GE Healthcare) using a TSKgel G3000SWXL column (7,8mm ID x 30,0 cm L, TosohBioscience) with a TSKgel SWXL guard column (TosohBioscience). 30µl of sample at 0.4-1mg/ml were injected and the chromatography was performed at 1ml/min using 100 mM Na_2SO_4, 100 mM Na_2HPO_4, 0.05% NaN_3 pH 6.7 as running buffer and a detection wavelength of 280nm. The column was calibrated using gel filtration molecular weight markers (Sigma Aldrich). Data evaluation was done using Unicorn software v5.11 (GE Healthcare).

Table 10: Aggregation percentage of anti-α_2-integrin mAbs determined by size exclusion chromatography.

LC/HC combination	Aggregation [%]	Peakheight [mAU]

LC1/HC1	< 0.5	74.4
LC2/HC2	< 0.5	47.8
LC3/HC3	< 0.5	93.7
LC3/HC4	2.3	67.2
LC4/HC5	1.8	67.9
LC4/HC6	< 0.5	29.1
LC5/HC7	< 0.5	46.5
TMC2206	11.8	20.7

As can be gained from table 10, all tested variants of the alpha-2 integrin mAb have a low percentage of aggregates. When compared with the aggregation behaviour of the comparator, all tested alpha-2 integrin antibodies exhibited lower aggregation percentage values than the comparator.

Example 7 – Kinetic binding data of anti-α_2-integrin mAbs determined by Biacore

Surface plasmon resonance technology on a Biacore 3000 (GE Healthcare) was used for a detailed kinetic characterisation of the purified humanized antibodies. A capture assay was used with the anti-integrin antibody captured by an anti-human Fc specific antibody (MAB1302, Millipore) and the integrin α_2 I domain was used as analyte. Typically, 120 RU of anti-integrin antibody were captured on a research grade CM5 by the immobilised anti-human Fc specific antibody, resulting in an Rmax of 30 RU for the I domain bound to the antibody. Binding kinetics were measured over a concentration range between 0.8 to 25 nM I domain in HBS-P buffer supplemented with 4 mM $MgCl_2$ (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005 % surfactant P20) at a flow rate of 30 µl/min. Chip surfaces were regenerated with 10 mM glycine pH 2.5. Kinetic parameters were analysed and calculated in the BIAevaluation program package (version 4.1) using a flow cell with the immobilised anti-human Fc specific antibody as reference. A 1:1 binding model with mass transfer was applied for a global fit of the data for curves corresponding to analyte concentrations from 0.8-25 nM of antibody.

Table11). Three variants have a similar K_D in Biacore as the non-humanized mAb:

-combination LC1/HC1 (Mutations adressing humanization only)

-combination LC3/HC3 (Mutations adressing humanization and stabilization)

-combination LC3/HC4 (Mutations adressing humanization and stabilization and anti-aggregation).

The variant mutation by grafting is close to the non-humanized mAb.

Example 8 – Epitope determination of anti- alpha 2 integrin antibody

In order to verify the epitope of the non-humanized anti-alpha 2 mAb with the comparator mAb, epitope characterisation was performed using surface plasmon resonance technology on a Biacore 3000 (GE Healthcare). The Fab fragment corresponding to the non-humanized anti-alpha 2 mAb was immobilized on a CM5 chip by amine reactive coupling at 500 RU. The integrin I domain was captured by the Fab fragment at 10µl/min and after a short dissociation period, the antibody TMC2206 was allowed to bind at 30µl/min to the α_2 I domain. Regeneration was performed with 10mM Glycine buffer pH 2.0. In a second experiment the comparator mAb TMC2206 was captured on a surface of anti-human Fc specific antibody (MAB1302 Millipore). Then the integrin I domain was bound followed by the non-humanized Fab. The results can be gained from figures 13 and 14. The results clearly show that the comparator antibody, TMC2206 binds to the integrin I domain prebound by non-humanized Fab.

Thus, the non-humanized Fab binds to the integrin I domain which is pre-bound by the comparator mAb TMC2206. Simultaneous binding of the non-humanized Fab and the comparator mAb to the integrin α_2 I domain indicates that the epitope of both the Fab and the comparator mAb are not identical. This means that the anti alpha 2 antibody of present invention and the comparator antibody bind different epitopes within alpha 2 integrin.

Example 9 – platelet binding assays under static conditions using collagen-coated plates and washed platelets or platelet-rich plasma

As α2β1 integrin is expressed on blood platelets, playing an important role in their adhesion to collagen, an in vitro assay system for platelet binding studies using these cells was used. For platelet binding studies, plates (Isoplate, Perkin Elmer, F1450 571) were coated with collagen (Sigma C8897) in TBS for 1 h at room temperature. The wells were washed with TBS repeatedly before serial dilutions of anti-α2 integrin mAb were added. Freshly prepared human platelet rich plasma or freshly isolated human platelets, which were anticoagulated with hirudin, PGE1 and ReoPro and labelled with CalceinAM (C-3099 Molecular Probes were added and incubated for 90 min at room temperature protected from light. After washing, the plates were measured in an M5 reader (Molecular Devices) at 492 nM Exitation, 535 nM Emission. Percentage of inhibition and IC50s are calculated versus titration curves prepared using small molecule inhibitors of alpha-2-Integrin or the non-humanized alpha-2 mAB . The results can be gained from Table 12.

Table 12: Inhibition of binding of washed platelets to collagen

LC/HC combination	IC50 µg/ml
LC1/HC1	0.021
LC2/HC2	0.092
LC3/HC3	0.012
LC3/HC4	0.016
LC4/HC5	0.057
LC4/HC6	0.068
LC5/HC7	0.031
TMC2206 (comparator)	0.023

As can be gained from the results shown in table 12, platelet inhibition displayed by the different anti alpha 2 antibody variants under static conditions using washed platelets is comparable to

that of the comparator antibody and for some variants (LC3/HC3 or LC3/HC4) even significantly or slightly (LC1/HC1) stronger.

Table 13: Inhibition of binding of platelets to collagen in platelet rich plasma

LC/HC combination	MW IC50 µg/ml
LC1/HC1	0.277
LC2/HC2	3.963
LC3/HC3	0.132
LC3/HC4	0.193
LC4/HC5	3.251
LC4/HC6	4.113
LC5/HC7	0.224
TMC2206	0.110

As can be gained from the results shown in table 13, platelet inhibition displayed by the different anti alpha 2 antibody variants under static conditions using platelet-rich plasma, variants LC1/HC1, LC3/HC3, LC3/HC4 and LC5/HC7 is comparable to that of the comparator antibody.

As can be concluded from the static platelet binding assays, the humanized forms of the anti-α_2-integrin antibody block adhesion of freshly isolated human platelets in the presence or absence of blood plasma in a concentration dependent manner. Four of the variants show a similar inhibitory activity in the bioassay as the non-humanized mAb:

-combination LC1/HC1 (Mutations adressing humanization only)

-combination LC3/HC3 (Mutations adressing humanization and stabilization)

-combination LC3/HC4 (Mutations adressing humanization and stabilization and anti-aggregation)

-combination LC5/HC7 (Mutations adressing humanization by grafting)

The three variants adressing the problematic sites (NS; DS) LC2/HC2, LC4/HC5 and LC4/HC6 and showing lower platelet inhibition in the above platelet binding experiments were identical with the variants exhibiting weaker α2 I domain binding activity than not-humanized anti-alpha 2 integrin antibody in the above Biacore experiments of example 7 (see table 11). Thus, the results of the platelet binding assays are well in accordance with the affinity data from the Biacore evaluations.

Example 10 – Thermal stability of the different anti alpha 2 antibody variants

Results with respect to thermal stability are summarized in table 14. The antibodies show comparable, equal or better thermal stability as the comparator. Thermostability measurements are performed using a PCR thermocycler (My-IQ –two in a temperature range between 10 and 90 °C with 1 °C/min. Two microgram of antibody diluted in PBS buffer was supplemented with 40XSYPRO Orange (Invitrogen).

Table 14: thermal stability of the different variants

LC/HC combination	Melt. Temp °C (1)	Melt. Temp °C (2)
LC1/HC1	64	-
LC2/HC2	63	-
LC3/HC3	64	68
LC3/HC4	66	-

LC4/HC5	62	67
LC4/HC6	66	-
LC5/HC7	65	72
TMC2206 (comparator)	65	71

Claims

1. Peptide or peptide complex, preferably isolated monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof, wherein said peptide or peptide complex, antibody or fragment specifically binds to the I-domain of a human α2-integrin, said antibody or fragment comprising a heavy chain variable region (VH) domain and a light chain variable region (VL) domain, wherein said antibody or fragment cross-reacts with a non-human primate α2-integrin but does not cross-react with a non-primate α2-integrin.

2. Peptide or peptide complex, preferably isolated monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof, wherein said peptide or peptide complex, antibody or fragment specifically binds to the I-domain of a human α2-integrin, said antibody comprising a heavy chain variable region (VH) domain and a light chain variable region (VL) domain, wherein said antibody or fragment competes with a reference antibody for binding to the epitope of the reference antibody, said reference antibody comprising a light chain encoded by the plasmid as deposited with the DSMZ under accession No. DSM 23944 and a heavy chain encoded by either (i) the plasmid as deposited with the DSMZ under accession DSM 23946 or (ii) the plasmid as deposited with the DSMZ under accession No. DSM 23945.

3. Peptide or peptide complex preferably isolated monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof, comprising one or more of the following components a to f:

a) LCDR1, wherein LDR1 is RASESVESYGNSFIY (SEQ ID NO:6) or a functionally active variant thereof,

b) LCDR2, wherein LDR2 is LASNLAS (SEQ ID NO:7) or a functionally active variant thereof,

c) LCDR3, wherein LDR3 is QQNNEDPYT (SEQ ID NO:8) or a functional active variant thereof,

d) HCDR1, wherein HDR1 is (GYTFTSYWMN, SEQ ID NO:3) or a functionally active variant thereof,

e) HCDR2, wherein HDR2 is RIDPSDSETHYNQKFK (SEQ ID NO:4) or a functionally active variant thereof, and

f) HCDR3, wherein HDR3 is VGRGYFDY (SEQ ID NO:5) or a functional active variant thereof,

and wherein the one or more of the components a) to f) are arranged to allow for binding of the peptide or peptide complex to α2 integrin.

4. Peptide or peptide complex according to one of the claims 1-3,

(i) wherein components a) to c) are comprised in a variable domain of a light chain (VL); and/or

(ii) wherein components d) to f) are comprised in a variable domain of a heavy chain (VH); and/or

(iii) wherein the peptide or peptide complex is an antibody; and/or

(iv) wherein the peptide or peptide complex is a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a Fab, a Fab', a F(ab')2, a Fv, a disulfide linked Fv, a scFv, a $(scFv)_2$, a single domain antibody, a diabody, a multispecific antibody, a dual specific antibody, a isotype antibody, a dual variable domain antibody and a bispecific antibody; and/or

(v) wherein the peptide or peptide complex comprises a heavy chain immunoglobulin constant domain selected from the group consisting of: a human IgM constant domain, a human IgGl constant domain, a human IgG2 constant domain, a human IgG3 constant domain, domain, a human IgG4 constant domain, a human IgE constant domain, and a human IgA constant domain; and/or

(vi) wherein the functionally active variant is a functionally active fragment consisting of at least 90 % sequence identity to any of the amino acid sequences of SEQ ID NOS: 3 to 8; and/or

(vii) wherein the functionally active variant is a functionally active variant having at least 70 %, preferably at least 80 %, more preferably at least 90 % sequence identity to an amino acid sequence of any of SEQ ID NOS: 3 to 8, particularly wherein the functionally active variant is derived from the amino acid sequences of any of SEQ ID NOS: 3 to 8 one or more conservative amino acid substitution; and/or

(viii) comprising the amino acid sequence of

- SEQ ID NO: 1, or a functionally active variant thereof, and/or
- SEQ ID NO: 2, or a functionally active variant thereof, and/or

- SEQ ID NO: 9, or a functionally active variant thereof, and/or
- SEQ ID NO: 10, or a functionally active variant thereof, and/or
- SEQ ID NO: 11, or a functionally active variant thereof, or

(ix) consisting of the amino acid sequence of

- SEQ ID NO: 1, or a functionally active variant thereof, and
- SEQ ID NO: 2, or a functionally active variant thereof, and
- optionally 50 additional amino acid residue(s), preferably 1 to 40, more preferably 1 to 30, even more preferably at most 1 to 25, still more preferably at most 1 to 10, most preferably 1, 2, 3, 4 or 5 additional amino acids residue(s)

or

(x) consisting of the amino acid sequence of

- SEQ ID NO: 9, or a functionally active variant thereof, and
- SEQ ID NO: 10, or a functionally active variant thereof, and
- optionally 50 additional amino acid residue(s), preferably 1 to 40, more preferably 1 to 30, even more preferably at most 1 to 25, still more preferably at most 1 to 10, most preferably 1, 2, 3, 4 or 5 additional amino acids residue(s)

or

(xi) consisting of the amino acid sequence of

- SEQ ID NO: 9, or a functionally active variant thereof, and
- SEQ ID NO: 11, or a functionally active variant thereof, and
- optionally 50 additional amino acid residue(s), preferably 1 to 40, more preferably 1 to 30, even more preferably at most 1 to 25, still more preferably at most 1 to 10, most preferably 1, 2, 3, 4 or 5 additional amino acids residue(s).

5. Peptide or peptide complex according to one of the claims 1 - 4;

- wherein the functionally active variant of LDR1 comprises the mutation at amino acid position 11, particularly 11Asn→Gln; and/or
- wherein the functionally active variant of HDR2 comprises the mutation at amino acid position 6, particularly 6Asp→Glu; and/or

- wherein the functionally active variant of SEQ ID NO: 1 comprises one or more mutations at amino acid positions 9, 12, 15, 22, 34, 46, 47, 80, 83, 85, 87 and/or 89, particularly selected from the group consisting of 9Ala→Ser, 12Ala→Ser, 15Leu→Val, 15Leu→Pro, 22Ser→Thr, 34Asn→Gln, 46Gln→Lys, 47Ala→Pro, 80Asp→Asn, 83Glu→Gln, 85Asp→Glu, 87Ala→Thr and 89Thr→Asn; and/or
- wherein the functionally active variant of SEQ ID NO: 2 comprises one or more mutations at amino acids positions 5, 7, 11, 12, 17, 20, 38, 40, 43, 55, 61, 65, 66, 67, 76, 81, 82, 87, 91, 93, 112, 113 and/or 116, particularly selected from the group consisting of 5His→Val, 7Pro→Ser, 11Leu→Val, 12Val→Lys, 17Pro→Ser, 20Leu→Val, 38Lys→Arg, 40Arg→Ala, 43Arg→Gln, 55Asp→Glu, 61Asn→Ala, 65Lys→Gln, 66Asp→Gly, 67Lys→Arg, 76Ser→Thr, 81Ile→Met, 82Gln→Glu, 87Thr→Arg, 91Ser→Thr, 93Val→Lys, 112Thr→Leu, 113Leu→Val and 116Ser→Val .

6. The Peptide or peptide complex according to any of the claims 1-5, wherein said antibody or fragment specifically binds to the I-domain of the human α2-integrin with nM binding affinity.

7. The Peptide or peptide complex according to any of the claims 1-6, wherein said peptide or peptide complex inhibits the interaction of the human α2-integrin with collagen *in vitro*, thereby inhibiting the activation of platelets due to adhesion of said platelets to said collagen.

8. The Peptide or peptide complex according to any of the previous claims, said heavy chain variable region domain comprising the heavy chain HCDR3 of SEQ ID NO:5.

9. The Peptide or peptide complex according to any of the previous claims, said heavy chain variable region domain comprising the heavy chain CDRs of SEQ ID NO:3 (HCDR1), SEQ ID NO:4 (HCDR2), and SEQ ID NO:5 (HCDR3), or functionally active variants thereof.

10 .The Peptide or peptide complex according to claim 9, wherein the functionally active variant of HCDR2 comprises the mutation Asp→Glu at amino acid position 6.

11. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, said light chain variable region domain comprising the light chain LCDR3 of SEQ ID NO:8.

12. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, said light chain variable region domain comprising the light chain CDRs of SEQ ID NO:6 (LCDR1), SEQ ID NO:7 (LCDR2), and SEQ ID NO:8 (LCDR3), or functionally active variants thereof.

13. The Peptide or peptide complex according to claim 12, wherein the functionally active variant of LCDR1 comprises the mutation Asn→Gln at amino acid position 11.

14. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, said heavy chain variable region (VH) domain having at least 90%, 95%, 97% or 99% sequence identity to the VH sequence of SEQ ID NO: 2.

15. The Peptide or peptide complex according to claim 14, wherein said heavy chain variable region (VH) domain comprises the sequence of SEQ ID NO:2 or a functionally active variant thereof.

16. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, said light chain variable region (VL) domain having at least 90%, 95%, 97% or 99% sequence identity to the VL sequence of SEQ ID NO: 1.

17. The Peptide or peptide complex according to claim 16, wherein said light chain variable region (VL) domain comprises the sequence of SEQ ID NO:1 or a functionally active thereof.

18. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, wherein said heavy chain variable region (VH) domain comprises one or more amino acid substitutions at positions selected from the group consisting of H5, H7, H11, H12, H17, H20, H38, H40, H43, H55, H61, H65, H66, H67, H76, H81, H82, H87, H91, H93, H112, H113 and H116.

19. The Peptide or peptide complex according to claim 18, wherein the one or more amino acid subsitutions are selected from the group consisting 5His→Val, 7Pro→Ser, 11Leu→Val, 12Val→Lys, 17Pro→Ser, 20Leu→Val, 38Lys→Arg, 40Arg→Ala, 43Arg→Gln, 55Asp→Glu, 61Asn→Ala, 65Lys→Gln, 66Asp→Gly, 67Lys→Arg, 76Ser→Thr, 81Ile→Met, 82Gln→Glu, 87Thr→Arg, 91Ser→Thr, 93Val→Lys, 112Thr→Leu, 113Leu→Val and 116Ser→Val .

20. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, wherein said light chain variable region (VL) domain comprises one or more amino acid substitutions at positions selected from the group consisting of L9, L12, L15, L22, L34, L46, L47, L80, L83, L85, L87, and L89.

21. The Peptide or peptide complex according to claim 20, wherein the one or more amino acid subsitutions are selected from the group consisting of 9Ala→Ser, 12Ala→Ser, 15Leu→Val, 15Leu→Pro, 22Ser→Thr, 34Asn→Gln, 46Gln→Lys, 47Ala→Pro, 80Asp→Asn, 83Glu→Gln, 85Asp→Glu, 87Ala→Thr and 89Thr→Asn.

22. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, said heavy chain variable region (VH) domain having at least 90%, 95%, 97% or 99% sequence identity to a VH sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 38 (HC1), SEQ ID NO:39 (HC2), SEQ ID NO:40 (HC3), SEQ ID NO:41 (HC4), SEQ ID NO:42 (HC5), SEQ ID NO:43 (HC6), and SEQ ID NO:44 (HC7).

23. The Peptide or peptide complex according to claim 22 said heavy chain variable region (VH) domain comprising a VH sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 38 (HC1), SEQ ID NO:39 (HC2), SEQ ID NO:40 (HC3), SEQ ID NO:41 (HC4), SEQ ID NO:42 (HC5), SEQ ID NO:43 (HC6), and SEQ ID NO:44 (HC7).

23. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, said light chain variable region (VL) domain having at least 90%, 95%, 97% or 99% sequence identity to a VL sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 33 (LC1), SEQ ID NO:34 (LC2), SEQ ID NO:35 (LC3), SEQ ID NO:36 (LC4), and SEQ ID NO:37 (LC5).

25. The Peptide or peptide complex according to claim 24, said light chain variable region (VL) domain comprising a VL sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 33 (LC1), SEQ ID NO:34 (LC2), SEQ ID NO:35 (LC3), SEQ ID NO:36 (LC4), and SEQ ID NO:37 (LC5).

26. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, wherein said antibody or binding portion is a chimeric antibody or humanized antibody.

27. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, wherein the antigen binding portion is selected from the group consisting of a Fab, a Fab', a F(ab')2, a Fv, a disulfide linked Fv, a scFv, and a $(scFv)_2$.

28. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, which is selected from the group consisting of a multispecific antibody, a dual specific antibody, a isotype antibody, a dual variable domain antibody and a bispecific antibody.

29. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, comprising a heavy chain immunoglobulin constant domain selected from the group consisting of: a human IgM constant domain, a human IgGl constant domain, a human IgG2 constant domain, a human

IgG3 constant domain, domain, a human IgG4 constant domain, a human IgE constant domain, and a human IgA constant domain.

30. The Peptide or peptide complex according to any one of the previous claims, comprising a human IgG4 constant domain.

31. The Peptide or peptide complex according to according to any of the previous claims, wherein the peptide or peptide complex comprises or consists of an isolated monoclonal anbitody or antigen binding fragment thereof.

32. One or more nucleic acid(s) coding for the peptide or peptide complex according to any of claims 1 to 31.

33. Peptide or peptide complex according to one of the claims 1-31 for use in the treatment, prophylaxis or diagnosis of an α 2- integrin –related disorder or disease.

34. The nucleic(s) of claim 32, wherein the nucleic acid(s) is/are located in a vector.

35. A cell heterologously expressing one of the nucleic acids according to claims 32 or 34.

36. A method for producing a peptide or peptide complex according to any of claims 1 to 31 comprising culturing the cell according to claim 35 under conditions permitting expression of the peptide or peptide complex and optionally recovering the peptide or peptide complex from the host cell.

37. A pharmaceutical composition comprising at least one peptide or peptide complex according to any of claims 1 to 31 and/or at least one nucleic acid according to claim 32 or 34 for use as a medicament.

38. The pharmaceutical composition of claim 37 for use in treating or preventing an α2 integrin-related disease or disorder, preferably selected from the group consisting of thrombosis, a

vascular disease, cancer, including neo-angiogenesis and metastasis, inflammation, inflammatory disease, autoimmune disease and a disease characterized by abnormal or increase angiogenesis, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, reactions to transplant, optical neuritis, spinal cord trauma, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus (SLE), multiple sclerosis, Reynaud's syndrome, experimental autoimmune encephalomyelitis, Sjorgen's syndrome, scleroderma, cardiovascular disease, psoriasis, and infections that induce an inflammatory response.

39. The pharmaceutical composition of claim 37 for use in treating or preventing a vascular disease and/or thrombosis, particularly in the treatment of acute coronary syndrome, percutaneous coronary intervention, ischemic stroke, carotid artery stenosis or peripheral arterial occlusive disease.

40. A method of diagnosing a disease associated with altered α2 integrin, the method comprising

a) contacting a sample comprising α2 integrin with the peptide or peptide complex of any of claims 1 to 31; and

b) detecting binding of α2 integrin to the peptide or peptide complex; and

c) comparing the binding of step b) with a reference,

wherein a altered α2 integrin binding in the sample relative to the reference is indicative of the disease.

41. Article of manufacture comprising

a) a packaging material,

b) a peptide or peptide complex according to one of the claims 1-31 or 33 or a pharmaceutically acceptable salt thereof or comprising the pharmaceutical composition of one of the claims 36-38

c) a label or a package insert, the insert contained within said packaging material, indicating that said peptide or peptide complex is effective for treatment of a disease or disorder, especially an α 2 integrin-related disease disorder.

42. Diagnostic kit for the diagnosis of an α 2-integrin related disorder or disease comprising a peptide or peptide complex according to one of the claims 1-31 and a suitable packaging, and possibly suitable instructions for using said peptide or peptide complex in the detection of α 2 integrin.

43. Method of treatment or diagnosis of an α 2 integrin-related disorder or disease using one or more peptide or peptide complex according to one of the claims 1-31 and/or one or more nucleic acids according to claim 32 or 34 or one of the pharmaceutical compositions according to one of claims 36-38.

44. A method of diagnosing a disease associated with altered α2 integrin, the method comprising

a) contacting a taken sample of an individual with the peptide or peptide complex of any of claims 1 to 31; and

b) detecting binding of α2 integrin to the peptide or peptide complex; and

c) comparing the binding of step b) with the binding of α2 integrin to the peptide or peptide complex in one or more reference samples,

wherein an altered binding in the taken sample relative to the binding detected in the one or more reference samples is indicative of the disease.

Fig. 1A

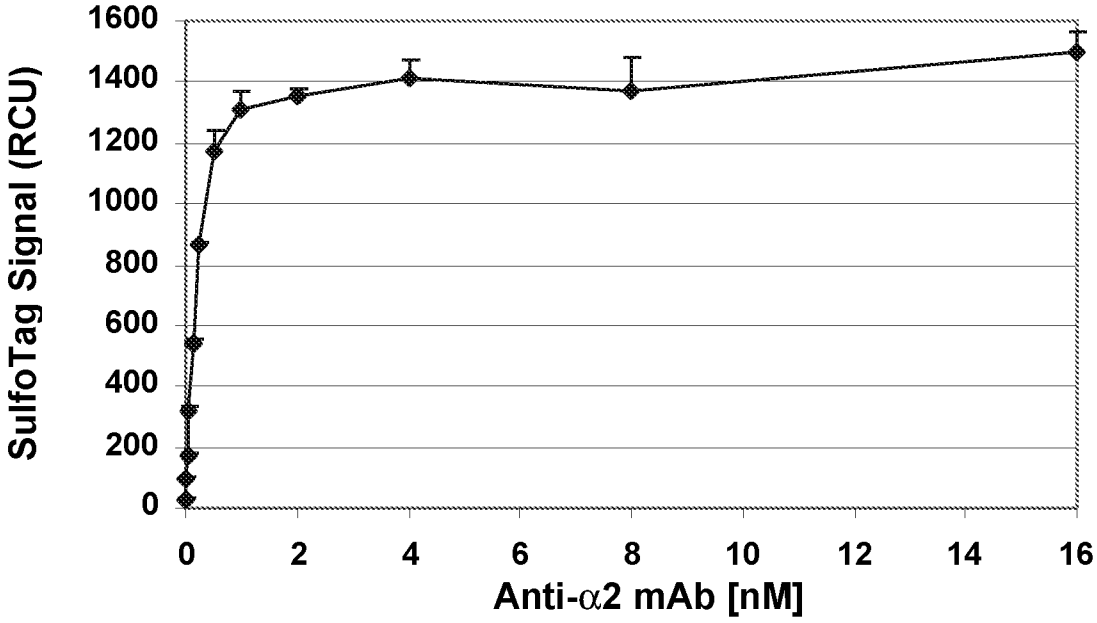
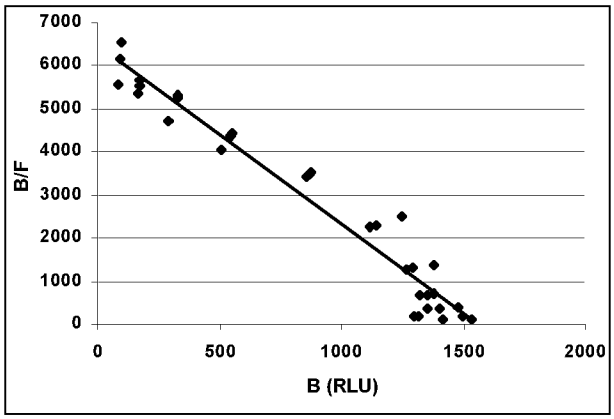


Fig. 1B



Parameter+	Estimate	SD	CV(%)	95%CI
KD (nM)	0.2146	0.01291	6.0	[0.1899 ; 0.2425]

Fig. 2

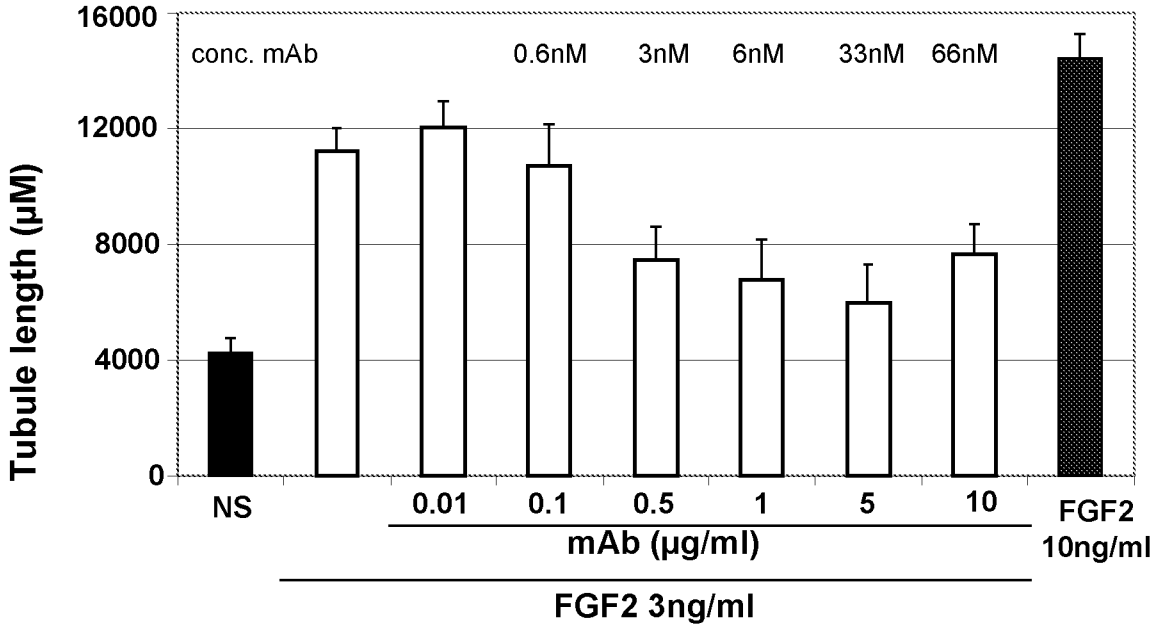

16000
12000
8000
4000
0
Tubule length (µM)
conc. mAb
0.6nM
3nM
6nM
33nM
66nM
NS
0.01
0.1
0.5
1
5
10
FGF2
10ng/ml
mAb (µg/ml)
FGF2 3ng/ml

Fig.3

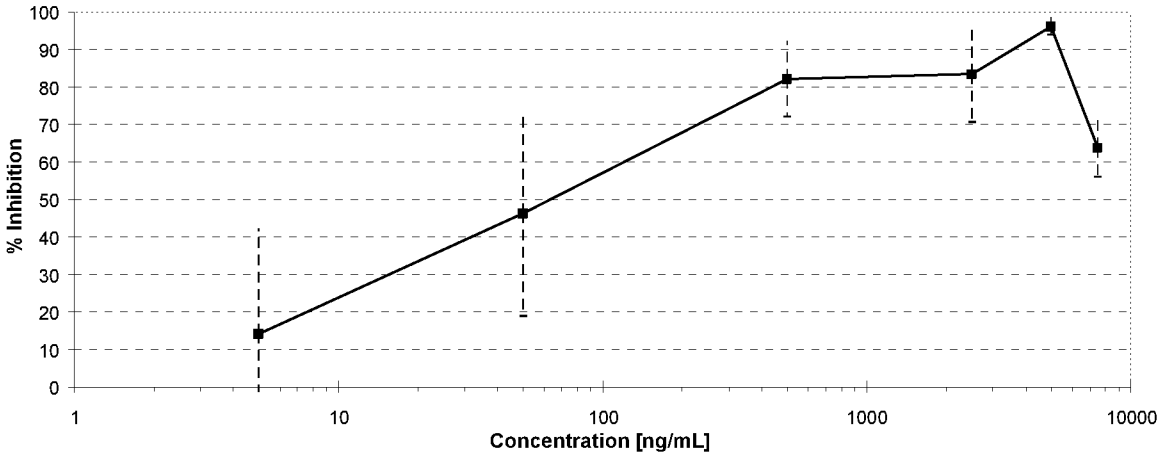

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% Inhibition
1
10
100
1000
10000
Concentration [ng/mL]

Fig.4

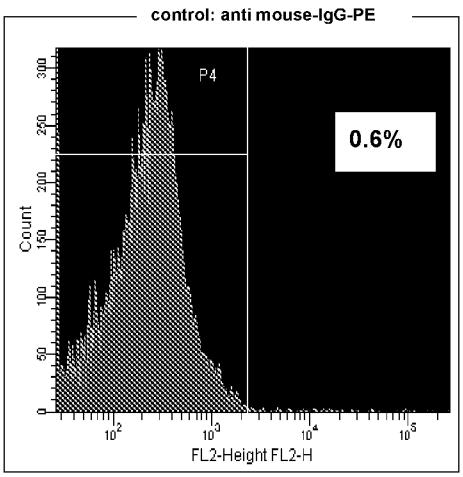


Figure 4a

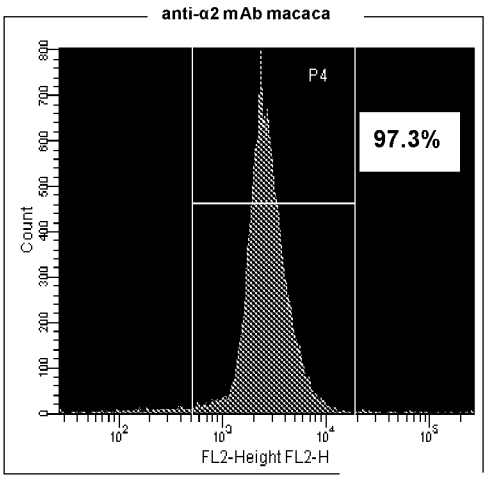


Figure 4b

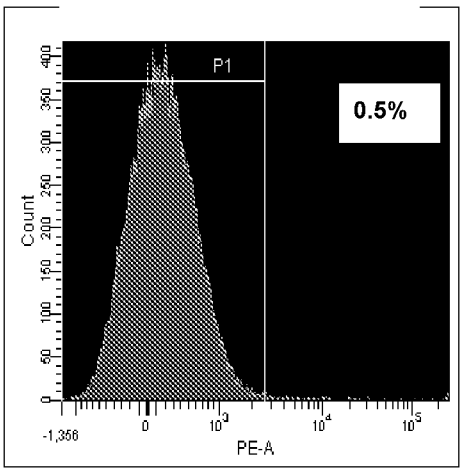


Figure 4c

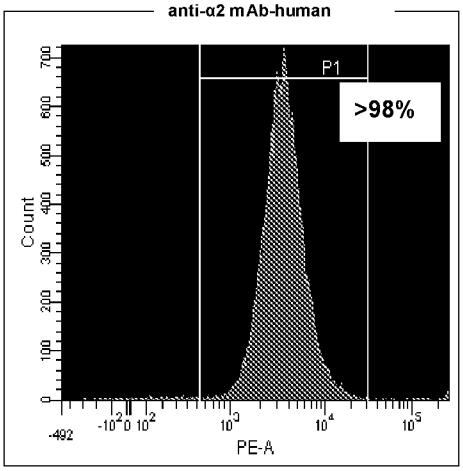


Figure 4d

Fig.5

Fig. 5a) Light chain variable domain of the anti-α2-integrin mAb

NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QQKPGQAPKL LIYLASNLAS GVPARFSGSG
SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K

(SEQ ID NO:1)

AACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATCCTGCAGAGCCAG
TGAAAGTGTTGAGAGTTATGGCAACAGTTTTATTTACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGGCACCCAAACTCCTCA
TCTATCTTGCATCCAACCTAGCATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGACTTCACCCTC
ACCATTGATCCTGTGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAATAATGAGGATCCGTACACGTTCGG
AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

(SEQ ID NO:12)

Fig. 5b) Heavy chain variable domain the anti-α2-integrin mAb

QVQLEQPGAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR IDPSDSETHY NQKFKDKATL
TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG RGYFDYWGQG TTLTVSS

(SEQ ID NO:2)

CAGGTCCAACTGCATCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGGCTCCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGG
CTACACCTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACGAGGCCTCGAGTGGATTGGCAGGATTG
ATCCTTCCGATAGTGAAACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGC
ACAGCCTACATCCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAAGGTGGGACGGGGGTA
CTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

(SEQ ID NO:13)

Fig.6

Fig. 6a: CDRs of the heavy chain variable domain

HCDR1

GYTFTSYWMN

(SEQ ID NO:3)

HCDR2

RIDPSDSETHYNQKFK

(SEQ ID NO:4)

HCDR3

VGRGYFDY

(SEQ ID NO:5)

Figure 6b: CDRs of the light chain variable domain

LCDR1:

RASESVESYGNSFIY

(SEQ ID NO: 6)

LCDR2:

LASNLAS

(SEQ ID NO: 7)

LCDR3:

QQNNEDPYT

(SEQ ID NO: 8)

Fig.7

Fig. 7a: chimeric (anti alpha 2VL-IGKC CL) Light Chain

NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVESYGNSFIYWYQQKPGQAPKLLIYLASNLASGVPA
RFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(Amino Acid Sequence: SEQ ID NO:9)

AACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATCCTGCAGAGCCAG
TGAAAGTGTTGAGAGTTATGGCAACAGTTTTATTTACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGGCACCCAAACTCCTCA
TCTATCTTGCATCCAACCTAGCATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGACTTCACCCTC
ACCATTGATCCTGTGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAATAATGAGGATCCGTACACGTTCGG
AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGC
TGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG
GACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTC
CTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGT
CCAGCCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC

(coding Sequence: SEQ ID NO:14)

Fig.7b: Chimeric (anti α2 VH-IGHG4 CH1) mAb

QVQLHQPGAELVKPGAPVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPGRGLEWIGRIDPSDSETHYNQKF
KDKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCAKVGRGYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPL
APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

(Amino Acid Sequence: SEQ ID NO:10)

CAGGTCCAACTGCATCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGGCTCCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGG
CTACACCTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACGAGGCCTCGAGTGGATTGGCAGGATTG

ATCCTTCCGATAGTGAAACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGC
ACAGCCTACATCCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAAGGTGGGACGGGGGTA
CTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGG
CCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTG
ACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTA
CTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGC
CTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTCCCTGCCCTGCCCCTGAGTTC
GAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGAC
CTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCTGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACA
ACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTCAATTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
GACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGTAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAAACCATCTC
CAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG
TGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAG
AACAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAA
GTCCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGT
CCCTGTCCCTGTCTCTGGGC

(coding Sequence: SEQ ID NO:15)

Fig. 7c: Chimeric (anti α2 VH-IGHG1 CH1) heavy chain Fab fragment

QVQLHQPGAELVKPGAPVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPGRGLEWIGRIDPSDSETHYNQKF
KDKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCAKVGRGYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT*HHHHHH*

(Amino Acid Sequence: SEQ ID NO:11)

CAGGTCCAACTGCATCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGGCTCCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGG
CTACACCTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACGAGGCCTCGAGTGGATTGGCAGGATTG
ATCCTTCCGATAGTGAAACTCACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGC
ACAGCCTACATCCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAAGGTGGGACGGGGGTA
CTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAGCACCAAGGGCCCATCCGTGTTCCCTCTGG
CCCCTTCCTCCAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTG
ACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTA
CTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGC
CCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCTAAGTCCTGTGACAAGACCCACACCCATCACCATCACCATCAC

(coding Sequence: SEQ ID NO:16)

Fig.8

Human constant regions for generation of chimeric antibody constructs

Swiss-Prot: Q502W4

>gi|74740177|sp|Q502W4|Q502W4_HUMAN IGKC protein

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA

DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(Amino Acid Sequence: SEQ ID NO:17)

Swiss-Prot: P01861.1 (S108P, L115E)

>gi|121047|sp|P01861.1|IGHG4_HUMAN RecName: Full=Ig gamma-4 chain C region

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG

TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ

FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL

PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM

HEALHNHYTQKSLSLSLGK

(Amino Acid Sequence: SEQ ID NO:18)

Swiss-Prot: Q569F4

>gi|74735951|sp|Q569F4|Q569F4_HUMAN IGHG1 protein

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG

TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP

EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV

YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC

SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(Amino Acid Sequence: SEQ ID NO:19)

Fig.9

Human α2 and β1 integrin sequences

α2 integrin precursor according to accession No: NP_002194.2:

```
   1 mgpertgaap lplllvlals qgilncclay nvglpeakif sgpsseqfgy avqqfinpkg
  61 nwllvgspws gfpenrmgdv ykcpvdlsta tceklnlqts tsipnvtemk tnmslglilt
 121 rnmgtggflt cgplwaqqcg nqyyttgvcs dispdfqlsa sfspatqpcp slidvvvvcd
 181 esnsiypwda vknflekfvq gldigptktq vgliqyannp rvvfnlntyk tkeemivats
 241 qtsqyggdlt ntfgaiqyar kyaysaasgg rrsatkvmvv vtdgeshdgs mlkavidqcn
 301 hdnilrfgia vlgylnrnal dtknlikeik aiasiptery ffnvsdeaal lekagtlgeq
 361 ifsiegtvqg gdnfqmemsq vgfsadyssq ndilmlgavg afgwsgtivq ktshghlifp
 421 kqafdqilqd rnhssylgys vaaistgest hfvagapran ytgqivlysv nengnitviq
 481 ahrgdqigsy fgsvlcsvdv dkdtitdvll vgapmymsdl kkeegrvylf tikegilgqh
 541 qflegpegie ntrfgsaiaa lsdinmdgfn dvivgsplen qnsgavyiyn ghqgtirtky
 601 sqkilgsdga frshlqyfgr sldgygdlng dsitdvsiga fgqvvqlwsq siadvaieas
 661 ftpekitlvn knaqiilklc fsakfrptkq nnqvaivyni tldadgfssr vtsrglfken
 721 nerclqknmv vnqaqscpeh iiyiqepsdv vnsldlrvdi slenpgtspa leaysetakv
 781 fsipfhkdcg edglcisdlv ldvrqipaaq eqpfivsnqn krltfsvtlk nkresayntg
 841 ivvdfsenlf fasfslpvdg tevtcqvaas qksvacdvgy palkreqqvt ftinfdfnlq
 901 nlqnqaslsf qalsesqeen kadnlvnlki pllydaeihl trstninfye issdgnvpsi
 961 vhsfedvgpk fifslkvttg svpvsmatvi ihipqytkek nplmyltgvq tdkagdiscn
1021 adinplkigq tsssvsfkse nfrhtkelnc rtascsnvtc wlkdvhmkge yfvnvttriw
1081 ngtfasstfq tvqltaaaei ntynpeiyvi edntvtiplm imkpdekaev ptgviigsii
1141 agillllalv ailwklgffk rkyekmtknp deidettels s
```

(SEQ ID NO:20)

α2 integrin coding sequence (hs) according to NCBI accession No: NM_002203.3:

```
   1 atggggccag aacggacagg ggccgcgccg ctgccgctgc tgctggtgtt agcgctcagt
  61 caaggcattt taaattgttg tttggcctac aatgttggtc tcccagaagc aaaaatattt
 121 tccggtcctt caagtgaaca gtttggctat gcagtgcagc agtttataaa tccaaaaggc
 181 aactggttac tggttggttc accctggagt ggctttcctg agaaccgaat gggagatgtg
 241 tataaatgtc ctgttgacct atccactgcc acatgtgaaa aactaaattt gcaaacttca
 301 acaagcattc caaatgttac tgagatgaaa accaacatga gcctcggctt gatcctcacc
 361 aggaacatgg gaactggagg ttttctcaca tgtggtcctc tgtgggcaca gcaatgtggg
 421 aatcagtatt acacaacggg tgtgtgttct gacatcagtc ctgattttca gctctcagcc
 481 agcttctcac ctgcaactca gccctgccct tccctcatag atgttgtggt tgtgtgtgat
 541 gaatcaaata gtatttatcc ttgggatgca gtaaagaatt ttttggaaaa atttgtacaa
 601 ggcctggata taggccccac aaagacacag gtggggttaa ttcagtatgc caataatcca
 661 agagttgtgt ttaacttgaa cacatataaa accaaagaag aaatgattgt agcaacatcc
 721 cagacatccc aatatggtgg ggacctcaca aacacattcg gagcaattca atatgcaaga
 781 aaatatgctt attcagcagc ttctggtggg cgacgaagtg ctacgaaagt aatggtagtt
 841 gtaactgacg gtgaatcaca tgatggttca atgttgaaag ctgtgattga tcaatgcaac
 901 catgacaata tactgaggtt tggcatagca gttcttgggt acttaaacag aaacgccctt
 961 gatactaaaa atttaataaa agaaataaaa gcaatcgcta gtattccaac agaaagatac
1021 tttttcaatg tgtctgatga agcagctcta ctagaaaagg ctgggacatt aggagaacaa
1081 attttcagca ttgaaggtac tgttcaagga ggagacaact ttcagatgga aatgtcacaa
1141 gtgggattca gtgcagatta ctcttctcaa aatgatattc tgatgctggg tgcagtggga
1201 gcttttggct ggagtgggac cattgtccag aagacatctc atggccattt gatctttcct
1261 aaacaagcct ttgaccaaat tctgcaggac agaaatcaca gttcatattt aggttactct
1321 gtggctgcaa tttctactgg agaaagcact cactttgttg ctggtgctcc tcgggcaaat
1381 tataccggcc agatagtgct atatagtgtg aatgagaatg gcaatatcac ggttattcag
1441 gctcaccgag gtgaccagat tggctcctat tttggtagtg tgctgtgttc agttgatgtg
1501 gataaagaca ccattacaga cgtgctcttg gtaggtgcac caatgtacat gagtgaccta
1561 aagaaagagg aaggaagagt ctacctgttt actatcaaag agggcatttt gggtcagcac
1621 caatttcttg aaggccccga gggcattgaa aacactcgat ttggttcagc aattgcagct
1681 ctttcagaca tcaacatgga tggctttaat gatgtgattg ttggttcacc actagaaaat
```

1741 cagaattctg gagctgtata catttacaat ggtcatcagg gcactatccg cacaaagtat

1801 tcccagaaaa tcttgggatc cgatggagcc tttaggagcc atctccagta ctttgggagg

1861 tccttggatg gctatggaga tttaaatggg gattccatca ccgatgtgtc tattggtgcc

1921 tttggacaag tggttcaact ctggtcacaa agtattgctg atgtagctat agaagcttca

1981 ttcacaccag aaaaaatcac tttggtcaac aagaatgctc agataattct caaactctgc

2041 ttcagtgcaa agttcagacc tactaagcaa aacaatcaag tggccattgt atataacatc

2101 acacttgatg cagatggatt ttcatccaga gtaacctcca gggggttatt taaagaaaac

2161 aatgaaaggt gcctgcagaa gaatatggta gtaaatcaag cacagagttg ccccgagcac

2221 atcatttata tacaggagcc ctctgatgtt gtcaactctt tggatttgcg tgtggacatc

2281 agtctggaaa accctggcac tagccctgcc cttgaagcct attctgagac tgccaaggtc

2341 ttcagtattc ctttccacaa agactgtggt gaggacggac tttgcatttc tgatctagtc

2401 ctagatgtcc gacaaatacc agctgctcaa gaacaaccct ttattgtcag caaccaaaac

2461 aaaaggttaa cattttcagt aacgctgaaa aataaaaggg aaagtgcata caacactgga

2521 attgttgttg atttttcaga aaacttgttt tttgcatcat tctccctgcc ggttgatggg

2581 acagaagtaa catgccaggt ggctgcatct cagaagtctg ttgcctgcga tgtaggctac

2641 cctgctttaa agagagaaca acaggtgact tttactatta actttgactt caatcttcaa

2701 aaccttcaga atcaggcgtc tctcagtttc caagccttaa gtgaaagcca agaagaaaac

2761 aaggctgata atttggtcaa cctcaaaatt cctctcctgt atgatgctga aattcactta

2821 acaagatcta ccaacataaa tttttatgaa atctcttcgg atgggaatgt tccttcaatc

2881 gtgcacagtt ttgaagatgt tggtccaaaa ttcatcttct ccctgaaggt aacaacagga

2941 agtgttccag taagcatggc aactgtaatc atccacatcc ctcagtatac caaagaaaag

3001 aacccactga tgtacctaac tggggtgcaa acagacaagg ctggtgacat cagttgtaat

3061 gcagatatca atccactgaa aataggacaa acatcttctt ctgtatcttt caaaagtgaa

3121 aatttcaggc acaccaaaga attgaactgc agaactgctt cctgtagtaa tgttacctgc

3181 tggttgaaag acgttcacat gaaaggagaa tactttgtta atgtgactac cagaatttgg

3241 aacgggactt tcgcatcatc aacgttccag acagtacagc taacggcagc tgcagaaatc

3301 aacacctata accctgagat atatgtgatt gaagataaca ctgttacgat tcccctgatg

3361 ataatgaaac ctgatgagaa agccgaagta ccaacaggag ttataatagg aagtataatt

3421 gctggaatcc ttttgctgtt agctctggtt gcaattttat ggaagctcgg cttcttcaaa

```
3481 agaaaatatg aaaagatgac caaaaatcca gatgagattg atgagaccac agagctcagt
3541 agctga
```

(SEQ ID NO: 21)

β1 integrin isoform 1A precursor (hs) according to NCBI accession No. NP_002202.2:

```
   1 mnlqpifwig lissvccvfa qtdenrclka nakscgeciq agpncgwctn stflqegmpt
  61 sarcddleal kkkgcppddi enprgskdik knknvtnrsk gtaeklkped itqiqpqqlv
 121 lrlrsgepqt ftlkfkraed ypidlyylmd lsysmkddle nvkslgtdlm nemrritsdf
 181 rigfgsfvek tvmpyisttp aklrnpctse qnctspfsyk nvlsltnkge vfnelvgkqr
 241 isgnldspeg gfdaimqvav cgsligwrnv trllvfstda gfhfagdgkl ggivlpndgq
 301 chlennmytm shyydypsia hlvqklsenn iqtifavtee fqpvykelkn lipksavgtl
 361 sanssnviql iidaynslss evilengkls egvtisyksy ckngvngtge ngrkcsnisi
 421 gdevqfeisi tsnkcpkkds dsfkirplgf teevevilqy icececqseg ipespkcheg
 481 ngtfecgacr cnegrvgrhc ecstdevnse dmdaycrken sseicsnnge cvcgqcvcrk
 541 rdntneiysg kfcecdnfnc drsnglicgg ngvckcrvce cnpnytgsac dcsldtstce
 601 asngqicngr gicecgvckc tdpkfqgqtc emcqtclgvc aehkecvqcr afnkgekkdt
 661 ctqecsyfni tkvesrdklp qpvqpdpvsh ckekdvddcw fyftysvngn nevmvhvven
 721 pecptgpdii pivagvvagi vliglallli wkllmiihdr refakfekek mnakwdtgen
 781 piyksavttv vnpkyegk
```

(SEQ ID NO:22)

β1 integrin coding sequence (hs) isoform 1A according to NCBI accession No. NM_002211.3:

```
   1 atcagacgcg cagaggaggc ggggccgcgg ctggtttcct gccggggggc ggctctgggc
  61 cgccgagtcc cctcctcccg cccctgagga ggaggagccg ccgccacccg ccgcgcccga
 121 cacccgggag gccccgccag cccgcgggag aggcccagcg ggagtcgcgg aacagcaggc
 181 ccgagcccac cgcgccgggc cccggacgcc gcgcggaaaa gatgaattta caaccaattt
 241 tctggattgg actgatcagt tcagtttgct gtgtgtttgc tcaaacagat gaaaatagat
```

301 gtttaaaagc aaatgccaaa tcatgtggag aatgtataca agcagggcca aattgtgggt

361 ggtgcacaaa ttcaacattt ttacaggaag gaatgcctac ttctgcacga tgtgatgatt

421 tagaagcctt aaaaaagaag ggttgccctc cagatgacat agaaaatccc agaggctcca

481 aagatataaa gaaaaataaa aatgtaacca accgtagcaa aggaacagca gagaagctca

541 agccagagga tattactcag atccaaccac agcagttggt tttgcgatta agatcagggg

601 agccacagac atttacatta aaattcaaga gagctgaaga ctatcccatt gacctctact

661 accttatgga cctgtcttac tcaatgaaag acgatttgga gaatgtaaaa agtcttggaa

721 cagatctgat gaatgaaatg aggaggatta cttcggactt cagaattgga tttggctcat

781 ttgtggaaaa gactgtgatg ccttacatta gcacaacacc agctaagctc aggaaccctt

841 gcacaagtga acagaactgc accagcccat ttagctacaa aaatgtgctc agtcttacta

901 ataaaggaga agtatttaat gaacttgttg gaaaacagcg catatctgga aatttggatt

961 ctccagaagg tggtttcgat gccatcatgc aagttgcagt ttgtggatca ctgattggct

1021 ggaggaatgt tacacggctg ctggtgtttt ccacagatgc cgggtttcac tttgctggag

1081 atgggaaact tggtggcatt gttttaccaa atgatggaca atgtcacctg gaaaataata

1141 tgtacacaat gagccattat tatgattatc cttctattgc tcaccttgtc cagaaactga

1201 gtgaaaataa tattcagaca atttttgcag ttactgaaga atttcagcct gtttacaagg

1261 agctgaaaaa cttgatccct aagtcagcag taggaacatt atctgcaaat tctagcaatg

1321 taattcagtt gatcattgat gcatacaatt ccctttcctc agaagtcatt ttggaaaacg

1381 gcaaattgtc agaaggcgta acaataagtt acaaatctta ctgcaagaac ggggtgaatg

1441 gaacagggga aaatggaaga aaatgttcca atatttccat tggagatgag gttcaatttg

1501 aaattagcat aacttcaaat aagtgtccaa aaaaggattc tgacagcttt aaaattaggc

1561 ctctgggctt tacggaggaa gtagaggtta ttcttcagta catctgtgaa tgtgaatgcc

1621 aaagcgaagg catccctgaa agtcccaagt gtcatgaagg aaatgggaca tttgagtgtg

1681 gcgcgtgcag gtgcaatgaa gggcgtgttg gtagacattg tgaatgcagc acagatgaag

1741 ttaacagtga agacatggat gcttactgca ggaaagaaaa cagttcagaa atctgcagta

1801 acaatggaga gtgcgtctgc ggacagtgtg tttgtaggaa gagggataat acaaatgaaa

1861 tttattctgg caaattctgc gagtgtgata atttcaactg tgatagatcc aatggcttaa

1921 tttgtggagg aaatggtgtt tgcaagtgtc gtgtgtgtga gtgcaacccc aactacactg

1981 gcagtgcatg tgactgttct ttggatacta gtacttgtga agccagcaac ggacagatct

2041 gcaatggccg gggcatctgc gagtgtggtg tctgtaagtg tacagatccg aagtttcaag

2101 ggcaaacgtg tgagatgtgt cagacctgcc ttggtgtctg tgctgagcat aaagaatgtg

2161 ttcagtgcag agccttcaat aaaggagaaa agaaagacac atgcacacag gaatgttcct

2221 attttaacat taccaaggta gaaagtcggg acaaattacc ccagccggtc caacctgatc

2281 ctgtgtccca ttgtaaggag aaggatgttg acgactgttg gttctatttt acgtattcag

2341 tgaatgggaa caacgaggtc atggttcatg ttgtggagaa tccagagtgt cccactggtc

2401 cagacatcat tccaattgta gctggtgtgg ttgctggaat tgttcttatt ggccttgcat

2461 tactgctgat atggaagctt ttaatgataa ttcatgacag aagggagttt gctaaatttg

2521 aaaaggagaa aatgaatgcc aaatgggaca cgggtgaaaa tcctatttat aagagtgccg

2581 taacaactgt ggtcaatccg aagtatgagg gaaaatgagt actgcccgtg caaatcccac

2641 aacactgaat gcaaagtagc aatttccata gtcacagtta ggtagcttta gggcaatatt

2701 gccatggttt tactcatgtg caggttttga aaatgtacaa tatgtataat ttttaaaatg

2761 ttttattatt ttgaaaataa tgttgtaatt catgccaggg actgacaaaa gacttgagac

2821 aggatggtta ctcttgtcag ctaaggtcac attgtgcctt tttgaccttt tcttcctgga

2881 ctattgaaat caagcttatt ggattaagtg atatttctat agcgattgaa agggcaatag

2941 ttaaagtaat gagcatgatg agagtttctg ttaatcatgt attaaaactg atttttagct

3001 ttacaaatat gtcagtttgc agttatgcag aatccaaagt aaatgtcctg ctagctagtt

3061 aaggattgtt ttaaatctgt tattttgcta tttgcctgtt agacatgact gatgacatat

3121 ctgaaagaca agtatgttga gagttgctgg tgtaaaatac gtttgaaata gttgatctac

3181 aaaggccatg ggaaaaattc agagagttag gaaggaaaaa ccaatagctt taaaacctgt

3241 gtgccatttt aagagttact taatgtttgg taacttttat gccttcactt tacaaattca

3301 agccttagat aaaagaaccg agcaattttc tgctaaaaag tccttgattt agcactattt

3361 acatacaggc catactttac aaagtatttg ctgaatgggg acctttgag ttgaatttat

3421 tttattattt ttattttgtt taatgtctgg tgctttctgt cacctcttct aatcttttaa

3481 tgtatttgtt tgcaattttg gggtaagact ttttttatga gtacttttc tttgaagttt

3541 tagcggtcaa tttgcctttt taatgaacat gtgaagttat actgtggcta tgcaacagct

3601 ctcacctacg cgagtcttac tttgagttag tgccataaca gaccactgta tgtttacttc

3661 tcaccatttg agttgcccat cttgtttcac actagtcaca ttcttgtttt aagtgccttt

3721 agttttaaca gttcactttt tacagtgcta tttactgaag ttatttatta aatatgccta

3781 aaatacttaa atcggatgtc ttgactctga tgtattttat caggttgtgt gcatgaaatt

3841 tttatagatt aaagaagttg aggaaaagca aaaaaaaaa

(SEQ ID NO:23)

Fig.10

Fig. 10a: cDNA encoding LC of anti-α2 integrin mAB

atggagacagacacactcctgctatgggtgctgctgctctgggttccaggttccacaggtaacattgtgctgaccca
atctccagcttctttggctgtgtctctagggcagagggccaccatatcctgcagagccagtgaaagtgttgagagtt
atggcaacagttttatttactggtaccagcagaaaccaggacaggcacccaaactcctcatctatcttgcatccaac
ctagcatctggggtccctgccaggttcagtggcagtgggtctaggacagacttcaccctcaccattgatcctgtgga
ggctgatgatgctgcaacctattactgtcagcaaaataatgaggatccgtacacgttcggaggggggaccaagctgg
aaataaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtgagcagttaacatctggaggtgcc
tcagtcgtgtgcttcttgaacaacttctaccccaaagacatcaatgtcaagtggaagattgatggcagtgaacgaca
aaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcacgttga
ccaaggacgagtatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcacccattgtcaag
agcttcaacaggaatgagtgctag

(SEQ ID NO:45)

Fig. 10b: cDNA encoding HC anti-α2 integrin mAB

atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagccacaggtgtccactcccaggtccaactgcatcagcc
tggggctgaacttgtgaagcctggggctccagtgaagctgtcctgcaaggcttctggctacaccttcaccagctact
ggatgaactgggtgaagcagaggcctggacgaggcctcgagtggattggcaggattgatccttccgatagtgaaact
cactacaatcaaaagttcaaggacaaggccacactgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatccaactcag
cagcctgacatctgaggactctgcggtctattactgtgcaaaggtgggacgggggtactttgactactggggccaag
gcaccactctcacagtctcctcagctaaaacaacagccccatcggtctatccactggcccctgtgtgtggagataca
actggctcctcggtgactctaggatgcctggtcaagggttatttccctgagccagtgaccttgacctggaactctgg
atccctgtccagtggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagtctgacctctacaccctcagcagctcagtgactg
taacctcgagcacctggcccagccagtccatcacctgcaatgtggcccacccggcaagcagcaccaaggtggacaag
aaaattgagcccagagggcccacaatcaagccctgtcctccatgcaaatgcccagcacctaacctcttgggtggacc
atccgtcttcatcttccctccaaagatcaaggatgtactcatgatctccctgagccccatagtcacatgtgtggtgg
tggatgtgagcgaggatgacccagatgtccagatcagctggtttgtgaacaacgtggaagtacacacagctcagaca
caaacccatagagaggattacaacagtactctccgggtggtcagtgccctccccatccagcaccaggactggatgag
tggcaaggagttcaaatgcaaggtcaacaacaaagacctcccagcgcccatcgagagaaccatctcaaaacccaaag
ggtcagtaagagctccacaggtatatgtcttgcctccaccagaagaagagatgactaagaaacaggtcactctgacc
tgcatggtcacagacttcatgcctgaagacatttacgtggagtggaccaacaacgggaaaacagagctaaactacaa
gaacactgaaccagtcctggactctgatggttcttacttcatgtacagcaagctgagagtggaaaagaagaactggg
tggaaagaaatagctactcctgttcagtggtccacgagggtctgcacaatcaccacacgactaagagcttctcccgg
actcccgggaagtga

(SEQ ID NO:46)

Fig. 10c: Amino acid sequence of secreted LC of anti-α2 integrin mAB

nivltqspaslavslgqratiscrasesvesygnsfiywyqqkpgqapkllliylasnlasgvparfsgsgsrtdftl
tidpveaddaatyycqqnnedpytfgggtkleikradaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfypkdinvkwki
dgserqngvlnswtdqdskdstysmsstltltkdeyerhnsytceathktstspivksfnrnec

(SEQ ID NO:47)

Fig. 10d: Amino acid sequence of secreted HC of anti-α2 integrin mAB

qvqlhqpgaelvkpgapvklsckasgytftsywmnwvkqrpgrglewigridpsdsethynqkfkdkatltvdksss
tayiqlssltsedsavyycakvgrgyfdywgqgttltvssakttapsvyplapvcgdttgssvtlgclvkgyfpepv
tltwnsgslssgvhtfpavlqsdlytlsssvtvtsstwpsqsitcnvahpasstkvdkkieprgptikpcppckcpa
pnllggpsvfifppkikdvlmislspivtcvvvdvseddpdvqiswfvnnvevhtaqtqthredynstlrvvsalpi
qhqdwmsgkefkckvnnkdlpapiertiskpkgsvrapqvyvlpppeeemtkkqvtltcmvtdfmpediyvewtnng
ktelnykntepvldsdgsyfmysklrvekknwvernsyscsvvheglhnhhttksfsrtpgk

(SEQ ID NO:48)

Fig. 10e: Amino acid sequence of comparator antibody

Amino acid sequence of LC of comparator

DFVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCSAQSSVNYIHWYQQKPDQAPKKLIYDTSKLASGVPSR
FSGSGSGTDYTFTISSLEAEDAATYYCQQWTTNPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO.53)

Fig. 10f: Amino acid sequence of HC of comparator

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGIHWIRQPPGKGLEWLGVIWARGFTN
YNSALMSRLTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARANDGVYYAMDYWGQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE
FEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

(SEQ ID NO:54)

Fig.11

Fig. 11: Equilibrium dissociation constants K_D for the humanized variants and the comparator as determined by Biacore

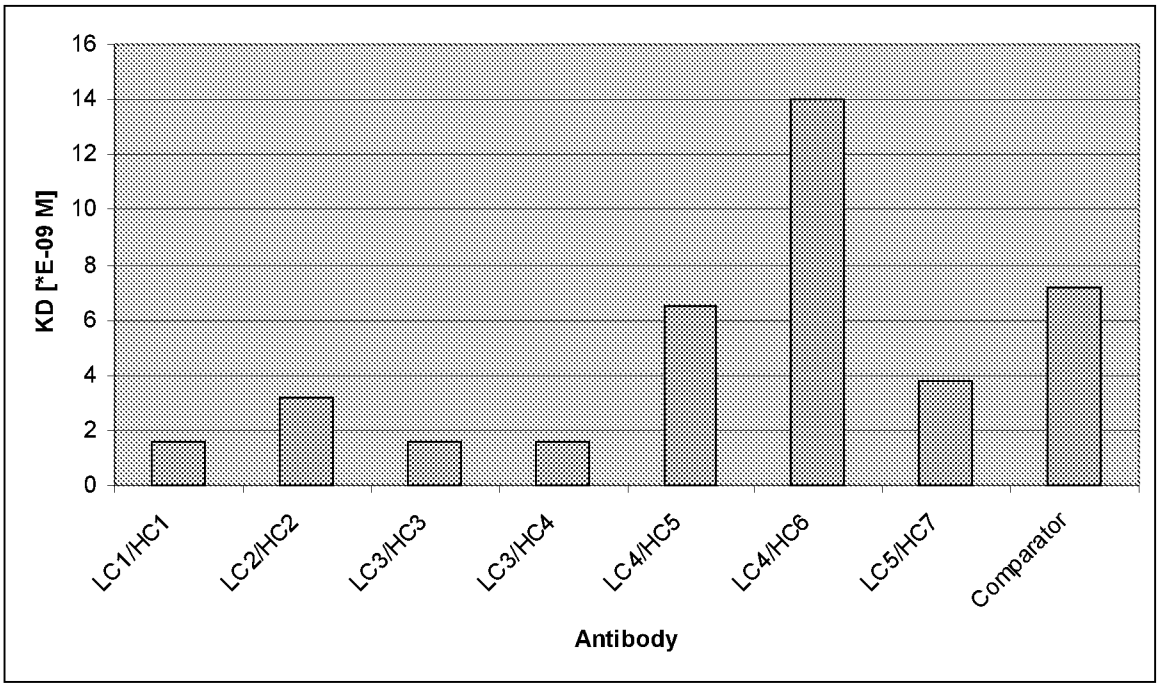


Fig.12

Fig. 12: Binding of comparator mAb TMC2206 to integrin α_2 I domain pre-bound by non-humanized Fab measured using Biacore

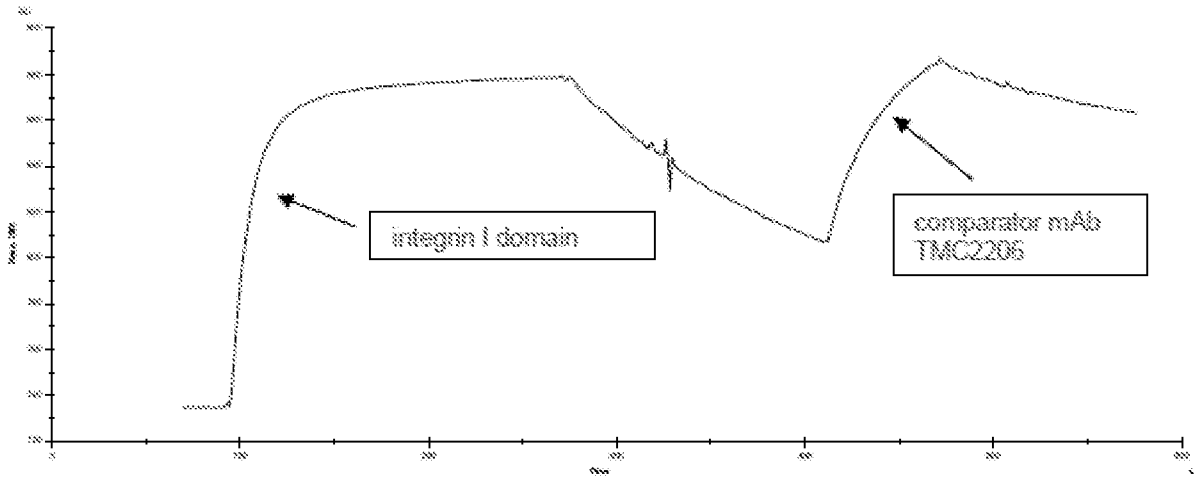


Fig.13

Fig. 13: Binding of non-humanized Fab to integrin α_2 I domain pre-bound by comparator mAb TMC2206

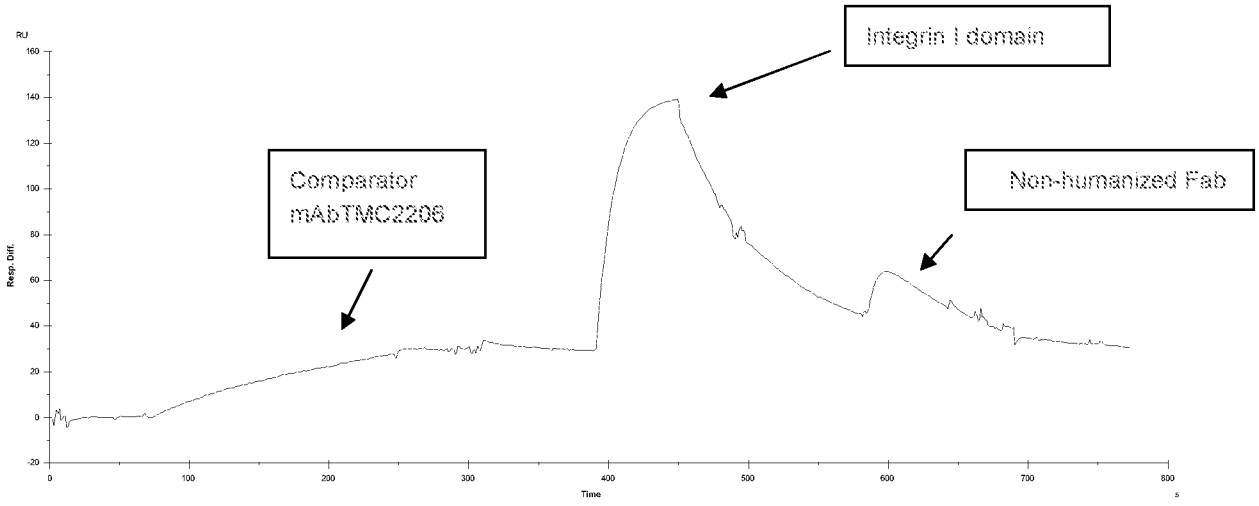
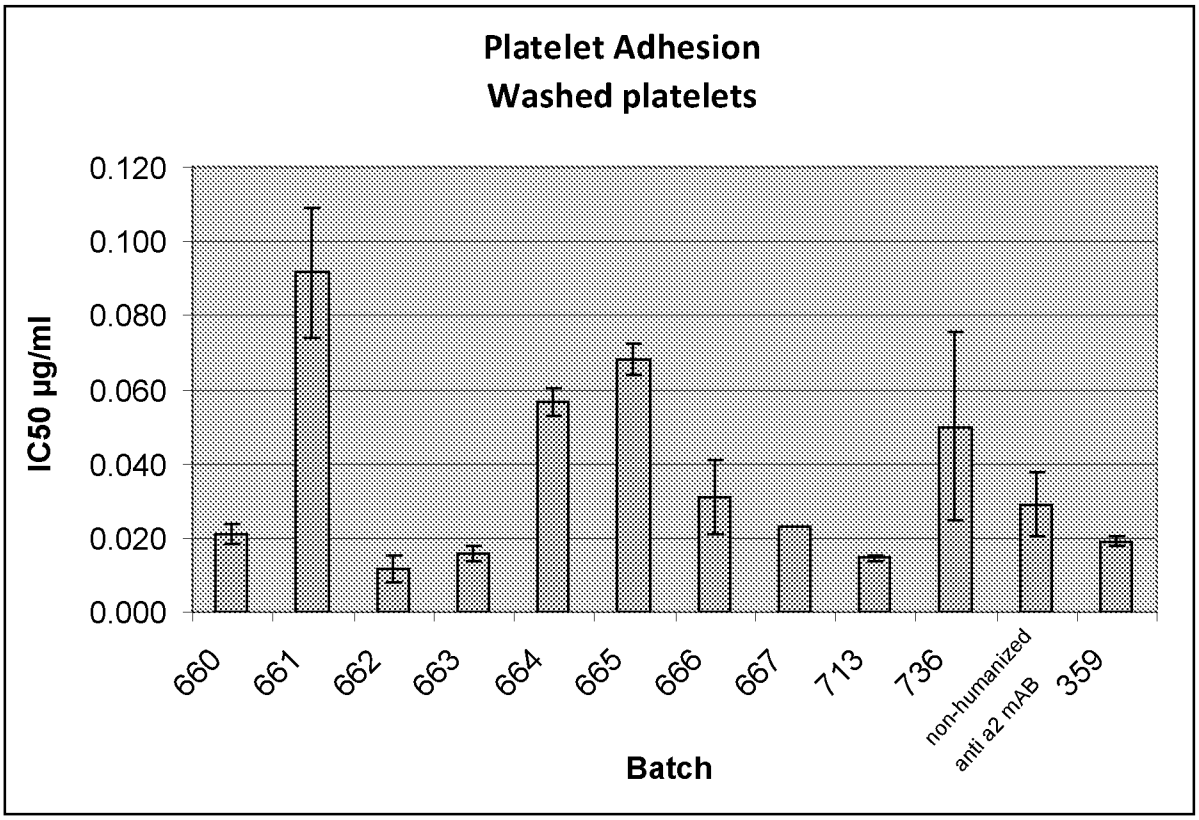


Fig.14

Figure 14: Inhibiton of platelet adhesion to collagen under static conditions using washed platelets



PÉPTIDO O COMPLEJO PEPTÍDICO QUE SE UNE A INTEGRINA α2 Y MÉTODOS Y USOS QUE IMPLICAN A LOS MISMOS

La presente invención está relacionada con un péptido o complejo peptídico que se une a integrina α2 para su uso en el tratamiento, profilaxis o diagnóstico, a uno o más ácidos nucleicos que codifican el péptido o complejo peptídico, una célula recombinante que produce el péptido o complejo peptídico, un método para producir el péptido o complejo peptídico, una composición farmacéutica que comprende el péptido o complejo peptídico o el ácido nucleico o los ácidos nucleicos para su uso como un medicamento, un método para detectar integrina α2 y un método de exploración.

Antecedentes de la invención

Las integrinas son proteínas transmembrana que median interacciones entre moléculas de adhesión en células adyacentes y/o la matriz extracelular (ECM). Las integrinas desempeñan diversos papeles en varios procesos biológicos incluyendo migración celular durante el desarrollo y curación de heridas, diferenciación celular y apoptosis. Sus actividades también pueden regular el potencial metastásico e invasivo de células tumorales. Existen como heterodímeros que consisten en subunidades α y β. Algunas subunidades α y β muestran especificidad entre sí y pueden designarse como un miembro de VLA (antígeno muy tardío). Los heterodímeros se unen preferentemente a ciertas moléculas de adhesión celular o constituyentes de la ECM. Aunque no tienen actividad catalítica, las integrinas pueden ser parte de complejos de señalización multimolecular conocidos como adhesiones focales.

Tras unirse a los ligandos, las integrinas transducen señales intracelulares al citoesqueleto que modifican la actividad celular en respuesta a estos acontecimientos de adhesión celular, denominadas señalización de fuera a dentro. Dicha señalización también puede activar otros subtipos de integrina expresados en la misma célula, denominada señalización de dentro a fuera. La señalización de dentro a fuera se produce además mediante señales reguladoras que se originan dentro del citoplasma celular tales como una interrupción de la unión entre una subunidad α y β, que se transmite después al dominio de unión a ligando externo del receptor. Las integrinas pueden desempeñar papeles importantes en los

acontecimientos de adhesión celular que controlan el desarrollo, morfogénesis de órganos, fisiología y patología así como homeostasis tisular normal y respuestas inmunes y trombóticas y además actúan como sensores ambientales para la célula. Uno de los heterodímeros de integrina es integrina $\alpha 2\beta 1$. La integrina $\alpha 2\beta 1$ se expresa en varios tipos celulares diferentes, incluyendo células endoteliales y epiteliales, fibroblastos, linfocitos y plaquetas. La especificidad de ligando de $\alpha 2\beta 1$ varía con el tipo celular. Aunque actúa como un receptor de colágeno en plaquetas y fibroblastos, puede actuar como un receptor tanto de laminina como de colágeno en células endoteliales y epiteliales.

La integrina $\alpha 2\beta 1$ es una molécula compuesta de una subunidad de integrina $\alpha 2$ de la familia de las integrinas α y una subunidad de integrina $\beta 1$ de la familia de la integrinas β. Las secuencias de integrina $\alpha 2$ y $\beta 1$ se conocen en la técnica y están publicadas, por ejemplo, en Takada y Hemler J. Cell. 109 (1): 397-407, 1989 y Argraves, W.S, J. Cell. Biol. Sep. 105 (3): 1183-90 (1987). Se indican secuencias de ejemplo en la Figura 9, y secuencias adicionales pueden obtenerse de la base de datos del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI), por ejemplo con los números de acceso de NCBI NP_002194 NM_002203, NM_002211, NP_002202 (isoforma de integrina $\beta 1$ 1A) para integrina $\alpha 2$ y $\beta 1$ de homo sapiens, véase también posteriormente.

Se conocen en la técnica variantes de corte y empalme alternativo, isoformas, así como secuencias de origen no humano (tal como roedor (ratón, rata, etc.), simio u otros) y representan posibles realizaciones alternativas siempre que muestren al menos una de las funciones conocidas de la integrina $\alpha 2$ o $\beta 1$.

La subunidad $\alpha 2$ es un miembro de un subconjunto de subunidades de integrina α que contienen un dominio de aproximadamente 200 aminoácidos localizado cerca del extremo amino terminal denominado con frecuencia el dominio I (o insertado). Muchos dominios I, incluyendo el dominio I de la subunidad de integrina y $\alpha 2$ contienen un sitio de unión a cationes adicional, el motivo de sitio de adhesión dependiente de iones metálicos (MIDAS). La caracterización estructural del dominio I de integrina $\alpha 2$ está publicado, por ejemplo, en Dickeson *et al.,* J. Biol. Chemistry, 272, 7661-7668 (1997). Los dominios I son determinantes importantes en la unión del ligando. La secuencia de aminoácidos de un dominio I de integrina $\alpha 2$ humana puede obtenerse de la Figura 9 a, como está marcado en la secuencia

de integrina α2 (SEC ID 20).

La integrina $\alpha 2\beta 1$ (antígeno muy tardío 2; VLA-2) se expresa en una diversidad de tipos celulares incluyendo plaquetas, células endoteliales vasculares, células epiteliales, monocitos/macrófagos activados, fibroblastos, leucocitos, linfocitos, neutrófilos activados y mastocitos. Los ligandos naturales para $\alpha 2\beta 1$ incluyen colágeno y laminina, ambos de los cuales se encuentran en la matriz extracelular. La integrina $\alpha 2\beta 1$ se ha implicado en varios procesos biológicos y patológicos incluyendo agregación plaquetaria inducida por colágeno, migración celular en colágeno, reorganización dependiente de célula de fibras de colágeno así como respuestas celulares dependientes de colágeno que dan como resultado aumentos de la expresión y proliferación de citocinas, aspectos de la función de neutrófilos, mastocitos y linfocitos T, aspectos de hipersensibilidad de tipo retardado, hipersensibilidad de contacto y artritis inducida por colágeno, morfogénesis ductal de glándula mamaria, curación de heridas epidérmica y procesos asociados con angiogénesis inducida por VEGF.

Las plaquetas circulan habitualmente en la sangre en un estado de reposo inactivo, sin embargo, se estimulan para responder rápidamente en sitios de lesión a una amplia diversidad de agonistas. Tras la estimulación, experimentan cambios de forma y se vuelven altamente reactivas con proteínas de plasma, tales como fibrinógeno y factor de von Willebrand (vWf), otras plaquetas y el revestimiento endotelial de la pared vascular. Estas interacciones cooperan todas para facilitar la formación rápida de un tapón plaquetario de fibrina hemostático (Cramer, 2002 en Hemostasis and Thrombosis, 4ª edición). Tras unirse a ligando, los receptores de plaquetas transducen rutas de señalización de fuera a dentro que, a su vez, desencadenan señalización de dentro a fuera que da como resultado la activación de receptores secundarios tales como el receptor de fibrinógeno plaquetario, integrina αIIbβ3, que conduce a agregación plaquetaria. Incluso la activación menor de plaquetas puede dar como resultado respuestas trombóticas plaquetarias, trombocitopenia y complicaciones de hemorragia.

La integrina α2 es la única integrina de unión a colágeno expresada en plaquetas y se ha implicado que desempeña algún papel en la adhesión de plaquetas a colágeno y hemostasis (Santoro *et al.*, Thromb Haemost 74: 813-821 (1995); Vanhoorelbeke *et al*., Curr Drug Targets Cardiovasc. Haematol Disord 3(2): 125-40 (2003); Sarratt *et al.,* Blood 106 (4): 1268-1277 (2005)). Por lo tanto, la

inactivación de la función de integrina alfa 2 sería deseable para interferir de forma negativa con la agregación plaquetaria. Una inhibición de este tipo sería, por ejemplo, una inhibición alostérica que bloquee la integrina en el estado inactivo.

Las interacciones integrina/ligando pueden facilitar las extravasaciones de leucocitos en tejidos inflamados (Jackson *et al.,* J. Med Chem 40: 3359-3368 (1997); Gadek *et al.,* Science 295 (5557): 1086-9 (2002), Sircar *et al*. Bioorg. Med. Chem. 10: 2051-2066 (2002)), y desempeñan un papel en acontecimientos corriente abajo después de las extravasaciones iniciales de leucocitos de la circulación a tejidos en respuesta a estímulos inflamatorios, incluyendo migración, reclutamiento y activación de células proinflamatorias en el sitio de inflamación (Eble J. A., Curr Pharm Des. 11(7): 867-880 (2005)).

Se indicó que el bloqueo de integrina α2 muestra impacto en respuestas de hipersensibilidad retardada y eficacia en un modelo murino de artritis reumatoide y un modelo de enfermedad inflamatoria del intestino (Kriegelstein *et al.,* J. Clin Invest. 110 (12): 1773-82 (2002); de Fougerolles *et al.,* J. Clin Invest. 105:721-720 (2000)) y se indicó que atenuaban la proliferación y migración de células endoteliales *in vitro* (Senger *et al.,* Am J Pathol 160(1): 195-204 (2002)), lo que sugiere que el bloqueo de integrina α2 podría prevenir/inhibir la angiogénesis anómala o mayor de lo normal, como se observa en diversos cánceres. Además, en un modelo de cirugía de cáncer colorrectal de rata se mostró que la inhibición de la integrina α2 era un antimetastásico eficaz (van der Bji *et al.,* Hepatology 47 (2): 532-543 (2008)). El compromiso de linaje de células de cáncer colorrectal también podría alejarse del fenotipo maligno (Kirkland *et al.* J Biol Chem 283 (41): 27612-27619 (2008)). Se mostró que la integrina α2 mediaba el fenotipo maligno en cáncer pancreático (Grzesiak y Bouvet, Br J Cancer 94: 1311-1319 (2006) validando esta diana para un enfoque terapéutico en este tipo de cáncer agresivo. Además, la integrina $\alpha 2\beta 1$ está interaccionando con glucoesfingolípidos en la progresión de cáncer prostático lo que sugiere que el bloqueo de esta interacción sería de uso terapéutico para este tipo de cáncer (van Slambrouck *et al.,* Int J Onco 35: 693-699 (2009)). En encefalitis autoinmune experimental (EAE), un modelo murino de esclerosis múltiple (MS), la integrina α2 parece desempeñar un papel importante puesto que el tratamiento con un anticuerpo anti-α2, proporcionado inmediatamente después de la aparición de la enfermedad, suprimió señales clínicas e inflamación del SNC (Tsunoda *et al.* Brain Pathol 17: 45-55 (2007)). El

mecanismo de esta acción terapéuticamente beneficiosa del anticuerpo anti-α2 se debe más probablemente a la inhibición de la interacción de integrina α2β1 con la proteína de complemento C1q. Esta interacción es una primera etapa en desgranulación de mastocitos y activación de mastocitos, que está implicada en enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como MS, lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis (McCall-Culbreath *et al.* Blood 111 (3562-3570) 2008).

Por lo tanto, la integrina α2 es una diana médica interesante. Puesto que las integrinas son dianas difíciles para el desarrollo de inhibidores específicos, y a la vista de los muchos indicios terapéuticos posibles diferentes, existe una necesidad de inhibidores alternativos que se unan a integrina α2, especialmente inhibidores de integrina alfa 2 que muestren propiedades algo diferentes en comparación con inhibidores de integrina α2 existentes, que pueden usarse en el tratamiento de trastornos asociados con integrina α2.

De forma bastante sorprendente, los inventores de la presente invención fueron capaces de identificar un inhibidor tal de integrina alfa 2. Para este fin, se ha generado un anticuerpo monoclonal contra integrina α2 y se ha ensayado con respecto a sus características. Proporciona las características ventajosas como se describe en los ejemplos. Particularmente, el anticuerpo anti-integrina α2 y fragmentos monovalentes o derivados del mismo se han caracterizado por un conjunto de datos experimentales que incluyen constantes de unión, reactividad cruzada, mapeo de dominio y datos funcionales *in vitro.*

Se ha descubierto que el anticuerpo monoclonal (mAb) se une al dominio I de integrina α2 con afinidades nM, produciéndose la unión obviamente en un epítopo dentro del dominio I que es diferente del epítopo unido por un anticuerpo comparador del estado de la técnica que también se dirige al dominio I de integrina alfa 2. Todas las moléculas obtenidas por ingeniería genética del anticuerpo de acuerdo con la presente invención (mAb IgG4, Fab) muestran tasas de asociación y disociación comparables en experimentos de Biacore. Presentan reactividad cruzada con integrina α2β1 de primate, mientras que no se ha detectado reactividad cruzada contra integrina α2β1 de ratón, rata, perro, cobaya, cerdo o conejo según se ensayó con plaquetas de las especies relevantes.

Las moléculas ensayadas inhiben la interacción de integrina α2 recombinante con colágeno *in vitro* con valores de CI_{50} nM bajos. Además de la

inhibición del colágeno, el mAb anti-integrina $\alpha 2\beta 1$ o fragmentos Fab son capaces de inhibir la adhesión de plaquetas a colágeno tanto en plaquetas humanas aisladas como en plasma rico en plaquetas humanas en condiciones estáticas. También son capaces de inhibir la formación de trombos en flujo en una superficie recubierta de colágeno. La capacidad de bloquear la unión del colágeno y prevenir de este modo la adhesión de plaquetas a colágeno es una de las etapas más tempranas en la formación de trombos.

Finalmente, el mAb o Fab no provocaron activación de plaquetas puesto que no se observó aumento en la activación de GPIIbIIIa o expresión en superficie de selectina P en aproximadamente 30 donantes para el mAb. En consecuencia, la presente invención proporciona anticuerpos monovalentes, fragmentos de anticuerpo o derivados y sus usos para preparar agentes de investigación, diagnóstico y terapéuticos para el tratamiento de trastornos relacionados con integrina $\alpha 2$ como se enumera posteriormente; los ejemplos específicos incluyen trombosis, otras enfermedades vasculares, cáncer y consecuencias patológicas de neo-angiogénesis, enfermedades auto-inflamatorias tales como esclerosis múltiple.

Como se conoce por el experto en la materia, las características de unión de anticuerpos están mediadas por los dominios variables. Para unión a un antígeno, un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable que actúa conjuntamente de la cadena ligera están habitualmente presentes en anticuerpos y se disponen en orden para permitir la acción conjunta. El dominio variable también se denomina la región FV. Más específicamente, bucles variables, tres en cada uno de la cadena ligera (VL) y pesada (VH), son responsables de unión al antígeno. Estos bucles se denominan las regiones determinantes de complementariedad (CDR), LCDR1, LCDR2 y LCDR3 para la VL y HCDR1, HCDR2 y HCDR3 para VH. Se conoce en la técnica una diversidad de disposiciones diferentes de dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de acción conjunta de la cadena ligera. Por lo tanto, fue importante identificar uno o más dominios variables adecuados de la cadena pesada y uno o más dominios variables de acción conjunta de la cadena ligera. Por alineamiento de secuencia, las CDR de las cadenas pesadas y ligeras se han identificado para el anticuerpo de integrina $\alpha 2$ especificado anteriormente.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y otras moléculas de unión a integrina α2 para su uso en tratamiento, profilaxis o diagnóstico, a uno o más ácidos nucleicos que codifican la molécula de unión, una célula recombinante que produce la molécula de unión, un método para la producción de la molécula de unión, a una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión o el ácido o ácidos nucleicos para su uso como un medicamento, a un método para la detección de integrina α2 y a un método de cribado.

Para este fin, se ha generado un anticuerpo monoclonal frente a la integrina α2 y se han ensayado sus características. Este proporciona las características ventajosas que se describen en los ejemplos. En particular, el anticuerpo anti-integrina α2 y los fragmentos monovalentes o derivados del mismo se caracterizan por un conjunto de datos experimentales que incluyen constantes de unión, reactividad cruzada, mapa de dominio y datos funcionales *in vitro*.

Se ha descubierto que el anticuerpo monoclonal (mAb) se une al dominio I de la integrina α2 con una afinidad de orden nM, en el que la unión se produce obviamente en un epítopo dentro del dominio I que es diferente al epítopo al que se une un anticuerpo de comparación del estado de la técnica que también se dirige al dominio I de la integrina alfa 2. Todas las moléculas modificadas por ingeniería del anticuerpo de acuerdo con la presente invención (mAb IgG4, Fab) muestran velocidades de asociación y de disociación comparables en experimentos de Biacore. Muestran reactividad cruzada con la integrina α2β1 de primate, mientras que no se ha detectado reactividad cruzada frente a la integrina α2β1 de ratón, rata, perro, cobaya, cerdo o conejo, según se ha ensayado con plaquetas de las especies pertinentes.

Las moléculas ensayadas inhiben la interacción de la integrina α2 recombinante con el colágeno *in vitro* con valores de CI_{50} de orden nM bajo. Además de la inhibición del colágeno, el mAB o los fragmentos Fab anti-integrina α2β1 son capaces de inhibir la adhesión de plaquetas al colágeno tanto en plaquetas humanas aisladas como en plasma humano rico en plaquetas en condiciones estáticas. También son capaces de inhibir la formación de trombos bajo flujo en una superficie revestida de colágeno. La capacidad de bloquear la unión al colágeno y por lo tanto prevenir la adhesión de plaquetas al colágeno es una de las primeras etapas en la formación de trombos.

Finalmente, el mAb o los fragmentos Fab no causaron la activación de las plaquetas ya que no se observó aumento en la activación de GPIIbIIIa o en la expresión superficial de selectina P en ~30 donantes para el mAb. Por lo tanto, la presente invención proporciona anticuerpos monovalentes, fragmentos o derivados del anticuerpo y sus usos para manufacturar agentes terapéuticos, de investigación, y de diagnóstico para el tratamiento de los trastornos relacionados con la integrina α2 que se enumeran posteriormente; los ejemplos específicos incluyen trombosis, otras enfermedades vasculares, cáncer y consecuencias patológicas de neo-angiogénesis, y enfermedades autoinflamatorias tales como esclerosis múltiple.

Como conoce el experto en la materia, las características de unión de los anticuerpos están mediadas por los dominios variables. Para unirse a un antígeno, en los anticuerpos están habitualmente presentes un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable coactuante de la cadena ligera y se disponen para permitir la coactuación. El dominio variable también se denomina región FV. De forma más específica, los bucles variables, tres de cada uno de ellos en la cadena ligera (VL) y en la pesada (VH), son los responsables de la unión al antígeno. Estos bucles se denominan Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs), LCDR1, LCDR2 y LCDR3 para VL y HCDR1, HCDR2 y HCDR3 para VH. Se conocen en la técnica una diversidad de disposiciones diferentes del dominio variable de la cadena pesada y del dominio variable coactuante de la cadena ligera. Por lo tanto, fue importante identificar uno o más dominios variables adecuados de la cadena pesada y uno o más dominios variables coactuantes de la cadena ligera. Las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs) de las cadenas pesada y ligera para el anticuerpo frente a la integrina α2 especificado anteriormente se han identificado por alineamiento de secuencia.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un péptido o complejo peptídico, preferentemente un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho péptido o complejo peptídico, anticuerpo o fragmento se une específicamente al dominio I de la integrina α2 humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento un dominio de región variable de la cadena pesada (VH) y un dominio de región variable de la cadena ligera (VL), en el que dicho anticuerpo o fragmento presenta reactividad

cruzada con integrina α2 no humana de primate pero no presenta reactividad cruzada la integrina α2 que no sea de primate.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un péptido o complejo peptídico, preferentemente un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho péptido o complejo peptídico, anticuerpo o fragmento se une específicamente al dominio I de la integrina α2 humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento un dominio de región variable de la cadena pesada (VH) y un dominio de región variable de la cadena ligera (VL), en el que dicho anticuerpo o fragmento compite con un anticuerpo de referencia por la unión con el epítopo del anticuerpo de referencia, comprendiendo dicho anticuerpo de referencia una cadena ligera codificada por el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de adhesión DSM 23944 y la cadena pesada codificada por (i) el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de adhesión DSM 23946 o bien (ii) el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de adhesión DSM 23945.

En un tercer aspecto la presente invención se refiere a un péptido o complejo peptídico que comprende uno o más de los siguientes componentes a) a f):

(a) LCDR1, en el que LDR1 es RASESVESYGNSFIY (SEC ID Nº 6) o una variante funcionalmente activa de la misma,

(b) LCDR2, en el que LDR2 es LASNLAS (SEC ID Nº 7) o una variante funcionalmente activa de la misma,

(c) LCDR3, en el que LDR3 es QQNNEDPYT (SEC ID Nº 8) o una variante funcional activa de la misma,

(d) HCDR1, en el que HDR1 es (GYTFTSYWMN, SEC ID Nº 3) o una variante funcionalmente activa de la misma,

(e) HCDR2, en el que HDR2 es RIDPSDSETHYNQKFK (SEC ID Nº 4) o una variante funcionalmente activa de la misma, y

(f) HCDR3, en el que HDR3 es VGRGYFDY (SEC ID Nº 5) o una variante funcional activa de la misma,

y en el que el uno o más de los componentes a) a f) se disponen para permitir la unión del péptido o complejo peptídico a la integrina α2.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere al péptido o complejo peptídico anterior para su uso en el tratamiento, profilaxis o diagnóstico de una enfermedad o trastorno relacionado con la integrina α2.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a uno o más ácidos nucleicos que codifican el péptido o complejo peptídico de la presente invención.

En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a una célula que expresa de forma heteróloga uno de los ácidos nucleicos de la presente invención.

En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere a un método para la producción de un péptido o complejo peptídico de la presente invención que comprende el cultivo de la célula de acuerdo con la presente invención en condiciones que permitan la expresión del péptido o complejo peptídico y opcionalmente la recuperación del péptido o complejo peptídico de la célula anfitriona.

En un octavo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido o complejo peptídico de la presente invención y/o al menos un ácido nucleico de la presente invención para su uso como un medicamento.

En un noveno aspecto, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de una enfermedad asociada con integrina α2 alterada, comprendiendo el método:

a) poner en contacto una muestra que comprende integrina α2 con el péptido o complejo peptídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y

b) detectar la unión de la integrina α2 al péptido o complejo peptídico; y

c) comparar la unión de la etapa b) con una referencia,

en el que una unión de integrina α2 alterada en la muestra con respecto a la referencia es indicativa de la enfermedad.

En un décimo aspecto, la presente invención se refiere a un artículo de manufactura que comprende:

a) un material de envasado,

b) un péptido o complejo peptídico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

c) una etiqueta o un prospecto, estando contenido el prospecto dentro de dicho material de envasado, que indica que dicho péptido o complejo peptídico es eficaz

para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, especialmente para una enfermedad o trastorno relacionado con la integrina α2.

En un undécimo aspecto, la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno relacionado con la integrina α2 que comprende un péptido o complejo peptídico de la presente invención y un envasado adecuado, y posiblemente instrucciones adecuadas para el uso de dicho péptido o complejo peptídico en la detección de la integrina α2.

En un duodécimo aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad o trastorno relacionado con la integrina α2 que usa uno o más péptidos o complejos de péptidos de la presente invención y/o uno o más ácidos nucleicos de la presente invención o una de las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

En un decimotercer aspecto, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de una enfermedad asociada con integrina α2 alterada, comprendiendo el método:

a) poner en contacto una muestra tomada de un individuo con el péptido o complejo peptídico de la presente invención; y
b) detectar la unión de integrina α2 al péptido o complejo peptídico; y
c) comparar la unión de la etapa b) con la unión de integrina α2 al péptido o complejo peptídico en una o más muestras de referencia,

en el que una unión alterada en la muestra tomada con respecto a la unión detectada en las una o más muestras de referencia es indicativa de la enfermedad.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en las que dicho anticuerpo o fragmento se une específicamente al dominio I de la integrina α2 humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento un dominio de región variable de la cadena pesada (VH) y un dominio de región variable de la cadena ligera (VL), en las que dicho anticuerpo o fragmento presenta reactividad cruzada con integrina α2 no humana de primate pero no presenta reactividad cruzada con integrina α2 que no sea de primate.

En otras realizaciones, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en las que dicho anticuerpo o fragmento se une específicamente al dominio I de la integrina α2

humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento un dominio de región variable de la cadena pesada (VH) y un dominio de región variable de la cadena ligera (VL), en las que dicho anticuerpo o fragmento compite con un anticuerpo de referencia por la unión al epítopo del anticuerpo de referencia, comprendiendo dicho anticuerpo de referencia una cadena ligera codificada por el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de acceso DSM 23944 y una cadena pesada codificada por (i) el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de acceso DSM 23946 o bien (ii) el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de acceso DSM 23945.

En una realización, dicho anticuerpo o fragmento se une específicamente al dominio I de la integrina α2 humana con una afinidad de unión de orden nM. En otra realización, dicho anticuerpo o fragmento inhibe la interacción de la integrina α2 humana con el colágeno *in vitro*, inhibiendo de ese modo la activación de las plaquetas debida a la adhesión de dichas plaquetas a dicho colágeno.

En una realización, dicho dominio de región variable de la cadena pesada comprende la cadena pesada HCDR3 de SEC ID Nº 5. En otra realización, dicho dominio de región variable de la cadena pesada comprende las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs) de la cadena pesada de SEC ID Nº 3 (HCDR1), SEC ID Nº 4 (HCDR2), y SEC ID Nº 5 (HCDR3), o variantes funcionalmente activas de las mismas. En una realización, la variante funcionalmente activa de HCDR2 comprende la mutación Asp→Glu en el aminoácido en la posición 6.

En una realización, el dominio de región variable de la cadena ligera comprende la cadena ligera LCDR3 de SEC ID Nº 8. En otra realización, el dominio de región variable de la cadena ligera comprende las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs) de la cadena ligera de SEC ID Nº 6 (LCDR1), SEC ID Nº 7 (LCDR2), y SEC ID Nº 8 (LCDR3), o variantes funcionalmente activas de las mismas. En una realización, la variante funcionalmente activa de LCDR1 comprende la mutación Asn→Gln en el aminoácido en la posición 11.

En una realización, el dominio de región variable de la cadena pesada (VH) tiene al menos 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de VH de SEC ID Nº 2. En otra realización, dicho dominio de región variable de la cadena pesada (VH) comprende la secuencia de SEC ID Nº 2 o una variante funcionalmente activa de la misma.

En una realización, el dominio de región variable de la cadena ligera (VL) tiene al menos 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de VL de SEC ID Nº 1. En otra realización, dicho dominio de región variable de la cadena ligera (VL) comprende la secuencia de SEC ID Nº 1 o una variante funcionalmente activa de la misma.

En una realización, el dominio de región variable de la cadena pesada (VH) comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en H5, H7, H11, H12, H17, H20, H38, H40, H43, H55, H61, H65, H66, H67, H76, H81, H82, H87, H91, H93, H112, H113 y H116. En una realización, las una o más sustituciones de aminoácidos se seleccionan entre el grupo que consiste en 5His→Val, 7Pro→Ser, 11Leu→Val, 12Val→Lys, 17Pro→Ser, 20Leu→Val, 38Lys→Arg, 40Arg→Ala, 43Arg→Gln, 55Asp→Glu, 61Asn→Ala, 65Lys→Gln, 66Asp→Gly, 67Lys→Arg, 76Ser→Thr, 81Ile→Met, 82Gln→Glu, 87Thr→Arg, 91Ser→Thr, 93Val→Lys, 112Thr→Leu, 113Leu→Val y 116Ser→Val.

En una realización, el dominio de región variable de la cadena ligera (VL) comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en L9, L12, L15, L22, L34, L46, L47, L80, L83, L85, L87, y L89. En una realización, las una o más sustituciones de aminoácidos se seleccionan entre el grupo que consiste en 9Ala→Ser, 12Ala→Ser, 15Leu→Val, 15Leu→Pro, 22Ser→Thr, 34Asn→Gln, 46Gln→Lys, 47Ala→Pro, 80Asp→Asn, 83Glu→Gln, 85Asp→Glu, 87Ala→Thr y 89Thr→Asn.

En una realización, el dominio de región variable de la cadena pesada (VH) tiene al menos 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de VH seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº 38 (HC1), SEC ID Nº 39 (HC2), SEC ID Nº 40 (HC3), SEC ID Nº 41 (HC4), SEC ID Nº 42 (HC5), SEC ID Nº 43 (HC6), y SEC ID Nº 44 (HC7). En otra realización, el dominio de región variable de la cadena pesada (VH) comprende una secuencia de VH seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº 38 (HC1), SEC ID Nº 39 (HC2), SEC ID Nº 40 (HC3), SEC ID Nº 41 (HC4), SEC ID Nº 42 (HC5), SEC ID Nº 43 (HC6), y SEC ID Nº 44 (HC7).

En una realización, el dominio de región variable de la cadena ligera (VL) tiene al menos 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de VL seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº 33

(LC1), SEC ID Nº 34 (LC2), SEC ID Nº 35 (LC3), SEC ID Nº 36 (LC4), y SEC ID Nº 37 (LC5). En otra realización, el dominio de región variable de la cadena ligera (VL) comprende una secuencia de VL seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº 33 (LC1), SEC ID Nº 34 (LC2), SEC ID Nº 35 (LC3), SEC ID Nº 36 (LC4), y SEC ID Nº 37 (LC5).

En una realización, el anticuerpo o la porción de unión es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. En otra realización, la porción de unión a antígeno se selecciona entre el grupo que consiste en un Fab, un Fab', un F(ab')2, un Fv, un Fv unido por puente disulfuro, un scFv, y un $(scFv)_2$. En otra realización, el anticuerpo o porción de unión se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo específico doble, un anticuerpo de isotipo, un anticuerpo de dominio variable doble y un anticuerpo biespecífico. En otra realización, el anticuerpo o la porción de unión comprende un dominio constante de inmunoglobulina de la cadena pesada seleccionado entre el grupo que consiste en: un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgGl humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgE humana, y un dominio constante de IgA humana. En una realización, el anticuerpo o porción de unión comprende un dominio constante de IgG4 humana.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o de la porción de unión a antígeno de la presente invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico. En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula anfitriona que comprende el vector de expresión recombinante. En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la producción del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno que comprende el cultivo de la célula anfitriona en condiciones tales que la célula anfitriona produzca un anticuerpo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, o la parte de unión a antígeno y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para el tratamiento, prevención o diagnóstico de una enfermedad o trastorno relacionado con la integrina α2, comprendiendo dicho método la administración de la composición farmacéutica a un sujeto con

necesidad de la misma. En una realización, la enfermedad o el trastorno relacionado con la integrina α2 se selecciona entre el grupo que consiste en trombosis, una enfermedad vascular, cáncer, incluyendo neo-angiogénesis y metástasis, inflamación, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmune y una enfermedad caracterizada por una angiogénesis anormal o aumentada, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, reacciones a transplantes, neuritis óptica, traumatismo de la médula espinal, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, síndrome de Reynaud, encefalomielitis autoinmune experimental, síndrome de Sjorgen, esclerodermia, enfermedad cardiovascular, psoriasis, e infecciones que provocan una respuesta inflamatoria. En otra realización, la enfermedad o el trastorno relacionado con la integrina α2 se selecciona entre el grupo que consiste en síndrome coronario agudo, intervención coronaria percutánea, apoplejía isquémica, estenosis de la arteria carótida o enfermedad oclusiva arterial periférica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

Antes de que se describa la presente invención en detalle posteriormente, debe entenderse que la presente invención no está limitada a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos en la presente memoria puesto que éstos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria es para el fin de describir realizaciones particulares solamente y no se pretende que limite el alcance de la presente invención que se limitaría solamente por las reivindicaciones adjuntas. A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que se entienden habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

Preferentemente, los términos usados en la presente memoria se definen como se describe en “A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)”, Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. y Kölbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza).

A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones que la

siguen, a no ser que el contexto requiera otra cosa, la palabra “comprender” y variaciones tales como “comprende” y “que comprende”, se entenderá que implica la inclusión de un número entero indicado o la etapa o grupo de números enteros o etapas pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de etapa o número entero.

Varios documentos (por ejemplo: patentes, solicitudes de patente, publicaciones científicas, memorias descriptivas del fabricante, instrucciones, entregas de secuencia con número de acceso de GenBank, etc) se citan a lo largo del texto de la presente memoria descriptiva. Nada en la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a antedatar dicha descripción en virtud de invención previa. Algunos de los documentos citados en la presente memoria se caracterizan por estar “incorporados por referencia”. En el caso de un conflicto entre las definiciones o enseñanzas de tales referencias incorporadas y las definiciones o enseñanzas indicadas en la presente memoria descriptiva, el texto de la presente memoria descriptiva tiene precedencia.

Secuencias: todas las secuencias a las que se hace referencia en la presente memoria se describen en el listado de secuencias adjunto que, con su contenido y descripción completa, es una parte de la presente memoria descriptiva.

El término “aproximadamente” cuando se usa en relación con un valor numérico pretende abarcar valores numéricos dentro de un intervalo que tiene un límite inferior que es 5 % más pequeño que el valor numérico indicado y que tienen un límite superior que es 5 % mayor que el valor numérico indicado.

La expresión “integrina alfa 2” o “integrina a2” como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a integrina alfa 2 como se conoce en la técnica, preferentemente integrina alfa 2 humana y especialmente integrina alfa 2 humana que tiene la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEC ID Nº 21 y la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 20 o un fragmento biológicamente activo de las mismas. La expresión “dominio I” se refiere a la parte de integrina alfa 2 como está subrayada y en negrita en SEC ID Nº 20.

Las expresiones “se une específicamente”, “que se une específicamente” o similares, significan que el péptido o complejo peptídico, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica puede caracterizarse por una constante de disociación en equilibrio de al menos

aproximadamente $1x10^{-6}$ M o menos (por ejemplo, una K_D menor indica una unión más estrecha). Se conocen bien en la técnica métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmón superficial y similares. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a integrina alfa 2 puede, sin embargo, mostrar reactividad cruzada con otros antígenos tales como moléculas de integrina alfa 2 de otras especies. Además, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) que se unen a integrina alfa 2 y uno o más antígenos adicionales se consideran no obstante anticuerpos que "se unen específicamente" a integrina alfa 2, como se usa en la presente memoria.

El término "K_D", como se usa en la presente memoria, pretende referirse a la constante de disociación en equilibrio de un péptido/complejo peptídico particular, molécula diana o interacción anticuerpo-antígeno. La constante de disociación en equilibrio se mide típicamente en "mol/l" (abreviado como "M").

Por la expresión "tasa de disociación lenta", "Koff" o "kd" se entiende un péptido/complejo peptídico o anticuerpo que se disocia de integrina alfa 2 con una constante de velocidad de 1×10^{-3} s^{-1} o menos, preferentemente 1×10^{-4} s^{-1} o menos, según se determina por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™.

La expresión anticuerpo de "alta afinidad" se refiere a los mAb que tienen una afinidad de unión a integrina alfa 2 humana de al menos 10^{-10} M, preferentemente 10^{-11} M, incluso más preferentemente 10^{-12} M, según se mide por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™ o ELISA de afinidad de solución.

La expresión "resonancia de plasmón superficial", como se usa en la presente memoria, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en concentraciones de proteína dentro de una matriz biosensora, por ejemplo usando el sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.).

Un "epítopo", también conocido como determinante antigénico, es la región de un antígeno que se reconoce por el sistema inmune, específicamente por anticuerpos, linfocitos B o linfocitos T. Como se usa en la presente memoria, un "epítopo" es la parte de un antígeno capaz de unirse a un anticuerpo o fragmento

de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente memoria. En este contexto, el término “unión” preferentemente se refiere a una “unión específica”, como se define en la presente memoria. Los epítopos habitualmente consisten en agrupaciones químicamente tensioactivas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o grupos sulfonilo y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales pueden distinguirse en tanto que la unión al primero pero no al segundo se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.

Un “parátopo” es la parte de un anticuerpo que se une específicamente al epítopo.

El término “anticuerpo”, como se usa en la presente memoria, pretende referirse a moléculas de inmunoglobulina comprendidas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) inter-conectadas por enlaces disulfuro. El término “anticuerpo” también incluye todas las formas recombinantes de anticuerpos, en particular de los anticuerpos descritos en la presente memoria, por ejemplo, anticuerpos expresados en procariotas, anticuerpos no glucosilados y cualquier fragmento de anticuerpo de unión a antígeno y derivados como se describen posteriormente. Cada cadena pesada está comprendida por una región variable de cadena pesada (“HCVR” o “VH”) y una región constante de cadena pesada (comprendida por dominios CH1, CH2 y CH3). Cada cadena ligera está comprendida por una región variable de cadena ligera (“LCVR” o “VL”) y una región constante de cadena ligera (CL). Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones flanqueantes (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas de extremo amino terminal a carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a factores o tejidos hospedadores, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

Con respecto a la presente invención, las expresiones anticuerpo alfa2, anticuerpos a2, anticuerpo $\alpha 2$, anticuerpo de integrina alfa 2, anticuerpo de integrina a2, anticuerpo de integrina $\alpha 2$ se usan de forma sinónima y se refieren preferentemente a un inhibidor, es decir, anticuerpo anti alfa 2, anticuerpo anti a2, anticuerpo anti $\alpha 2$, anticuerpos anti integrina alfa 2, anticuerpos anti integrina a2, anticuerpo anti integrina $\alpha 2$.

La sustitución de uno o más restos de CDR u omisión de una o más CDR también es posible. Se han descrito anticuerpos en la bibliografía científica en los que puede prescindirse de una o dos CDR para la unión. Padlan *et al*. (1995 FASEB J. 9: 133-139) analizaron las regiones de contacto entre anticuerpos y sus antígenos, basándose en estructuras cristalinas publicadas y concluyeron que solamente aproximadamente de un quinto a un tercio de los restos de CDR entran en contacto de hecho con el antígeno. Padlan también descubrió muchos anticuerpos en los que una o dos CDR no tenía aminoácidos en contacto con un antígeno (véase también, Vajdos *et al.* 2002 J. Mol Biol. 320: 415-428).

Los restos de CDR que no entran en contacto con el antígeno pueden identificarse basándose en estudios previos (por ejemplo los restos H60-H65 en CDRH2 con frecuencia no se requieren), de regiones de CDR de Kabat que quedan fuera de CDR de Chothia, por formación de modelos moleculares y/o de forma empírica. Si una CDR, o resto o restos de la misma, se omite, habitualmente se sustituye con un aminoácido que ocupa la posición correspondiente en otra secuencia de anticuerpo humano o un consenso de tales secuencias. Las posiciones para sustitución dentro de CDR y aminoácidos para sustituir también pueden seleccionarse empíricamente. Las sustituciones empíricas pueden ser sustituciones conservativas o no conservativas.

La expresión “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “parte de unión”), como se usa en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a integrina alfa 2. Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes consistentes en los dominios VL, VH, CL y CH; (ii) fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab

ligados por un puente disulfuro en la región bisagra, (iii) fragmentos Fd que consisten en los dominios VH y CH; (iv) fragmentos Fv que consisten en los dominios VL y VH de una rama sencilla de un anticuerpo, (v) fragmentos dAb (Ward *et al.,* (1989). Nature 341: 544-546), que consisten en un dominio VH; (vi) regiones determinantes de complementariedad (CDR) aisladas, y (vii) combinaciones de dos o más CDR aisladas que pueden unirse opcionalmente por un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se codifican por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permita prepararse como una cadena proteica sencilla en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv), véase, por ejemplo, Bird *et al* (1988) Science 242: 423-426, y Huston *et al* (1988) Proc Natl Acad Sci. USA 85: 5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla también pretenden abarcarse dentro de la expresión “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo. Un ejemplo adicional es una proteína de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprende (i) un polipéptido de dominio de unión que se fusiona con un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región bisagra, y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región constante CH2. El polipéptido de dominio de unión puede ser una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se describen adicionalmente en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia y los fragmentos se exploran con respecto a utilidad de la misma manera que anticuerpos intactos. Son ejemplos adicionales de “fragmentos de unión a antígeno” los denominados microanticuerpos, que se derivan de CDR sencillas. Por ejemplo, Heap *et al*. describen un microanticuerpo de 17 restos aminoacídicos derivado de la CDR3 de cadena pesada de un anticuerpo dirigido contra la glucoproteína de envoltura gp120 de VIH-1 (Heap CJ *et al*. (2005) J. Gen. Virol. 86: 1791-1800). Otros ejemplos incluyen miméticos de anticuerpos pequeños que comprenden dos o más regiones CDR que se fusionan entre sí, preferentemente por regiones flanqueantes afines. Un mimético de anticuerpo pequeño tal que comprende VH CDR1 y VL CDR3 ligadas por la VH

FR2 afín se han descrito por Qiu *et al*. (Qiu XQ, *et al*. (2007) Nature Biotechnology 25 (8): 921-929).

Por lo tanto, la expresión “anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo”, como se usa en la presente memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se unen inmunoespecíficamente a un antígeno.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos utilizables en la invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. Preferentemente, los anticuerpos o fragmentos son de origen humano, de chimpancé, roedor (por ejemplo, ratón, rata, cobaya o conejo) pollo, pavo, cerdo, oveja, cabra, camello, vaca, caballo, burro, gato o perro. Se prefiere particularmente que los anticuerpos sean de origen humano o murino. Los anticuerpos de la invención también incluyen moléculas quiméricas en las que una región constante de anticuerpo derivado de una especie, preferentemente ser humano, se combina con el sitio de unión a antígeno derivado de otra especie, por ejemplo, ratón. Además, los anticuerpos de la invención incluyen moléculas humanizadas en las que los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo derivado de una especie no humana (por ejemplo, de ratón) se combinan con regiones flanqueantes y constantes de origen humano.

Como se ejemplifica en la presente memoria, los anticuerpos de la invención pueden obtenerse directamente de hibridomas que expresan el anticuerpo o pueden clonarse y expresarse de forma recombinante en una célula hospedadora (por ejemplo, una célula CHO, o una célula linfocítica). Son ejemplos adicionales de células hospedadoras microorganismos, tales como *E. coli* y hongos, tales como levadura. Como alternativa, pueden producirse de forma recombinante en una planta o animal no humano transgénico.

La expresión “anticuerpo quimérico” se refiere a los anticuerpos en los que una parte de cada una de las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras es homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase particular, mientras que el segmento restante de la cadena es homólogo a las secuencias correspondientes en otra especie o clase. Típicamente la región variable de las cadenas tanto pesadas como ligeras imita las regiones variables de anticuerpos derivados de una

especie de mamífero, mientras que las partes constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos derivadas de otra. Una ventaja clara de tales formas quiméricas es que la región variable puede derivarse convenientemente de fuentes actualmente conocidas usando linfocitos B fácilmente disponibles o hibridomas de organismos hospedadores no humanos en combinación con regiones constantes derivadas de, por ejemplo, preparaciones celulares humanas. Mientras que la región variable tiene la ventaja de facilidad de preparación y la especificidad no se ve afectada por la fuente, la región constante que es humana inducirá con menos probabilidad una respuesta inmune de un sujeto humano cuando los anticuerpos se inyectan que la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no está limitada a este ejemplo particular.

La expresión “anticuerpo humanizado” se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno que se derivada sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, basándose la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula en la estructura y/o la secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados en dominios constantes o solamente las regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas en regiones flanqueantes apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión a antígeno pueden ser de tipo silvestre o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificados para asemejarse a inmunoglobulinas humanas de forma más cercana. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR del anticuerpo de ratón). Otras formas tienen uno o más CDR que se alteran con respecto al anticuerpo original.

Se conocen diferentes métodos para humanizar anticuerpos por el experto en la materia, como se revisa en Almagro y Fransson, el contenido de la cual se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad (Almagro JC y Fransson J (2008) Frontiers in Bioscience 13: 1619-1633). Almagro y Fransson distinguen entre enfoques racionales y enfoques empíricos. Los enfoques racionales se caracterizan por generar pocas variantes del anticuerpo obtenido por ingeniería genética y evaluar su unión o cualquier otra propiedad de interés. Si las variantes diseñadas no producen los resultados esperados, se inicia un nuevo ciclo de diseño y evaluación de unión. Los enfoques racionales incluyen injerto de CDR,

modificación de la superficie, superhumanización y optimización del contenido en serie humano. Por el contrario, los enfoques empíricos se basan en la generación de grandes bibliotecas de variantes humanizadas y selección de los mejores clones usando tecnologías de enriquecimiento o exploración de alto rendimiento. En consecuencia, los enfoques empíricos dependen de una selección fiable y/o sistema de exploración que es capaz de buscar a través de un vasto espacio de variantes de anticuerpo. Las tecnologías de presentación *in vitro*, tales como presentación de fagos y presentación de ribosomas cumplen estos requisitos y se conocen bien por el experto en la materia. Los enfoques empíricos incluyen bibliotecas de FR, selección guiada, redistribución de armazones e ingeniería humana.

La expresión “anticuerpo humano”, como se usa en la presente memoria pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los mAb humanos de la invención pueden incluir restos aminoacídicos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, no se pretende que la expresión “anticuerpo humano”, como se usa en la presente memoria, incluya mAb en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal u otra especie de mamífero (por ejemplo, ratón), se han injertado en secuencias FR humanas. Los anticuerpos humanos de la invención incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se ha descrito por ejemplo en la Patente de Estados Unidos Nº 5.939.598 de Kucherlapati y Jakobovits.

La expresión “anticuerpo monoclonal” como se usa en la presente memoria se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular sencilla. Un anticuerpo monoclonal presenta una especificidad y afinidad de unión sencilla por un epítopo particular. En una realización, los anticuerpos monoclonales se producen por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal no humano, por ejemplo, ratón, fusionado con una célula inmortalizada.

La expresión “anticuerpo recombinante”, como se usa en la presente memoria, incluye todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan

por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico con respecto a los genes de inmunoglobulina o un hibridoma preparado a partir de los mismos, (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos combinatoria recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

El término “transfectoma”, como se usa en la presente memoria, incluye células hospedadoras eucarióticas recombinantes que expresan un anticuerpo, tales como células CHO, células NS/0, células HEK293, células HEK293T, células vegetales u hongos, incluyendo células de levadura.

Como se usa en la presente memoria, un “anticuerpo heterólogo” se define en relación con un organismo transgénico que produce dicho anticuerpo. Esta expresión se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificante correspondiente a la hallada en un organismo que no consiste en el organismo transgénico y derivada generalmente de una especie distinta del organismo transgénico.

Como se usa en la presente memoria, un “anticuerpo heterohíbrido” se refiere a un anticuerpo que tiene cadenas ligeras y pesadas de diferentes orígenes de organismo. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una cadena pesada humana asociada con una cadena ligera murina es un anticuerpo heterohíbrido.

Por lo tanto, los “anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos”, adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, monovalentes, biespecíficos, heteroconjugados, multiespecíficos, recombinantes, heterólogos, heterohíbridos, quiméricos, humanizados (en particular injertados con CDR), desinmunizados o humanos, fragmentos Fab, fragmentos Fab’, fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, Fd, Fv, Fv enlazados por disulfuro (dsFv), anticuerpos de cadena sencilla (por ejemplo, scFv), diacuerpos o tetracuerpos (Holliger P. *et al*. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(14), 6444-6448), nanocuerpos (también conocidos como anticuerpos de dominio sencillo), anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos de la invención) y fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de

los anteriores.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria están preferentemente aislados. Se pretende que un “anticuerpo aislado”, como se usa en la presente memoria, se refiera a un anticuerpo que está sustancialmente sin otros mAb que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a integrina alfa 2 está sustancialmente sin mAb que se unen específicamente a antígenos distintos de integrina alfa). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a integrina alfa 2 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de integrina alfa 2 de otra especie.

Las expresiones “función biológica o función de integrina alfa 2” como se usan en la presente memoria, se usan de forma sinónima y se refieren a cualquier función de integrina alfa 2 tal como, pero sin limitación: unión a y formación de un complejo con integrina beta 1, unión a cualquiera de los ligandos conocidos tal como unión a colágeno, laminina, agregación plaquetaria inducida por colágeno, inducción de respuestas trombóticas, trombocitopenia, migración celular en colágeno, reorganización dependiente de células de fibras de colágeno, respuestas celulares dependientes de colágeno resultantes en aumentos en la expresión y proliferación de citocinas, aspectos dependientes de colágeno o integrina alfa 2 de la función de linfocitos T, mastocitos o neutrófilos, aspectos dependientes de colágeno o integrina alfa 2 de hipersensibilidad de tipo retardado, aspectos dependientes de colágeno o integrina alfa 2 de hipersensibilidad de contacto, artritis inducida por colágeno, morfogénesis ductal de glándula mamaria, curación de heridas epidérmicas y procesos asociados con angiogénesis inducida por VEGF.

Como se usa en la presente memoria, un “antagonista de integrina alfa 2” indica un compuesto que inhibe al menos una actividad biológica de integrina alfa 2, preferentemente una actividad de integrina alfa 2 presente en plaquetas sanguíneas, células endoteliales vasculares, células epiteliales, monocitos/macrófagos activados, fibroblastos, leucocitos, linfocitos, neutrófilos activados y/o mastocitos especialmente cuando se usan en cantidades estequiométricas. Los antagonistas de alfa 2 preferidos de la presente invención son anticuerpos neutralizadores.

Se pretende que un “anticuerpo neutralizador”, como se usa en la presente

memoria (o un “anticuerpo que neutraliza la actividad de integrina alfa 2”), se refiera a un anticuerpo cuya unión a integrina alfa 2 da como resultado la inhibición de al menos una actividad biológica de integrina alfa 2, preferentemente inhibición de la actividad activadora de plaquetas de integrina alfa 2. Esta inhibición de la actividad biológica de integrina alfa 2 puede evaluarse midiendo uno o más indicadores de actividad biológica de integrina alfa 2 por uno o más de varios ensayos convencionales *in vitro* o *in vivo* conocidos en la técnica. Los ejemplos de tales ensayos se describen por ejemplo en los ejemplos de la presente invención.

Puesto que la integrina alfa 2 tiene funciones tales como las enumeradas anteriormente, la actividad de la integrina alfa 2 tiene un efecto en varias enfermedades tales como las asociadas con actividad plaquetaria aumentada. En consecuencia, los antagonistas de integrina alfa 2, tales como péptidos o complejos peptídicos inhibidores que se dirigen a integrina alfa 2 o anticuerpos neutralizadores anti-integrina alfa 2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, son útiles para reducir o inhibir los efectos de integrina alfa 2, tales como actividad plaquetaria. En consecuencia, los antagonistas de integrina alfa 2 son útiles para aliviar, mejorar, inhibir o prevenir varias de tales enfermedades, incluyendo sin limitación trombosis, una enfermedad vascular, cáncer, incluyendo neo-angiogénesis y metástasis, inflamación, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmune y una enfermedad caracterizada por angiogénesis anómala o aumentada, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, reacciones a trasplante, neuritis óptica, traumatismo de la médula espinal, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, síndrome de Reynaud, encefalomielitis autoinmune experimental, síndrome de Sjorgen, esclerodermia, enfermedad cardiovascular, psoriasis e infecciones que inducen una respuesta inflamatoria.

En realizaciones específicas, los anticuerpos anti-integrina alfa 2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en la presente memoria pueden conjugarse con un resto terapéutico (“inmunoconjugado”), tal como una citotoxina, un fármaco quimioterapéutico, un inmunosupresor o un radioisótopo.

Una “sustitución de aminoácido conservativa” es una en la que un resto aminoacídico se sustituye por otro resto aminoacídico que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácido conservativa no

cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En casos en los que dos o más secuencias de aminoácidos difieran entre sí por sustituciones conservativas, el porcentaje o grado de similitud puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Se conocen bien medios para realizar este ajuste por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen

1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina;

2) cadenas laterales alifáticas-hidroxilo: serina y treonina;

3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina;

4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano;

5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina;

6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato y

7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina.

Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativa preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Como alternativa, un reemplazo conservativo es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrita en *Gonnet et al*. (1992) Science 256: 1443-1445. Un reemplazo “moderadamente conservativo” es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250. Dado el código genético conocido y técnicas de ADN sintético y recombinante, el científico experto puede construir fácilmente ADN que codifiquen variantes de aminoácidos conservativas.

Como se usan en la presente memoria, “sustituciones no conservativas” o “intercambios de aminoácidos no conservativos” se definen como intercambios de un aminoácido por otro aminoácido enumerado en un grupo diferente de los siete grupos de aminoácidos convencionales 1) a 7) mostrados anteriormente.

La expresión “identidad sustancial” o “sustancialmente idéntico”, cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando se alinea óptimamente con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), existe identidad de la secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente 90 %, y más preferentemente en al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases

nucleotídicas, según se mide por cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tales como FASTA, BLAST o GAP, como se analiza posteriormente.

Como se aplica a polipéptidos, la expresión “similitud sustancial” o “sustancialmente similar” significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos 90 % de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas.

La similitud de secuencia para polipéptidos se mide típicamente usando software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteínas empareja secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, el software GCG contiene programas tales como GAP y BESTFIT que pueden usarse con parámetros por defecto para determinar homología de secuencia o identidad de secuencias entre polipéptidos cercanamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas también pueden compararse usando FASTA con parámetros recomendados o por defecto; un programa en GCG versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineamientos e identidad de secuencia porcentual de las regiones del mejor solapamiento entre la secuencia de búsqueda y de consulta (Pearson (2000) mencionado anteriormente). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la invención con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, usando parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul *et al*. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 410 y (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389 402, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria por referencia.

Cuando se hace referencia a porcentajes de identidad de secuencia en la presente solicitud, estos porcentajes se calculan en relación a la longitud completa de la secuencia más larga, si no se indica específicamente de otro modo. Este cálculo en relación a la longitud completa de la secuencia más larga se aplica tanto

a secuencias de ácido nucleico como a secuencias polipeptídicas.

Como se usa en la presente memoria, “tratar”, “tratando” o “tratamiento” de una enfermedad o trastorno significa conseguir uno o más de los siguientes: (a) reducir la gravedad y/o duración del trastorno; (b) limitar o prevenir el desarrollo de síntomas característicos del trastorno o trastornos a tratar; (c) inhibir el empeoramiento de síntomas característicos del trastorno o los trastornos a tratar; (d) limitar o prevenir la reaparición del trastorno o trastornos en pacientes que han tenido previamente el trastorno o trastornos; y (e) limitar o prevenir la reaparición de síntomas en pacientes que han sido previamente sintomáticos para el trastorno o trastornos.

Como se usa en la presente memoria, “prevenir”, “previniendo”, “prevención” o “profilaxis” de una enfermedad o trastorno significa prevenir que un trastorno suceda en el sujeto.

Como se usa en la presente memoria, las expresiones “es para administración” y “es para administrarse” tienen el mismo significado que “se prepara para administrarse”. En otras palabras, la afirmación de que un compuesto activo “es para administración” debe entenderse en tanto que dicho compuesto activo se ha formulado y compuesto en dosis de modo que dicho compuesto activo está en un estado capaz de ejercer su actividad terapéutica.

Se pretende que las expresiones “cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad terapéutica” signifiquen la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que inducirá la respuesta biológica o médica de un tejido, un sistema, animal o ser humano que se busca por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro especialista clínico. Se pretende que la expresión “cantidad profilácticamente eficaz” signifique la cantidad de un fármaco que prevendrá o reducirá el riesgo de aparición del acontecimiento médico o biológico que se busca prevenir en un tejido, un sistema, animal o ser humano por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro especialista clínico. Particularmente, la dosificación que recibe un paciente puede seleccionarse para conseguir la cantidad de péptido o complejo peptídico para mostrar suficiente inhibición de función de integrina alfa 2 para permitir la terapia profiláctica o curativa (prevención, mejora o curación) de una enfermedad o trastorno relacionado con integrina $\alpha 2$, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en trombosis, una enfermedad vascular, cáncer, incluyendo neoangiogénesis y metástasis, inflamación, enfermedad

inflamatoria, enfermedad autoinmune y una enfermedad caracterizada por angiogénesis anómala o aumentada, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, reacciones a trasplante, neuritis óptica, traumatismo de la médula espinal, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, síndrome de Raynaud, encefalomielitis autoinmune experimental, síndrome de Sjorgen, esclerodermia, enfermedad cardiovascular, psoriasis e infecciones que inducen una respuesta inflamatoria.

Como se usa en la presente memoria, un “paciente” significa cualquier mamífero o ave que pueda beneficiarse de un tratamiento con los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en la presente memoria. Preferentemente, un “paciente” se selecciona del grupo que consiste en animales de laboratorio (por ejemplo, ratón o rata) animales domésticos (incluyendo por ejemplo, cobaya, conejo, pollo, pavo, cerdo, oveja, cabra, camello, vaca, caballo, burro, gato o perro) o primates incluyendo chimpancés y seres humanos. Se prefiere particularmente que el “paciente” sea un ser humano.

“Farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerada en la Farmacopea de Estados Unidos (United States Pharmacopeia-33/National Formulary-28 Reissue, publicada por la United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville Md, fecha de publicación: abril de 2010) u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y más particularmente en seres humanos.

Las poblaciones específicas tratables por los métodos terapéuticos de la invención incluyen sujetos indicados para mutaciones activadoras de integrina alfa 2 (mutaciones de ganancia de función, “GOF”), sujetos con enfermedad o trastorno relacionado con integrina $\alpha 2$, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en trombosis, una enfermedad vascular, cáncer, incluyendo neoangiogénesis y metástasis, inflamación, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmune y una enfermedad caracterizada por angiogénesis anómala o aumentada, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, reacciones a trasplante, neuritis óptica, traumatismo de la médula espinal, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, síndrome de Reynaud, encefalomielitis autoinmune experimental, síndrome de Sjorgen, esclerodermia, enfermedad cardiovascular, psoriasis e infecciones que inducen una respuesta inflamatoria.

Realizaciones de la Invención

La presente invención se describirá a continuación de forma adicional. En los siguientes pasajes se definen con más detalle diferentes aspectos de la presente invención. Cada aspecto así definido se puede combinar con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferente o ventajosa se puede combinar con cualquier otra característica o características indicada como preferente o ventajosa, a menos que se indique claramente lo contrario.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un péptido o complejo peptídico, preferentemente un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho péptido o complejo peptídico, anticuerpo o fragmento se une específicamente al dominio I de la integrina α2 humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento un dominio de región variable de la cadena pesada (VH) y un dominio de región variable de la cadena ligera (VL), en el que dicho anticuerpo o fragmento presenta reactividad cruzada con integrina α2 no humana de primate pero no presenta reactividad cruzada con integrina α2 que no sea de primate.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un péptido o complejo peptídico, preferentemente un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho péptido o complejo peptídico, anticuerpo o fragmento se une específicamente al dominio I de la integrina α2 humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento un dominio de región variable de la cadena pesada (VH) y un dominio de región variable de la cadena ligera (VL), en el que dicho anticuerpo o fragmento compite con un anticuerpo de referencia por la unión al epítopo del anticuerpo de referencia, comprendiendo dicho anticuerpo de referencia una cadena ligera codificada por el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de adhesión DSM 23944 y una cadena pesada codificada por (i) el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de adhesión DSM 23946 o bien (ii) el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de adhesión DSM 23945.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un péptido o complejo peptídico, en el que el péptido o complejo peptídico comprende uno o más de los siguientes componentes a) a f):

LCDR1, en el que LCDR1 es RASESVESYGNSFIY (SEC ID Nº 6) o una variante funcionalmente activa de la misma,

LCDR2, en el que LCDR2 es LASNLAS (SEC ID Nº 7) o una variante funcionalmente activa de la misma,

LCDR3, en el que LCDR3 es QQNNEDPYT (SEC ID Nº 8) o una variante funcional activa de la misma,

HCDR1, en el que HCDR1 es GYTFTSYWMN (SEC ID Nº 3) o una variante funcionalmente activa de la misma,

HCDR2, en el que HCDR2 es RIDPSDSETHYNQKFK (SEC ID Nº 4) o una variante funcionalmente activa de la misma, y

HCDR3, en el que HCDR3 es VGRGYFDY (SEC ID Nº 5) o una variante funcional activa de la misma,

y en el que el uno o más componentes a) a f) se disponen para permitir la unión del péptido o complejo peptídico a la integrina α2 o como integrina α2β1 heterodimérica.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere al péptido o complejo peptídico anterior para su uso en el tratamiento, profilaxis o diagnóstico de una enfermedad o trastorno relacionado con la integrina α2.

Las secuencias de SEC ID Nº 6 a 8 son CDR de cadenas ligeras y las de SEC ID Nº 3 a 5 son las CDR de cadenas pesadas del anticuerpo analizado (según se determina por análisis de secuencia). De acuerdo con la presente invención, el péptido o complejo peptídico, comprende una de las anteriores CDR de cadena ligera o una variante funcionalmente activa de las mismas y/o una de las CDR de cadena pesada o una variante funcionalmente activa de las mismas. Los ejemplos incluyen un péptido o complejo peptídico que comprende uno, dos o tres de las anteriores HCDRS y/o una, dos o tres de las anteriores LCDR en cualquiera de las combinaciones concebibles. Una realización de la presente invención es un péptido o complejo peptídico que comprende 3 LCDR y 3 HCDR, en el que al menos una de ellas es una de las anteriores CDR de a a f.

En el contexto de la presente invención, los términos LCDR y LDR se usan de forma sinónima. Lo mismo se aplica para los términos HCDR y HDR.

Si las anteriores CDR se disponen de una manera adecuada, la disposición permite la unión específica a integrina α2. La disposición adecuada de CDR para permitir la unión de un antígeno se conoce en la técnica. Se ha desarrollado o identificado hasta el momento una diversidad de diferentes formatos de anticuerpo o formatos de parámetros de unión. Cualquiera de estas o cualquier otra disposición adecuada puede usarse para el polipéptido o complejo polipeptídico de la presente invención, siempre que el formato o disposición permita la unión específica a integrina α2.

Las secuencias CDR, como se han definido por las anteriores SEC ID Nº o variantes de las mismas, pueden disponerse en una cadena (poli) peptídica o en un polipéptido o complejo peptídico. Si se disponen dentro de una cadena (poli) peptídica, las secuencias pueden conectarse por una o más secuencias enlazadoras, preferentemente un enlazador peptídico, por ejemplo, como una proteína de fusión. De acuerdo con una realización, pueden incluirse en un armazón o soporte de anticuerpo artificial o natural, como se conoce en la técnica. Para anticuerpos naturales, las CDR se soportan dentro de los dominios variables por regiones flanqueantes conservadas. El armazón puede modificarse para obtener anticuerpos artificiales, tales como Fab, anticuerpos de cadena sencilla, etc., que se describen posteriormente en más detalle.

Si se disponen las CDR en un complejo peptídico, se unen dos o más (poli) péptidos entre sí por enlaces no covalentes incluyendo enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrófobas.

Un péptido es un compuesto orgánico compuesto de 2 o más aminoácidos α dispuestos en una cadena lineal. Los aminoácidos se unen entre sí por enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de restos aminoacídicos adyacentes. En general, el código genético especifica 20 aminoácidos convencionales. Después o incluso durante la síntesis, los restos en una proteína pueden modificarse químicamente por modificación post-traduccional, que altera las propiedades físicas y químicas, el plegamiento, estabilidad, actividad y, en última instancia, la función de las proteínas. Los péptidos de acuerdo con los diferentes aspectos de la presente invención pueden modificarse o no modificarse siempre que sean capaces de unirse a la integrina α2.

En la técnica, el término “polipéptido” se refiere a una molécula que comprende aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30 o

más aminoácidos acoplados entre sí por enlaces peptídicos de una manera lineal para formar una cadena polipeptídica. Moléculas más cortas de este tipo que comprenden al menos dos aminoácidos se denominan generalmente péptidos. El término “proteína” habitualmente se refiere a moléculas que comprenden una o más cadenas polipeptídicas. En el contexto de la presente invención, los términos péptido, polipéptido y proteína se usan de forma sinónima.

En el contexto de la presente invención, el término “péptido” o “polipéptido” de acuerdo con los diferentes aspectos de la presente invención se refiere a péptidos o polipéptidos como se ha definido anteriormente y la expresión “complejo peptídico” se refiere a complejos moleculares que comprenden uno o más péptidos y/o polipéptidos como se han definido anteriormente (por ejemplo los anticuerpos, fragmentos de unión a antígenos y otras moléculas de unión de la invención).

Los péptidos y complejos peptídicos de los mismos como se han definido en la presente memoria reconocen selectivamente y se unen específicamente a un antígeno de integrina α2. En el contexto de la presente invención, la expresión “unión específica a integrina α2” se refiere a la capacidad del péptido o complejo peptídico de acuerdo con la invención de unirse específicamente a integrina α2 o al dominio I de integrina α2 o a integrina α2 en el complejo con cualquier otro polipéptido tal como en el complejo heterodimérico con otra subunidad de integrina, por ejemplo, el complejo de integrina α2β1. En una realización preferida, el péptidos o los complejos peptídicos de la presente invención comprenden o consisten en o es un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

El uso de los términos “selectivo” o “específico” en la presente memoria, cuando se usan para describir las características de unión del péptido o complejo peptídico de acuerdo con la invención, se refiere al hecho de que los péptidos o complejos peptídicos descritos no muestran unión significativa a otra integrina distinta de α2, excepto en los casos específicos en los que el péptido/complejo se complementa para conferir una especificidad adicional distinta de la parte de unión específica a integrina α2 (como, por ejemplo, en moléculas biespecíficas o bifuncionales en las que la molécula se diseña para unirse o efectuar dos funciones, al menos una de las cuales es unirse específicamente a integrina α2). En realizaciones específicas, los péptidos específicos de integrina α2 o complejos

de los mismos se unen a integrina α2 humana con una K_D de al menos 1,2 x 10^{-6}. En realizaciones específicas, los péptidos específicos de integrina α2 o complejos de los mismos se unen a integrina α2 humana con una K_D de 5 x 10^{-7} o más o de 2 x 7^{-10} o más, o de 1 x 10^{-7} o más. En realizaciones adicionales, los péptidos específicos de integrina α2 o complejos de los mismos se unen a integrina α2 humana con una K_D de 1 x 10^{-8} o más. En otras realizaciones, los péptidos específicos de integrina α2 o complejos de los mismos se unen a integrina α2 humana con una K_D de 5 x 10^{-9} o más o de 1 x 10^{-9} o más. En realizaciones adicionales, los péptidos específicos de integrina α2 o complejos de los mismos se unen a integrina α2 humana con una K_D de 2 x 10^{-10} o más. En realizaciones específicas, los péptidos específicos de integrina α2 o complejos de los mismos no se unen a otras proteínas a las K_D anteriores. En otras realizaciones, los péptidos específicos de integrina α2 o complejos de los mismos se unen a una integrina α2 (por ejemplo, integrina α2 humana y/o de primate no humana) con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno no específico.

K_D se refiere a la constante de disociación obtenida de la relación de k_d (la tasa de disociación de una interacción de proteína diana-molécula de unión particular; también denominada k_{off}) y k_a (la tasa de asociación de la interacción proteína diana-molécula de unión particular; también denominada k_{on}), o k_d/k_a que se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D puede determinarse usando métodos bien establecidos en la técnica. Un método preferido para determinar la K_D de una molécula de unión se describe en el Ejemplo 1 D.

Se ha mostrado que los péptidos específicos de integrina α2 o complejos de los mismos inhiben de forma dependiente de dosis la interacción ligando/integrina α2 (véase Figura 2 y Ejemplos). En consecuencia, los péptidos específicos de integrina α2 o complejos de los mismos pueden caracterizarse por su capacidad para contrarrestar la unión de colágeno a integrina α2. El alcance de la inhibición por cualquier péptido específico de integrina α2 o complejo del mismo puede medirse de forma cuantitativa en comparación estadística con un control o mediante cualquier método alternativo disponible en la técnica. En realizaciones específicas, la inhibición es aproximadamente 10 % de inhibición o más. En otras realizaciones, la inhibición es 20 % o más, 30 % o más, 40 % o más, 50 % o más, 60 % o más, 70 % o más, 80 % o más, 90 % o más o 95 % o más.

El péptido o complejo peptídico también puede comprender una variante funcionalmente activa de las secuencias anteriores. Una variante funcionalmente activa de los péptidos o complejos peptídicos de la invención se caracteriza porque tiene una actividad biológica similar a la presentada por el péptido completo, incluyendo la capacidad de unirse a integrina $\alpha 2$ y opcionalmente inhibir integrina $\alpha 2$. La variante es funcionalmente activa en el contexto de la presente invención, si la actividad (por ejemplo actividad de unión, expresada opcionalmente como K_D) de la variante equivale a 10 % o más, 25 % o más, 50 % o más, 70 % o más, 80 % o más, 90 % o más, 95 % o más o 99 % o más de la actividad del péptido/complejo sin alteración de secuencia. Se proporcionan métodos adecuados para determinar la actividad de unión a integrina $\alpha 2$ en los ejemplos. Puede obtenerse una variante funcionalmente activa por un número limitado de sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

En realizaciones preferidas de la presente invención el péptido o complejo peptídico de la invención se caracteriza adicionalmente por una o más de las siguientes características:

(i) uno, dos o tres componentes a) a c) están comprendidos en un dominio variable de una cadena ligera (VL)

(ii) uno, dos o tres componentes d) a f) están comprendidos en un dominio variable de una cadena pesada (VH)

(iii) el péptido o complejo peptídico es un anticuerpo

(iv) el péptido o complejo peptídico es Fab, un Fab', un F(ab')2, un Fv, un Fv con enlace disulfuro, un scFv, un $(scFv)_2$, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo o un minicuerpo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado

(v) el péptido o complejo peptídico comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en: un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgG1 humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgE humana y un dominio constante de IgA humana

(vi) la variante funcionalmente activa es un fragmento funcionalmente activo que consiste en 60 % o más, 70 % o más, 80 % o más, 90 % o más, 95 % o

más, o 99 % o más de una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEC ID Nº 3 a 8;

(vii) la variante funcionalmente activa es una variante funcionalmente activa que tiene 60 % o más, 70 % o más, 80 % o más, 90 % o más, 95 % o más, o 99 % o más identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEC ID Nº 3 a 8, particularmente derivando la variante funcionalmente activa de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEC ID Nº 3 a 8 por una o más sustituciones de aminoácidos conservativas

(viii) el péptido o complejo peptídico comprende la secuencia de aminoácidos de

- SEC ID Nº 1 o una variante funcionalmente activa de la misma,
- SEC ID Nº 2, o una variante funcionalmente activa de la misma,
- SEC ID Nº 9, o una variante funcionalmente activa de la misma,
- SEC ID Nº 10, o una variante funcionalmente activa de la misma, y/o
- SEC ID Nº 11, o una variante funcionalmente activa de la misma,

(ix) el péptido o complejo peptídico consiste en la secuencia de aminoácidos de

- SEC ID Nº 9, o una variante funcionalmente activa de la misma,
- SEC ID Nº 10, o una variante funcionalmente activa de la misma, y
- opcionalmente 50 o menos restos aminoacídicos adicionales, 1 a 40, 1 a 30, 1 a 25, 1 a 15, 1 a 10 ó 5, 4, 3, 2 o 1 resto aminoacídico adicional

(x) el péptido o complejo peptídico consiste en la secuencia de aminoácidos de

- SEC ID Nº 9, o una variante funcionalmente activa de la misma,
- SEC ID Nº 11, o una variante funcionalmente activa de la misma, y
- opcionalmente 50 o menos restos aminoacídicos adicionales, 1 a 40, 1 a 30, 1 a 25, 1 a 15, 1 a 10 ó 5, 4, 3, 2 o 1 resto aminoacídico adicional.

SEC ID Nº 1 y 2 pueden obtenerse de la Figura Nº 5: SEC ID Nº 1 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable de anticuerpo de integrina α2. SEC ID Nº 2 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable, respectivamente.

SEC ID Nº 9, 10 y 11 pueden obtenerse de la Figura 7: SEC ID Nº 9 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera quimérica del anticuerpo producido como un formato IgG4 (CDR subrayadas), SEC ID Nº 10 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada quimérica del anticuerpo producido como un formato IgG4 (CDR subrayadas) y SEC ID Nº 11 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada quimérica en formato Fab con un marcador 6xhis. Las

regiones constantes derivaron de cadenas principales de secuencia humana (véase ejemplos). La invención también está relacionada con cualquiera de las construcciones de anticuerpo o fragmentos, péptido o complejos peptídicos sin el marcador his.

De acuerdo con una realización, los dominios variables de la HC y LC se acoplan a regiones constantes respectivas y forman construcciones de HC o LC quiméricas. Son realizaciones específicas una región variable LC de anticuerpo de integrina α2 quimérico fusionada con la región constante de proteína IGKC (tal como por ejemplo en SEC ID Nº 9), una región variable HC de anticuerpo de integrina α2 quimérico fusionada con la región constante de IGHG4 (tal como por ejemplo, en SEC ID Nº 10) o una región variable HC de anticuerpo de integrina α2 quimérico fusionada con el dominio CH1 de región constante de IGHG1 (tal como por ejemplo en SEC ID Nº 11).

Como se ha detallado anteriormente, los componentes a) a c) (LC CDR) y d) a f) (HC CDR) se obtuvieron por secuenciación del dominio variable de una cadena ligera (VL) y dominio variable de una cadena pesada (VH), respectivamente, del anticuerpo monoclonal producido y ensayado. En consecuencia, pueden comprenderse en el mismo. Puede ser cualquier armazón VH o VL de origen natural o un armazón VH o VL artificial. En una realización de la presente invención, una o más de las CDR (LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3) se disponen en el armazón del dominio variable prevalente, es decir, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 en el armazón de VL y HCDR1, HCDR2 y HCDR3 en el armazón de VH. Esto significa que las CDR, como se identifican por cualquier método adecuado descrito anteriormente (consúltese SEC ID Nº 1 y 2) solas, juntas o en cualquier combinación de las mismas pueden retirarse del ambiente mostrado y transferirse al armazón de otro (segundo) dominio variable, sustituyendo de este modo las CDR del segundo dominio variable. Se conoce en la técnica una diversidad de dominios variables o secuencias de anticuerpo y pueden usarse para este fin. Por ejemplo, pueden obtenerse dominios variables, en los que se insertan CDR de interés, de cualquier línea germinal o dominio variable humano reordenado. Los dominios variables también pueden producirse de forma sintética. Las regiones CDR pueden introducirse en los dominios variables respectivos usando tecnología de ADN recombinante. Un medio por el que se consigue esto se describe en Marks *et al.,* 1992, Bio/Technology 10: 779-783. Puede emparejarse un

dominio variable pesado con un dominio variable ligero para proporcionar un sitio de unión a antígeno. Además, pueden usarse regiones independientes (por ejemplo, un dominio pesado variable solo), para unirse al antígeno.

También son concebibles combinaciones de las quimeras de cadena ligera o pesada anteriormente descritas con cadenas ligeras o pesadas generadas artificialmente por injerto de CDR como se ha descrito en el párrafo anterior siempre que muestren especificidad de unión a integrina $\alpha 2$.

Los péptidos o complejos peptídicos de la presente invención pueden glucosilarse. La glucosilación de proteínas y su efecto fisiológico se conoce en la técnica. El componente oligosacárido puede afectar significativamente (positiva o negativamente) a las propiedades relevantes para la eficacia de una glucoproteína terapéutica incluyendo estabilidad física, resistencia a ataque de proteasas, interacciones con el sistema inmune, farmacocinética y actividad biológica específica. Para la expresión de proteínas glucosiladas, se usan en la técnica habitualmente células hospedadoras de mamífero (Cumming *et al.,* 1991, Glycobiology 1: 115-130, Jenkins *et al.,* 1996, Nature Biotechn 14: 975-981). Los ejemplos incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células de mieloma de ratón NSO y SP2/0. La producción de proteínas glucosiladas de animales transgénicos también se ha publicado (Jenkins *et al*., 1996, mencionado anteriormente). Además, se conocen en la técnica células hospedadoras recombinantes obtenidas por ingeniería genética que expresan de forma heteróloga/ sobreexpresan genes de glucosil transferasa (Bailey, 1991, Science 252: 1668-1675). El documento WO 9954342 (A1) describe métodos para la generación de proteínas glucosiladas usando células hospedadoras que expresan un intervalo de actividad de glucosil transferasa modificadora de glucoproteínas que aumenta los oligosacáridos ligados a N del complejo que portan GIcNAc divisores que se ha indicado que tienen función mejorada.

De acuerdo con una realización de la presente invención, el péptido o complejo peptídico puede acoplarse a una o más moléculas que no son idénticas al péptido o complejo peptídico de acuerdo con la presente invención (restos adicionales), siendo el complejo completo un “conjugado”. Los ejemplos de restos adicionales comprenden, por ejemplo, una o más biomoléculas adicionales, como péptidos o complejos peptídicos, ácidos nucleicos (por ejemplo, oligonucleótidos o

moléculas de ARN, tales como un ARNi) o moléculas orgánicas (pequeñas), restos radiactivos. Estos restos adicionales pueden tener su propia función, por ejemplo, citotoxicidad, actividad terapéutica, actividad inmunosupresora, etc. o pueden ser beneficiosos para el conjugado completo por otra razón (por ejemplo, estabilidad mejorada o reducida del conjugado, etc.). La presente invención abarca péptidos o complejos peptídicos conjugados con uno o más restos adicionales. En el caso de que el péptido o complejo peptídico sea un anticuerpo, derivado de fragmento del mismo, este conjugado es un inmunoconjugado. Se conocen en la técnica ejemplos de inmunoconjugados (véase, por ejemplo el documento WO05/103081), por ejemplo, una o más sustancias quimioterapéuticas, profármacos, citotoxinas, radioisótopos o nucleótidos radiactivos, restos inmunosupresores, oligonucleótidos terapéuticos, ARN inhibidor (ARNi).

De acuerdo con una realización, el péptido o complejo peptídico es un anticuerpo. Los anticuerpos de origen natural son proteínas de plasma globulares (~ 150 kDa) que también se conocen como inmunoglobulinas que comparten una estructura básica. Puesto que tienen cadenas de azúcares añadidas a restos aminoacídicos son glucoproteínas. La unidad funcional básica de cada anticuerpo es un monómero de inmunoglobulina (Ig) (que contiene solamente una unidad Ig); los anticuerpos secretados también pueden ser diméricos con dos unidades de Ig como con IgA, tetraméricos con cuatro unidades de Ig como IgM de pez teleósteo o pentaméricos con cinco unidades de Ig, como IgM de mamífero. En la presente invención, los ejemplos de formatos adecuados incluyen el formato de anticuerpos de origen natural incluyendo isotipos de anticuerpo conocidos como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

El monómero de Ig es una molécula con forma de “Y” que consiste en cuatro cadenas peptídicas; dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas conectadas por enlaces disulfuro entre restos de cisteína. Cada cadena pesada es de aproximadamente 440 aminoácidos de largo; cada cadena ligera es de aproximadamente 220 aminoácidos de largo. Las cadenas pesadas y ligeras contienen cada una enlaces disulfuro intracatenarios que estabilizan su plegamiento. Cada cadena está compuesta de dominios estructurales llamados dominios Ig. Estos dominios contienen aproximadamente 70-110 aminoácidos y se clasifican en diferentes categorías (por ejemplo, variable o V y constante o C) de acuerdo con su tamaño y función. Tienen un plegamiento de inmunoglobulina

característico en el que dos láminas β crean una forma de tipo “sándwich”, que se mantiene unida por interacciones entre cisteínas conservadas y otros aminoácidos cargados.

Existen cinco tipos de cadenas pesadas de Ig de mamífero denominadas α, δ, ε, γ y μ. El tipo de cadena pesada presente define el isotipo del anticuerpo, estas cadenas se encuentran en anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente.

Las cadenas pesadas distintas difieren en tamaño y composición; α y γ contienen aproximadamente 450 aminoácidos y δ aproximadamente 500 aminoácidos, mientras que μ y ε tienen aproximadamente 550 aminoácidos. Cada cadena pesada tiene dos regiones, la región constante (C_H) y la región variable (V_H). En una especie, la región constante es esencialmente idéntica en todos los anticuerpos del mismo isotipo, pero difiere en anticuerpos de diferentes isotipos. Las cadenas pesadas γ, α y δ tienen una región constante compuesta de tres dominios Ig en tándem y una región bisagra para añadir flexibilidad; las cadenas pesadas μ y ε tienen una región constante compuesta de cuatro dominios de inmunoglobulina. La región variable de la cadena pesada difiere en anticuerpos producidos por diferentes linfocitos B, pero es la misma para todos los anticuerpos producidos por un linfocito B sencillo o clon de linfocito B. La región variable de cada cadena pesada es de aproximadamente 110 aminoácidos de largo y se compone de un dominio Ig sencillo.

En mamíferos, existen dos tipos de cadena ligera de inmunoglobulina indicadas por λ y κ. Una cadena ligera tiene dos dominios sucesivos: un dominio constante (CL) y un dominio variable (VL). La longitud aproximada de una cadena ligera es de 211 a 217 aminoácidos. Cada anticuerpo contiene dos cadenas ligeras que son siempre idénticas; solamente un tipo de cadena ligera, κ o λ, está presente por anticuerpo en mamíferos. Otros tipos de cadenas ligeras, tales como la cadena ι, se encuentran en vertebrados inferiores como condrictios y teleósteos.

Además de anticuerpos de origen natural, se han desarrollado formatos de anticuerpo artificiales incluyendo fragmentos de anticuerpo. Algunos de ellos se describen a continuación. Sin embargo, cualquier otro formato de anticuerpo que comprenda o consista en el polipéptido o polipéptidos anteriores y permita la unión específica a integrinas α2 está abarcado también por la presente invención.

Aunque la estructura general de todos los anticuerpos es muy similar, la

propiedad única de un anticuerpo dado se determina por las regiones variables (V), como se ha detallado anteriormente. Más específicamente, los bucles variables, tres en cada una de la cadena ligera (VL) y tres en la pesada (VH) son responsables de unión al antígeno, es decir, de su especificidad de antígeno. Estos bucles se denominan regiones determinantes de complementariedad (CDR). Debido a que las CDR de los dominios tanto VH como VL contribuyen al sitio de unión a antígeno, es la combinación de las cadenas pesada y ligera, y no cada una por sí sola, lo que determina la especificidad de antígeno final.

En consecuencia, el término “anticuerpo”, como se usa en la presente memoria, significa cualquier polipéptido que tenga similitud estructural con un anticuerpo de origen natural y sea capaz de unirse específicamente a integrina $\alpha 2$, determinándose la especificidad de unión por las CDR de SEC ID Nº 3 a 8. Por lo tanto, se pretende que “anticuerpo” se refiera a una estructura derivada de inmunoglobulina con unión específica a integrina $\alpha 2$ incluyendo, pero sin limitación, un anticuerpo completo o de longitud completa, un fragmento de unión a antígeno (un fragmento derivado, física o conceptualmente, de una estructura de anticuerpo), un derivado de cualquiera de los anteriores, una molécula quimérica, una fusión de cualquiera de los anteriores con otro polipéptido o cualquier estructura/composición alternativa que se una selectivamente a integrina $\alpha 2$ y opcionalmente inhiba la función de integrina $\alpha 2$. El anticuerpo puede ser cualquier polipéptido que comprenda al menos un fragmento de unión a antígeno. Los fragmentos de unión a antígeno consisten en al menos el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera, dispuestos de manera que ambos dominios juntos son capaces de unirse al antígeno específico.

Los anticuerpos de “longitud completa” o “completos” se refieren a proteínas que comprenden dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro que comprenden: (1) por lo que respecta a las cadenas pesadas, una región variable y una región constante de cadena pesada que comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3; y (2) por lo que respecta a las cadenas ligeras, una región variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera que comprende un dominio CL. Con respecto al término “anticuerpo completo”, se entiende cualquier anticuerpo que tenga una estructura de dominio global típica de un anticuerpo de origen natural (es decir que comprende una cadena pesada de tres o cuatro dominios constantes y una cadena ligera de un dominio constante así

como los dominios variables respectivos), incluso aunque cada dominio puede comprender modificaciones adicionales, tales como mutaciones, deleciones o inserciones, que no cambian la estructura de dominio global.

Un “fragmento de anticuerpo” también contiene al menos un fragmento de unión a antígeno como se ha definido anteriormente y muestra esencialmente la misma función y especificidad que el anticuerpo completo del que deriva el fragmento. La digestión proteolítica limitada con papaína escinde el prototipo de Ig en tres fragmentos. Dos fragmentos amino terminales idénticos, conteniendo cada uno una cadena L completa y aproximadamente media cadena H, son los fragmentos de unión a antígeno (Fab). El tercer fragmento, similar en tamaño pero que contiene la mitad carboxi terminal de ambas cadenas pesadas con su enlace disulfuro intercatenario, es el fragmento cristalizable (Fc). El Fc contiene carbohidratos, sitios de unión a complemento y de unión a FcR. La digestión con pepsina limitada produce un fragmento F(ab’)2 sencillo que contiene ambos trozos de Fab y la región bisagra, incluyendo el enlace disulfuro intercatenario H-H. F(ab’)2 es divalente para unión a antígenos. El enlace disulfuro de F(ab’)2 puede escindirse para obtener Fab’. Además, las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras pueden fusionarse juntas para formar un fragmento variable de cadena sencilla (scFv).

Como la primera generación de anticuerpos de tamaño completo presentó algunos problemas, muchos de los anticuerpos de segunda generación han comprendido solamente fragmentos del anticuerpo. Los dominios variables (Fv) son los fragmentos más pequeños con un dominio de unión a antígeno intacto consistente en una VL y una VH. Tales fragmentos, solamente con los dominios de unión, pueden generarse por enfoques enzimáticos o expresión de los fragmentos génicos relevantes, por ejemplo, en células bacterianas y eucariotas. Pueden usarse diferentes enfoques, por ejemplo, el fragmento Fv solo o los fragmentos Fab’ que comprenden una de las ramas superiores de la “Y” que incluye el Fv más los primeros dominios constantes. Estos fragmentos se estabilizan habitualmente introduciendo un enlace polipeptídico entre las dos cadenas que da como resultado la producción de un Fv de cadena sencilla (scFv). Como alternativa, pueden usarse fragmentos Fv enlazados por disulfuro (dsFv). Los dominios de unión de fragmentos pueden combinarse con cualquier dominio constante para producir anticuerpos de longitud completa o pueden fusionarse con otras proteínas y

polipéptidos.

Un fragmento de anticuerpo recombinante es el fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). En general, tiene alta afinidad por su antígeno y puede expresarse en una diversidad de hospedadores. Estas y otras propiedades hacen a los fragmentos scFv no solamente aplicables en medicina, sino también con potencial para aplicaciones biotecnológicas. Como se ha detallado anteriormente, en el fragmento scFv los dominios VH y VL se unen con un enlazador peptídico flexible e hidrófilo, que mejora la expresión y la eficacia de plegamiento. Habitualmente se usan enlazadores de aproximadamente 15 aminoácidos, de los que el enlazador $(Gly_4Ser)_3$ se ha usado más frecuentemente. Las moléculas scFv podrían degradarse proteolíticamente fácilmente, dependiendo del enlazador usado. Con el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética estas limitaciones podrían prácticamente superarse mediante investigación centrada en la mejora de función y estabilidad. Un ejemplo es la generación de fragmentos Fv estabilizados por disulfuro (o enlazados por disulfuro) en los que el dímero VH-VL se estabiliza mediante un enlace disulfuro intercatenario. Se introducen cisteínas en la interfaz entre los dominios VL y VH, formando un puente disulfuro, que mantiene los dos dominios juntos.

La disociación de scFv da como resultado scFv monoméricos, que puede formar complejos en dímeros (diacuerpos o $(scFv)_2$), trímeros (triacuerpos) o agregados mayores tales como TandAb y flexicuerpos.

Pueden crearse anticuerpos con dos dominios de unión a través de la unión de dos scFv con un enlace peptídico simple $(scFv)_2$ o a través de la dimerización de dos monómeros (diacuerpos). Los diseños más simples son diacuerpos que tienen dos dominios de unión a antígeno funcionales que pueden ser los mismos, similares (diacuerpos bivalentes) o tener especificidad para distintos antígenos (diacuerpos biespecíficos). Estos anticuerpos biespecíficos permiten, por ejemplo, el reclutamiento de nuevas funciones efectoras (tales como linfocitos T citotóxicos) a las células diana, lo que los hace muy útiles para aplicaciones en medicina.

Recientemente, se han desarrollado formatos de anticuerpo que comprenden cuatro dominios variables de cadenas pesadas y cuatro dominios variables de cadenas ligeras. Los ejemplos de éstos incluyen anticuerpos biespecíficos tetravalentes (TandAbs y Flexibodies, Affimed Therapeutics AG, Heidelberg. Alemania). A diferencia de un diacuerpo biespecífico, un TandAb

biespecífico es un homodímero que consiste en solamente un polipéptido. Los flexicuerpos son una combinación de scFv con un motivo multimérico de diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente con un alto grado de flexibilidad para unir dos moléculas que están bastante distantes entre sí en la superficie celular. Si están presentes más de dos dominios de unión a antígeno funcionales y si tienen especificidad para distintos antígenos, el anticuerpo es multiespecífico. Ciertas moléculas de anticuerpo incluyendo, pero sin limitación, Fv, scFv, moléculas de diacuerpo o anticuerpos de dominio (Domantis) pueden estabilizarse incorporando puentes disulfuro para unir los dominios VH y VL. Pueden producirse anticuerpos biespecíficos usando tecnologías convencionales, métodos específicos de las cuales incluyen producción química o a partir de hibridomas híbridos) y otras tecnologías incluyendo, pero sin limitación, la tecnología BiTE™ (moléculas que poseen regiones de unión a antígeno de diferente especificidad con un enlazador peptídico) e ingeniería genética botón en ojal.

Preferentemente, el anticuerpo puede ser un Fab, un Fab', un F(ab')2, un Fv, un Fv con enlace disulfuro, un scFv, un $(scFv)_2$, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo o un minicuerpo.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos monoespecíficos que son idénticos debido a que se producen por un tipo de célula inmune que son todas clones de una célula parental sencilla. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que al menos una región de una inmunoglobulina de una especie está fusionada con otra región de una inmunoglobulina de otra especie por ingeniería genética para reducir su inmunogenicidad. Por ejemplo pueden fusionarse regiones V_L y V_H murinas con la parte restante de una inmunoglobulina humana. Un tipo particular de anticuerpos quiméricos es un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos humanizados se producen uniendo el ADN que codifica las CDR de un anticuerpo no humano con ADN que produce anticuerpos humanos (o viceversa). La construcción de ADN resultante puede usarse después para expresar y producir anticuerpos que habitualmente no son tan inmunogénicos como el anticuerpo parenteral no humano o como un anticuerpo quimérico, puesto que solamente las CDR son no humanas.

De acuerdo con una realización de los diferentes aspectos de las presentes

invenciones, pueden usarse anticuerpos humanos o humanizados o fragmentos de los mismos. En consecuencia, el péptido o complejo peptídico puede comprender un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en: un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgG1 humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgE humana y un dominio constante de IgA humana. En el contexto de la invención, el anticuerpo anti-integrina $\alpha 2$ se ha humanizado usando un método previamente descrito en el documento WO2009/032661, pero puede usarse cualquier método de humanización adecuado conocido en la técnica.

Como se ha detallado anteriormente, la CDR también puede ser una variante funcionalmente activa de cualquiera de las CDR especificadas en las reivindicaciones. En una realización la variante funcionalmente activa es un fragmento funcionalmente activo que consiste en 90 % o más de una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEC ID Nº 3 a 8. Como alternativa, la variante funcionalmente activa es una variante funcionalmente activa que tiene 70 % o más, preferentemente 80 % o más, más preferentemente 90 % o 95 % o más identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEC ID Nº 3 a 8, particularmente cuando la variante funcionalmente activa deriva de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEC ID Nº 3 a 8 por medio de una o más sustituciones de aminoácidos conservativas (véase posteriormente).

En una realización de los diferentes aspectos de la presente invención, el péptido o complejo peptídico comprende la secuencia de aminoácidos de:

- SEC ID Nº 1, o una variante funcionalmente activa de la misma,
- SEC ID Nº 2 o una variante funcionalmente activa de la misma,
- SEC ID Nº 9, o una variante funcionalmente activa de la misma,
- SEC ID Nº 10, o una variante funcionalmente activa de la misma, y/o
- SEC ID Nº 11, o una variante funcionalmente activa de la misma.

Como alternativa, el péptido o complejo peptídico consiste en la secuencia de aminoácidos de:

- SEC ID Nº 9, o una variante funcionalmente activa de la misma,
- SEC ID Nº 10, o una variante funcionalmente activa de la misma, y
- opcionalmente 50 restos aminoacídicos adicionales o de 1 a 40, 1 a 30, 1 a 25, 1 a 15, 1 a 10, 1 ó 2, 3, 4 ó 5 restos aminoacídicos adicionales.

Como alternativa, el péptido o complejo peptídico consiste en la secuencia de aminoácidos de:

- SEC ID Nº 9, o una variante funcionalmente activa de la misma,
- SEC ID Nº 11, o una variante funcionalmente activa de la misma, y
- opcionalmente 50 restos aminoacídicos adicionales o de 1 a 40, 1 a 30, 1 a 25, 1 a 15, 1 a 10, 1 ó 2, 3, 4 ó 5 restos aminoacídicos adicionales

La variante funcionalmente activa puede ser un fragmento caracterizado por estar derivado de cualquiera de las secuencias de SEC ID Nº 1, 2, 9, 10 u 11 por una o más deleciones. La deleción o deleciones pueden ser C-terminales, N-terminales y/o internas. El fragmento puede, por ejemplo, obtenerse por 10 o menos deleciones, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10, o por 5 o menos, tales como 1, 2, 3, 4 ó 5, por 3 o menos, tales como 1, 2 ó 3, por dos o menos, tales como 1 ó 2 o por una deleción. El fragmento funcionalmente activo de la invención se caracteriza porque tiene una actividad biológica similar a la presentada por la proteína completa, incluyendo la capacidad de unirse a integrina $\alpha 2$ y/o integrina $\alpha 2\beta 1$ y opcionalmente inhibir integrina $\alpha 2$ y/o $\alpha 2\beta 1$. El fragmento de un antígeno es funcionalmente activo en el contexto de la presente invención si la actividad del fragmento equivale a 10 % o más, preferentemente 25 % o más, más preferentemente 50 % o más, más preferentemente 70 % o más, más preferentemente 80 % o más, más preferentemente 90 % o más, más preferentemente 95 % o más, más preferentemente 99 % o más de la actividad de la secuencia de aminoácidos sin alteración de la secuencia. Se proporcionan métodos adecuados para determinar la actividad de unión a integrina $\alpha 2\beta 1$ en los ejemplos, particularmente Ejemplo 1 D.

La variante puede caracterizarse por estar derivada de cualquiera de las secuencias de SEC ID Nº 1, 2, 9, 10 u 11 por una o más modificaciones de aminoácidos incluyendo deleciones, adiciones y/o sustituciones. La modificación o modificaciones pueden ser C-terminales, N-terminales y/o internas. El fragmento puede obtenerse por 10 o menos deleciones, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10, por 5 o menos, tal como 1, 2, 3, 4 ó 5, por tres o menos, tal como 1, 2 ó 3, por dos o menos, tal como 1 ó 2 o por una deleción. La variante funcionalmente activa de la invención se caracteriza porque tiene una actividad biológica similar a la presentada por la proteína completa, incluyendo la capacidad para unirse a integrina $\alpha 2$ y/o integrina $\alpha 2\beta 1$ y opcionalmente inhibir $\alpha 2$ y/o integrina $\alpha 2\beta 1$. La

variante es funcionalmente activa en el contexto de la presente invención si la actividad de la variante equivale a 10 % o más, más preferentemente 25 % o más, más preferentemente 50 % o más, incluso más preferentemente 70 % o más, aún más preferentemente 80 % o más, especialmente el 90 % o más, particularmente 95 % o más, más preferentemente 99 % o más de la actividad de la secuencia de aminoácidos sin alteración de la secuencia.

Los aminoácidos adicionales de (ix, x u xi) pueden localizarse en C-terminal, N-terminal y/o de forma interna. De acuerdo con una realización, hay 50 o menos adiciones, 40 o menos, 30 o menos, 20 o menos adiciones o 10 o menos adiciones tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10, 5 o menos adiciones, tales como 1, 2, 3, 4 ó 5, 3 o menos adiciones, tales como 1, 2 ó 3, 2 o menos, tales como 1 ó 2, o solamente una adición.

El resto o restos aminoacídicos adicionales puede ser cualquier aminoácido, que puede ser un aminoácido L y/o D, de origen natural y distinto. Preferentemente, el aminoácido es cualquier aminoácido de origen natural tal como alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano o tirosina.

El aminoácido puede ser también un aminoácido modificado o poco habitual. Los ejemplos de éstos son ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, β-alanina, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, ácido 2,4-diaminobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicinem N-etilasparagina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, 6-N-metil lisina, N-metilvalina, norvalina, norleucina u ornitina. Adicionalmente, el aminoácido puede estar sujeto a modificaciones tales como modificaciones postraduccionales. Los ejemplos de modificaciones incluyen acetilación, amidación, bloqueo, formilación, hidroxilación de ácido γ-carboxiglutámico, glucosilación, metilación, fosforilación y sulfatación. Si está presente más de un resto aminoacídico heterólogo o adicional en el péptido, los restos aminoacídicos pueden ser los mismos o diferentes entre sí.

El porcentaje de identidad de secuencia puede determinarse por ejemplo por alineamiento de secuencia. Se conocen bien en la técnica métodos de

alineamiento de secuencias para comparación. Se han descrito diversos programas y algoritmos de alineamiento por ejemplo, en Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981 o Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. US. A. 85: 2444, 1988.

La herramienta de búsqueda de alineamiento local básica de NCBI (BLAST) (Altschul *et al.,* J. Mol Biol. 215: 403-410, 1990) está disponible de varias fuentes, incluyendo el Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI, Bethesda, MD) y en Internet, para su uso en relación con los programas de análisis de secuencia blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Las variantes de cualquiera de las secuencias de SEC ID Nº 1 a 8 se caracterizan típicamente usando el NCBI Blast 2.0, blastp con huecos ajustado a parámetros por defecto. Para comparaciones de secuencias de aminoácidos de al menos 30 aminoácidos, se emplea la función de 2 secuencias de Blast usando la matriz por defecto BLOSUM62 ajustada a parámetros por defecto (coste de existencia de hueco de 11 y un coste de hueco por resto de 1). Cuando se alinean péptidos cortos (menos de aproximadamente 30 aminoácidos), el alineamiento se realiza usando la función de dos secuencias de Blast, empleando la matriz PAM30 ajustada a parámetros por defecto (hueco abierto 9, penalizaciones de extensión de hueco 1). Se describen métodos para determinar la identidad de secuencia sobre ventanas tan cortas como 15 aminoácidos o menos en el sitio web que se mantiene por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica en Bethesda, Maryland.

En otra realización de los diferentes aspectos de la presente invención, la variante funcionalmente activa como se ha definido anteriormente, deriva de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEC ID Nº 1, 2, 9, 10 u 11 de cualquiera de dichas secuencias por una o más sustituciones de aminoácidos conservativas.

Las sustituciones de aminoácidos conservativas, como apreciará un experto habitual en la materia, son sustituciones que reemplazan un resto aminoacídico con uno que transmite características funcionales y/o químicas similares o mejores (para el fin pretendido). Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos conservativas son con frecuencia unas en las que el resto aminoacídico se remplaza con un resto aminoacídico que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido

aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas β (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Tales modificaciones no se diseñan para reducir significativamente o alterar la unión de características de inhibición funcionales del polipéptido (complejo), aunque pueden mejorar tales propiedades. El fin para realizar una sustitución no es significativo y puede incluir, pero no está limitado de ningún modo a, reemplazar un resto con uno mejor capaz de mantener o potenciar la estructura de la molécula, la carga o hidrofobicidad de la molécula o el tamaño de la molécula. Por ejemplo, puede desearse simplemente sustituir un resto menos deseado con uno de la misma polaridad o carga. Tales modificaciones pueden introducirse por técnicas convencionales conocidas en la materia, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Un medio específico por el que los expertos en la materia consiguen sustituciones de aminoácidos conservativas es mutagénesis de exploración de alanina. Los polipéptidos alterados se ensayan después con respecto a actuación conservada o mejorada usando ensayos funcionales disponibles en la técnica o descritos en los ejemplos. En una realización más preferida de la presente invención, el número de sustituciones conservativas en cualquiera de las secuencias de SEC ID Nº 1, 2, 9, 10 ó 20 es de 20 o menos tal como, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 u 11, preferentemente 10 o menos, tal como 10, 9, 8, 7 ó 6, especialmente 5 o menos, tal como 5, 4, 3 particularmente 2 ó 1.

En otra realización más de los diferentes aspectos de la presente invención, el péptido o complejo peptídico comprende una o más variantes funcionalmente activas,

- en las que la variante funcionalmente activa de LDR1 comprende la mutación en la posición de aminoácido 11, particularmente 11Asn $\rightarrow$ Gln;
- en las que la variante funcionalmente activa de HDR2 comprende la mutación en la posición de aminoácido 6, particularmente 6Asp $\rightarrow$ Glu;
- en las que la variante funcionalmente activa de SEC ID Nº 1 comprende una o más mutaciones en las posiciones de aminoácidos 9, 12, 15, 22, 34, 46, 47, 80, 83, 85, 87 y/o 89, seleccionada preferentemente del grupo que consiste en

9Ala→Ser, 12Ala→Ser, 15Leu→Val, 15Leu→Pro, 22Ser→Thr, 34Asn→Gln, 46Gln→Lys, 47Ala→Pro, 80Asp→Asn, 83Glu→Gln, 85Asp→Glu, 87Ala→Thr y 89Thr→Asn o en las que la variante funcionalmente activa de SEC ID Nº 1 comprende las siguientes mutaciones (LC1), es decir, 9Ala→Ser o 15Leu→Val o 46Gln→Lys o 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 15Leu→Val o 9Ala→Ser y 46Gln→Lys o 9Ala→Ser y 83Glu→Gln o 15Leu→Val y 46Gln→Lys o 15Leu→Val y 83Glu→Gln o 46Gln→Lys y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 46Gln→Lys o 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 46Gln→Lys y 83Glu→Gln o 15Leu→Val y 46Gln→Lys y 83Glu→Gln o LC1 de tabla 5: 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 46Gln→Lys y 83Glu→Gln, o en las que la variante funcionalmente activa de SEC ID Nº 1 comprende las siguientes mutaciones (LC2), es decir, 9Ala→Ser o 15Leu→Val o 34Asn→Gln o 46Gln→Lys o 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 15Leu→Val o 9Ala→Ser y 34Asn→Gln o 9Ala→Ser y 46Gln→Lys o 9Ala→Ser y 83Glu→Gln o 15Leu→Val y 34Asn→Gln o 15Leu→Val y 46Gln→Lys o 15Leu→Val y 83Glu→Gln o 34Asn→Gln y 46Gln→Lys o 34Asn→Gln y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 34Asn→Gln o 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 46Gln→Lys o 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 34Asn→Gln y 46Gln→Lys o 9Ala→Ser y 34Asn→Gln y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 46Gln→Lys y 83Glu→Gln o 15Leu→Val y 34Asn→Gln y 46Gln→Lys o 15Leu→Val y 34Asn→Gln y 83Glu→Gln o 15Leu→Val y 46Gln→Lys y 83Glu→Gln o 34Asn→Gln y 46Gln→Lys y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 34Asn→Gln y 46Gln→Lys o 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 34Asn→Gln y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 46Gln→Lys y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 34Asn→Gln y 46Gln→Lys y 83Glu→Gln o 15Leu→Val y 34Asn→Gln y 46Gln→Lys y 83Glu→Gln o LC2 of table 5: 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 34Asn→Gln y 46Gln→Lys y 83Glu→Gln, o en las que la variante funcionalmente activa de SEC ID Nº 1 comprende las siguientes mutaciones (LC3), es decir, 9Ala→Ser o 12Ala→Ser o 15Leu→Val o 83Glu→Gln o 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser o 9Ala→Ser y 15Leu→Val o 9Ala→Ser y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 85Asp→Glu o 12Ala→Ser y 15Leu→Val o 12Ala→Ser y 83Glu→Gln o 12Ala→Ser y 85Asp→Glu o 15Leu→Val y 83Glu→Gln o 15Leu→Val y 85Asp→Glu o 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 15Leu→Val o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 85Asp→Glu o

9Ala→Ser y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o 12Ala→Ser y 15Leu→Val y 83Glu→Gln o 12Ala→Ser y 15Leu→Val y 85Asp→Glu o 12Ala→Ser y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o 15Leu→Val y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 15Leu→Val y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 15Leu→Val y 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o 12Ala→Ser y 15Leu→Val y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o (LC3) de acuerdo con la Tabla 5: 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 15Leu→Val y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o en las que la variante funcionalmente activa de SEC ID Nº 1 comprende las siguientes mutaciones (LC4), es decir, 9Ala→Ser o 12Ala→Ser o 15Leu→Val o 34Asn→Gln o 83Glu→Gln o 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser o 9Ala→Ser y 15Leu→Val o 9Ala→Ser y 34Asn→Gln o 9Ala→Ser y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 85Asp→Glu o 12Ala→Ser y 15Leu→Val o 12Ala→Ser y 34Asn→Gln o 12Ala→Ser y 83Glu→Gln o 12Ala→Ser y 85Asp→Glu o 15Leu→Val y 34Asn→Gln o 15Leu→Val y 83Glu→Gln o 15Leu→Val y 85Asp→Glu o 34Asn→Gln y 83Glu→Gln o 34Asn→Gln y 85Asp→Glu o 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 15Leu→Val o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 34Asn→Gln o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 34Asn→Gln o 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 34Asn→Gln y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 34Asn→Gln y 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o 12Ala→Ser y 15Leu→Val y 34Asn→Gln o 12Ala→Ser y 15Leu→Val y 83Glu→Gln o 12Ala→Ser y 15Leu→Val y 85Asp→Glu o 12Ala→Ser y 34Asn→Gln y 83Glu→Gln o 12Ala→Ser y 34Asn→Gln y 85Asp→Glu o 12Ala→Ser y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o 15Leu→Val y 34Asn→Gln y 83Glu→Gln o 15Leu→Val y 34Asn→Gln y 85Asp→Glu o 15Leu→Val y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o 34Asn→Gln y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 15Leu→Val y 34Asn→Gln o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 15Leu→Val y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 15Leu→Val y 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 34Asn→Gln y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 34Asn→Gln y 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 34Asn→Gln y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 34Asn→Gln y 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 34Asn→Gln y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o 12Ala→Ser y

15Leu→Val y 34Asn→Gln y 83Glu→Gln o 12Ala→Ser y 15Leu→Val y 34Asn→Gln y 85Asp→Glu o 12Ala→Ser y 15Leu→Val y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o 12Ala→Ser y 34Asn→Gln y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 15Leu→Val y 34Asn→Gln y 83Glu→Gln o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 15Leu→Val y 34Asn→Gln y 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 34Asn→Gln y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o 9Ala→Ser y 15Leu→Val y 34Asn→Gln y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o 12Ala→Ser y 15Leu→Val y 34Asn→Gln y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu o (LC4) de acuerdo con la Tabla 5: 9Ala→Ser y 12Ala→Ser y 15Leu→Val y 34Asn→Gln y 83Glu→Gln y 85Asp→Glu, o en las que la variante funcionalmente activa de SEC ID Nº1 comprende las siguientes mutaciones (LC5), es decir, 15Leu→Pro, 22Ser→Thr, 47Ala→Pro, 80Asp→Asn, 87Ala→Thr, 89Thr→Asn o 15Leu→Pro y 22Ser→Thr o 15Leu→Pro y 47Ala→Pro o 15Leu→Pro y 80Asp→Asn o 15Leu→Pro y 87Ala→Thr o 15Leu→Pro y 89Thr→Asn o 22Ser→Thr y 47Ala→Pro o 22Ser→Thr y 80Asp→Asn o 22Ser→Thr y 87Ala→Thr o 22Ser→Thr y 89Thr→Asn o 47Ala→Pro y 80Asp→Asn o 47Ala→Pro y 87Ala→Thr o 47Ala→Pro y 89Thr→Asn o 80Asp→Asn y 87Ala→Thr o 80Asp→Asn y 89Thr→Asn o 87Ala→Thr y 89Thr→Asn o 15Leu→Pro y 22Ser→Thr y 47Ala→Pro o 15Leu→Pro y 22Ser→Thr y 80Asp→Asn o 15Leu→Pro y 22Ser→Thr y 87Ala→Thr o 15 Leu→Pro y 22Ser→Thr y 89Thr→Asn o 15Leu→Pro y 47Ala→Pro y 80Asp→Asn o 15Leu→Pro y 47Ala→Pro y 87Ala→Thr o 15Leu→Pro y 47Ala→Pro y 89Thr→Asn o 15Leu→Pro y 80Asp→Asn y 87Ala→Thr o 15Leu→Pro y 80Asp→Asn y 89Thr→Asn o 15Leu→Pro y 87Ala→Thr y 89Thr→Asn o 22Ser→Thr y 47Ala→Pro y 80Asp→Asn o 22Ser→Thr y 47Ala→Pro y 87Ala→Thr o 22Ser→Thr y 47Ala→Pro y 89Thr→Asn o 22Ser→Thr y 80Asp→Asn y 87Ala→Thr o 22Ser→Thr y 80Asp→Asn y 89Thr→Asn o 22Ser→Thr y 87Ala→Thr y 89Thr→Asn o 47Ala→Pro y 80Asp→Asn y 87Ala→Thr o 47Ala→Pro y 80Asp→Asn y 89Thr→Asn o 47Ala→Pro y 87Ala→Thr y 89Thr→Asn o 80Asp→Asn y 87Ala→Thr y 89Thr→Asn o 15Leu→Pro y 22Ser→Thr y 47Ala→Pro y 80Asp→Asn o 15Leu→Pro y 22Ser→Thr y 47Ala→Pro y 87Ala→Thr o 15Leu→Pro y 22Ser→Thr y 47Ala→Pro y 89Thr→Asn o 15Leu→Pro y 22Ser→Thr y 80Asp→Asn y 87Ala→Thr o 15Leu→Pro y 22Ser→Thr y 80Asp→Asn y 89Thr→Asn o 15Leu→Pro y 22Ser→Thr y 87Ala→Thr y 89Thr→Asn o 15Leu→Pro y 47Ala→Pro y 80Asp→Asn y

87Ala→Thr o 15Leu→Pro y 47Ala→Pro y 80Asp→Asn y 89Thr→Asn o 15Leu→Pro y 47Ala→Pro y 87Ala→Thr y 89Thr→Asn o 15Leu→Pro y 80Asp→Asn y 87Ala→Thr y 89Thr→Asn o 22Ser→Thr y 47Ala→Pro y 80Asp→Asn y 87Ala→Thr o 22Ser→Thr y 47Ala→Pro y 80Asp→Asn y 89Thr→Asn o 22Ser→Thr y 47Ala→Pro y 87Ala→Thr y 89Thr→Asn o 22Ser→Thr y 80Asp→Asn y 87Ala→Thr y 89Thr→Asn o 47Ala→Pro y 80Asp→Asn y 87Ala→Thr y 89Thr→Asn o 15Leu→Pro y 22Ser→Thr y 47Ala→Pro y 80Asp→Asn y 87Ala→Thr o 15Leu→Pro y 22Ser→Thr y 47Ala→Pro y 80Asp→Asn y 89Thr→Asn o 15Leu→Pro y 22Ser→Thr y 47Ala→Pro y 87Ala→Thr y 89Thr→Asn o 15Leu→Pro y 22Ser→Thr y 80Asp→Asn y 87Ala→Thr y 89Thr→Asn o 15Leu→Pro y 47Ala→Pro y 80Asp→Asn y 87Ala→Thr y 89Thr→Asn o 22Ser→Thr y 47Ala→Pro y 80Asp→Asn y 87Ala→Thr y 89Thr→Asn o (LC5) de acuerdo con la Tabla 5: 15Leu→Pro y 22Ser→Thr y 47Ala→Pro y 80Asp→Asn y 87Ala→Thr y 89Thr→Asn y/o en las que la variante funcionalmente activa de SEC ID Nº 2 comprende una o más mutaciones en las posiciones de aminoácidos 5, 7, 11, 12, 17, 20, 38, 40, 43, 55, 61, 65, 66, 67, 76, 81, 82, 87, 91, 93, 112, 113 y/o 116, seleccionadas particularmente del grupo que consiste en 5His→Val, 7Pro→Ser, 11Leu→Val, 12Val→Lys, 17Pro→Ser, 20Leu→Val, 38Lys→Arg, 40Arg→Ala, 43Arg→Gln, 55Asp→Glu, 61Asn→Ala, 65Lys→Gln, 66Asp→Gly, 67Lys→Arg, 76Ser→Thr, 81Ile→Met, 82Gln→Glu, 87Thr→Arg, 91Ser→Thr, 93Val→Lys, 112Thr→Leu, 113Leu→Val y 116Ser→Val o en las que la variante funcionalmente activa de SEC ID Nº 2 comprende las siguientes mutaciones (HC1), es decir, 43Arg→Gln o 67Lys→Arg o 116Ser→Val o 43Arg→Gln y 67Lys→Arg o 43Arg→Gln y 116Ser→Val o 67Lys→Arg y 116Ser→Val o (HC1) de acuerdo con la tabla 6: 43Arg→Gln y 67Lys→Arg y 116Ser→Val, o en las que la variante funcionalmente activa de SEC ID Nº 2 comprende las siguientes mutaciones (HC2), es decir, 43Arg→Gln o 55Asp→Glu o 67Lys→Arg o 116Ser→Val o 43Arg→Gln y 55Asp→Glu o 43Arg→Gln y 67Lys→Arg o 43Arg→Gln y 116Ser→Val o 55Asp→Glu y 67Lys→Arg o 55Asp→Glu y 116Ser→Val o 67Lys→Arg y 116Ser→Val o 43Arg→Gln y 55Asp→Glu y 67Lys→Arg o 43Arg→Gln y 55Asp→Glu y 116Ser→Val o 43Arg→Gln y 67Lys→Arg y 116Ser→Val o 55Asp→Glu y 67Lys→Arg y 116Ser→Val o (HC2) de acuerdo con la Tabla 6:

43Arg→Gln y 55Asp→Glu y 67Lys→Arg y 116Ser→Val o en las que la variante funcionalmente activa de SEC ID Nº 2 comprende las siguientes mutaciones (HC3), es decir, 17Pro→Ser o 116Ser→Val o (HC3) de acuerdo con la Tabla 6: 17Pro→Ser y 116Ser→Val, o en las que la variante funcionalmente activa de SEC ID Nº 2 comprende las siguientes mutaciones (HC4), es decir: 17Pro→Ser o 93Val→Lys o 116Ser→Val o 17Pro→Ser y 93Val→Lys o 17Pro→Ser y 116Ser→Val o 93Val→Lys y 116Ser→Val o (HC4) de acuerdo con la Tabla 6: 17Pro→Ser y 93Val→Lys y 116Ser→Val o en las que la variante funcionalmente activa de SEC ID Nº 2 comprende las siguientes mutaciones (HC5), es decir: 17Pro→Ser o 55Asp→Glu o 116Ser→Val o 17Pro→Ser y 55Asp→Glu o 17Pro→Ser y 116Ser→Val o 55Asp→Glu y 116Ser→Val o (HC5) de acuerdo con la Tabla 6: 17Pro→Ser y 55Asp→Glu y 116Ser→Val o en las que la variante funcionalmente activa de SEC ID Nº 2 comprende las siguientes mutaciones (HC6), es decir: 12Val→Lys o 55Asp→Glu o 93Val→Lys o 116Ser→Val o 12Val→Lys y 55Asp→Glu o 12Val→Lys y 93Val→Lys o 12Val→Lys y 116Ser→Val o 55Asp→Glu y 93Val→Lys o 55Asp→Glu y 116Ser→Val o 93Val→Lys y 116Ser→Val o 12Val→Lys y 55Asp→Glu y 93Val→Lys o 12Val→Lys y 55Asp→Glu y 116Ser→Val o 12Val→Lys y 93Val→Lys y 116Ser→Val o 55Asp→Glu y 93Val→Lys y 116Ser→Val o (HC6) de acuerdo con la Tabla 6: 12Val→Lys y 55Asp→Glu y 93Val→Lys y 116Ser→Val o en las que la variante funcionalmente activa de SEC ID Nº 2 comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o todas de las siguientes mutaciones (HC6) 5His→Val, 7Pro→Ser, 11Leu→Val, 12Val→Lys, 17Pro→Ser, 20Leu→Val, 38Lys→Arg, 40Arg→Ala, 43Arg→Gln, 61Asn→Ala, 65Lys→Gln, 66Asp→Gly, 67Lys→Arg, 76Ser→Thr, 81Ile→Met, 82Gln→Glu, 87Thr→Arg, 91Ser→Thr, 112Thr→Leu, 113Leu→Val.

Las posiciones y mutaciones se han introducido basándose en la consideración descrita en los ejemplos en el contexto de las Tablas 4, 5 y 6. Puede haber solamente una mutación o una combinación de mutaciones, particularmente cualquiera de las combinaciones dadas en las Tablas 4, 5 y 6. Además, el péptido o complejo peptídico puede comprender una o más de las mutaciones de una de las cadenas ligeras variantes como se ha enumerado anteriormente junto con una o más de las cadenas pesadas variantes como se ha numerado anteriormente, por ejemplo, comprenden o consisten en una de las siguientes combinaciones de

mutaciones/variantes funcionales: LC1 y HC1, HC2 y LC1, LC1 y HC3, LC1 y HC4, HC5 y LC1 y, LC1 y HC6, LC1 y HC7, LC2 y HC1, LC2 y HC2, LC2 y HC3, LC2 y HC4, LC2 y HC5, LC2 y HC6, LC2 y HC7, LC3 y HC1, HC2 LC3 y, LC3 y HC3, LC3 y HC4, LC3 y HC5, LC3 y HC6, LC3 y HC7, LC4 y HC1, HC2 y LC4, LC4 y HC3, LC4 y HC4, LC4 y HC5, LC4 y HC6, LC4 y HC7, LC5 y HC1, HC2 y LC5, LC5 y HC3, HC4 y LC5, y LC5 y HC5, LC5 y HC6, LC5 y HC7.

Adicionalmente, puede ser deseable, añadir un marcador por ejemplo para la detección o purificación del péptido o complejo peptídico de la invención. Los marcadores adecuados incluyen sin limitación una etiqueta (por ejemplo, etiqueta 6 His (o HexaHis), 7 His, 8 His, GlyGlyGlyGlySer, etiqueta $(GlyGlyGlyGlySer)_2$ Strep, etiqueta HA, etiqueta c-myc o etiqueta de glutatión S-transferasa (GST)), marcador de fluorescencia (por ejemplo, FITC, fluoresceína, rodamina, colorantes de Cy o Alexa), marca enzimática (por ejemplo, penicilinasa, peroxidasa de rábano rusticano y fosfatasa alcalina), un radiomarcador (por ejemplo, ^{3}H, ^{32}P, ^{35}S, ^{125}I o ^{14}C). Adicionalmente, el polipéptido (complejo) puede añadirse a un soporte, particularmente un soporte sólido tal como un serie, perla (por ejemplo, de vidrio o magnética), una fibra, una película, etc. El experto en la materia podrá adaptar la molécula de unión que comprende el polipéptido o complejo polipeptídico de la presente invención y un componente adicional al uso pretendido seleccionando un componente adicional adecuado.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, el péptido o complejo peptídico muestra una o más de las siguientes características A-E (es decir, A, B o C o D o E o A y B o A, C y D o A y A y E o B y C o B y D o B y E o C y D o C y E o A y B y C o A y B y D o A y B y D o A y B y E y A y C y D A y C y E o A y D y E o B y C y D o B y C y E o B y D y E o C A y B y C y D o A y B y C y E o A y ya D y E o B y C y D y E o A y B y C y E:

A) constantes de unión cinética (según se determine por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, por Biacore) de acuerdo con los datos proporcionados en la Tabla 11.

B) una masa molecular para la cadena ligera como sigue: 23,73 + / -0,05 kDa o 23,73 kDa (LC1) o de 23,74 + / -0,05 kDa o 23,7 kDa (LC2) o 23,75 + / -0,05 kDa o 23,8 kDa (LC3) o de 23,77 + / -0,05 kDa o de 23,77 kDa (LC4), o de 23,79 + / -0,05 kDa o 23,79 kDa (LC5) de 50,31 + / -0,05 kDa y/o una masa molecular para la cadena pesada como sigue: 50,31 kDa (HC1) o de 50,33 + / -0,05 kDa o de 50,33

kDa (HC2) o de 50,30 + / - 0,05 kDa o de 50,30 kDa (HC3) o de 50,33 + / - 0,05 kDa o de 50,33 kDa (HC4) o de 50,32 + / - 0,05 kDa o de 50,32 kDa (HC5) o de 50,35 + / - 0,05 kDa o de 50,35 kDa (HC6) o de 50,19 + / - 0,05 kDa o de 50,19 kDa (HC7),

C) inhibición de unión de plaquetas humanas lavadas a colágeno con un valor de CI50 en μg/ml de ≤0,1, ≤0,09, ≤0,08, ≤0,07, ≤0,06, ≤0,05, ≤0,04, ≤0,03, ≤0,02 o ≤0,01 según se determina en condiciones estáticas,

D) inhibición de la unión de plaquetas humanas de plasma rico en plaquetas a colágeno con una CI50 en μg/ml de <0,3, <0,2, <0,1, <0,15, <0,14 o <0,13 según se determina en condiciones estáticas,

E) un porcentaje de agregación según se determina por cromatografía de exclusión por tamaño de ≤10, ≤9, ≤8, ≤7, ≤6, ≤5, ≤4, ≤3, ≤2,5, ≤2, ≤1,5, ≤1 o ≤0,5 %.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a uno o más ácidos nucleicos que codifican el péptido o complejo peptídico de acuerdo con la presente invención.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden estar en forma de ARN, tal como ARNm o ARNc, o en forma de ADN, incluyendo, por ejemplo, ADNc y ADN genómico, por ejemplo obtenido por clonación o producido por técnicas de síntesis química o por una combinación de las mismas. El ADN puede ser tricatenario, bicatenario o monocatenario. El ADN monocatenario puede ser la hebra codificante, también conocida como la hebra sentido, o puede ser la hebra no codificante, también denominada la hebra anti-sentido. La molécula de ácido nucleico como se usa en la presente memoria también se refiere a, entre otros, ADN mono y bicatenario, ADN que es una mezcla de ARN mono y bicatenario y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más típicamente, bicatenarias o tricatenarias o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, la molécula de ácido nucleico como se usa en la presente memoria se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN.

Adicionalmente, el ácido nucleico puede contener una o más bases modificadas. Tales ácidos nucleicos pueden también contener modificaciones por ejemplo, en la cadena principal de ribosa-fosfato para aumentar la estabilidad y semivida de tales moléculas en ambientes fisiológicos. Por lo tanto, los ADN o ARN

con cadenas principales modificadas para estabilidad o por otras razones son “molécula de ácido nucleico” como se pretende ese elemento en la presente memoria. Además, los ADN o ARN que comprenden bases poco habituales, tales como inosina o bases modificadas, tales como bases tritiladas, por nombrar sólo dos ejemplos, son moléculas de ácido nucleico dentro del contexto de la presente invención. Se apreciará se ha realizado una gran diversidad de modificaciones a ADN y ARN que sirven muchos fines útiles conocidos por los expertos en la materia. La expresión molécula de ácido nucleico como se emplea en la presente memoria abarca tales formas modificadas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente de la molécula de ácido nucleico, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo células sencillas y complejas, entre otros. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de nucleótidos que no afecten al polipéptido codificado por el ácido nucleico y de este modo cualquier molécula de ácido nucleico que codifique un antígeno o fragmento o variante funcionalmente activa del mismo como se ha definido anteriormente está abarcada por la presente invención.

Además, cualquiera de las moléculas de ácido nucleico que codifican uno o más polipéptidos de la invención incluyendo fragmentos o variantes funcionalmente activas de los mismos puede ligarse funcionalmente, usando técnicas convencionales tales como técnicas de clonación convencionales, con cualquier secuencia reguladora deseada, secuencia líder, secuencia de marcador heteróloga o una secuencia codificante heteróloga para crear una proteína de fusión.

El ácido nucleico de la invención puede formarse originalmente *in vitro* o en una célula en cultivo, en general, por la manipulación de ácidos nucleicos por endonucleasas, exonucleasas, polimerasas, ligasas y/o recombinasas u otros métodos conocidos por el facultativo experto en la materia para producir los ácidos nucleicos.

En otra realización de los diferentes aspectos de la presente invención, el ácido nucleico o los ácidos nucleicos se localizan en un vector. Un vector puede incluir adicionalmente secuencias de ácidos nucleico que le permiten replicar en la célula hospedadora, tal como un origen de replicación, uno o más genes terapéuticos y/o genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica tales como elementos reguladores que dirigen la transcripción, traducción y/o secreción de la proteína codificada. El vector puede

usarse para transducir, transformar o infectar una célula, causando de este modo que la célula exprese ácidos nucleicos y/o proteínas distintas de las nativas a la célula. El vector opcionalmente incluye materiales para ayudar a conseguir la entrada del ácido nucleico en la célula, tales como una partícula viral, liposoma, recubrimiento de proteína o similares. Se conocen en la técnica numerosos tipos de vectores de expresión apropiados para expresión proteica, por técnicas de biología molecular convencionales. Tales vectores se seleccionan entre tipos de vector convencionales incluyendo insectos, por ejemplo, expresión por baculovirus, o levaduras, sistemas de expresión fúngicos, bacterianos o virales. Otros vectores de expresión apropiados de los que se conocen numerosos tipos en la técnica, también pueden usarse para este fin. Se conocen bien métodos para obtener tales vectores de expresión (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.,* Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1989)). En una realización, el vector es un vector viral. Los vectores virales incluyen, pero sin limitación, vectores retrovirales y adenovirales.

Las células o líneas celulares hospedadoras adecuadas para la transfección por este método incluyen células bacterianas. Por ejemplo, las diversas cepas de *E. coli* se conocen bien como células hospedadoras en el campo de la biotecnología. También pueden emplearse diversas cepas de *B. subtilis, Pseudomonas, Streptomyces* y otros bacilos y similares en el presente método. También están disponibles muchas cepas de células de levadura conocidas por los expertos en la materia como células hospedadoras para expresión de los péptidos de la presente invención. También pueden emplearse otras células fúngicas o células de insecto tales como *Spodoptera frugipedera* (Sf9) como sistemas de expresión. Como alternativa, pueden usarse células de mamífero, tales como células 293 humanas, células de ovario de hámster chino (CHO), la línea celular COS-1 de mono o las células 3T3 murinas derivadas de ratones Swiss, BALB/c o NIH. Se conocen en la técnica otras células hospedadoras adecuadas más, así como métodos para transfección, cultivo, amplificación, exploración, producción y purificación.

En una realización de los diferentes aspectos de la presente invención, puede usarse una línea celular de hibridoma, expresando la línea celular de hibridoma anticuerpos monoclonales deseables generados por técnicas convencionales bien conocidas. En el contexto de la presente invención la célula de

hibridoma es capaz de producir un anticuerpo que se une específicamente a integrina $\alpha 2$, particularmente a integrina $\alpha 2\beta 1$. La célula de hibridoma puede generarse fusionando un linfocito B productor de anticuerpos activado normal con una célula de mieloma. En particular, la célula de hibridoma puede producirse como sigue: se retiran linfocitos B del bazo de un animal al que se ha presentado el antígeno relevante. Estos linfocitos B se fusionan después con células tumorales de mieloma que pueden crecer indefinidamente en cultivo. Esta fusión se realiza haciendo a las membranas celulares más permeables. Las células híbridas fusionadas (denominadas hibridomas), siendo células cancerosas, se multiplicarán rápidamente e indefinidamente y producirán grandes cantidades de los anticuerpos deseados. Tienen que seleccionarse y clonarse posteriormente por dilución limitante. Habitualmente son esenciales los medios complementarios que contienen interleucina 6 (tales como briclone) para esta etapa. La selección se realiza mediante el cultivo de las células de hibridoma primario recién fusionadas en medio selectivo, especialmente en medio que contiene HAT concentración 1 x durante aproximadamente 10-14 días. Después de usar HAT es deseable con frecuencia usar medio que contiene HT. La clonación se realiza después de la identificación de las células de hibridoma primario positivas.

Un péptido o complejo peptídico de la invención puede producirse expresando un ácido nucleico de la invención en una célula hospedadora adecuada. En consecuencia, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir un péptido o complejo peptídico de acuerdo con la invención que comprende cultivar la célula hospedadora que comprende el ácido nucleico o los ácidos nucleicos de la invención en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo y opcionalmente recuperar el péptido o complejo peptídico de la célula hospedadora.

Para esto, las células hospedadoras pueden transfectarse, por ejemplo por medios convencionales tales como electroporación con al menos un vector de expresión que contiene un ácido nucleico de la invención bajo control de una secuencia reguladora transcripcional. La célula hospedadora transfectada o transformada se cultiva después en condiciones que permiten la expresión de la proteína. La proteína expresada se recupera, se aísla y opcionalmente se purifica de la célula (o del medio de cultivo, si se expresa extracelularmente) por medios apropiados conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, las proteínas se

aíslan en forma soluble después de lisis celular o se extraen usando técnicas conocidas, por ejemplo en cloruro de guanidina. Si se desea, el polipéptido o polipéptidos de la invención se producen como una proteína de fusión. Tales proteínas de fusión son las descritas anteriormente. Como alternativa, por ejemplo, puede ser deseable producir proteínas de fusión para potenciar la expresión de la proteína en una célula hospedadora seleccionada o para mejorar la purificación. Las moléculas que comprenden los polipéptidos de la presente invención pueden purificarse adicionalmente usando cualquiera de una diversidad de métodos convencionales que incluyen, pero sin limitación, cromatografía líquida tal como normal o de fase inversa, usando HPLC, FPLC y similares; cromatografía de afinidad (tal como con ligandos inorgánicos o anticuerpos monoclonales); cromatografía de exclusión por tamaño; cromatografía de quelado metálico inmovilizado; electroforesis en gel y similares. Un experto en la materia puede seleccionar las técnicas de aislamiento y purificación más apropiadas sin alejarse del alcance de la presente invención. Dicha purificación proporciona el antígeno en una forma sustancialmente sin otros materiales proteínicos y no proteínicos del microorganismo.

Son células hospedadoras adecuadas por ejemplo células eucariotas o líneas celulares derivadas de organismos multicelulares (tal como se ha definido anteriormente, por ejemplo células CHO o células BHK), organismos unicelulares eucariotas tales como levadura (por ejemplo *S. pombe* o *S. cerevisiae*) o células procariotas tales como *E. coli*. Se conoce una gran diversidad de células hospedadoras en la técnica.

Una realización de los diferentes aspectos de la presente invención está relacionado con una célula recombinante que produce el péptido o complejo peptídico, en la que el péptido o complejo peptídico se expresa de forma heteróloga por dicha célula/célula hospedadora. La expresión heteróloga de un péptido o proteína (en el presente documento: péptido o complejo peptídico) significa que la célula recombinante deriva de una célula que no expresa de forma natural el péptido o proteína o complejo peptídico y que se ha modificado (por ejemplo transfectado o transformado) para expresarlo; por ejemplo portando un ácido nucleico (tal como una construcción de ácido nucleico artificial (un vector) que porta un inserto que codifica el péptido o complejo peptídico) permitiendo la expresión de dicho péptido o complejo peptídico, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo,

por dicha célula. La célula recombinante puede derivar de cualquier célula, línea celular o células hospedadoras como se ha definido anteriormente, incluyendo células eucariotas así como procariotas.

En consecuencia, un sexto aspecto de la presente invención está relacionado con una célula que expresa de forma heteróloga uno de los ácidos nucleicos de la presente invención.

En un séptimo aspecto, la presente invención está relacionado con un método para producir un péptido o complejo peptídico de la presente invención que comprende cultivar la célula de acuerdo con la presente invención en condiciones que permite la expresión del péptido o complejo peptídico y opcionalmente recuperar el péptido o complejo peptídico de la célula hospedadora.

Un octavo aspecto de la presente invención está relacionado con una composición que comprende al menos un péptido o complejo peptídico o un conjugado que comprende el péptido o complejo peptídico de acuerdo con la invención y/o al menos un ácido nucleico de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento.

La composición (farmacéutica) de la presente invención puede abarcar adicionalmente vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables útiles en la presente invención son convencionales y pueden incluir tampones, estabilizadores, diluyentes, conservantes y solubilizadores. Remington's Pharmaceutical Sciences, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª Edición (1975), describe composiciones y formulaciones adecuadas para el suministro farmacéutico de los polipéptidos/ácidos nucleicos descritos en la presente memoria. El contenido del principio activo (polipéptido o ácido nucleico) en la composición farmacéutica no está limitado en tanto que sea útil para tratar o prevenir, pero preferentemente contiene 0,0000001-10 % en peso por composición total.

En general, la naturaleza del vehículo o excipientes dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales habitualmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como un vehículo. Para composiciones sólidas (por ejemplo formas de polvo, píldora, comprimido o cápsula), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales

pueden incluir, por ejemplo, usos farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tamponantes de pH y similares, por ejemplo acetato sódico o sorbitán monolaurato.

Generalmente, se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en el vehículo para hacer a la formulación isotónica. Los ejemplos del vehículo incluyen pero sin limitación solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Preferentemente, los excipientes, vehículos o estabilizadores aceptables son preferentemente no tóxicos a las dosificaciones y concentraciones empleadas, incluyendo tampones tales como citrato, fosfato y otros ácidos orgánicos; contraiones formadores de sales, por ejemplo sodio y potasio; polipéptidos de bajo peso molecular (> 10 restos aminoacídicos); proteínas, por ejemplo albúmina de suero o gelatina; polímeros hidrófilos, por ejemplo polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como histidina, glutamina, lisina, asparagina, arginina o glicina; carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; monosacáridos; disacáridos; otros azúcares, por ejemplo sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; agentes quelantes, por ejemplo EDTA; tensioactivos no iónicos, por ejemplo Tween, Pluronics o polietilenglicol; antioxidantes incluyendo metionina, ácido ascórbico y tocoferol y/o conservantes, por ejemplo, cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; parabenos de alquilo, por ejemplo metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol).

La composición farmacéutica abarca al menos un péptido, complejo peptídico o ácido nucleico de la invención; sin embargo también pueden contener un cóctel (es decir una mezcla simple) que contiene uno o más péptidos y/o complejos peptídicos diferentes y/o ácidos nucleicos de la invención. El péptido o péptidos o el complejo o complejos peptídicos de la presente invención también pueden usarse en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Los ácidos y bases adecuados que son capaces de formar sales con los péptidos de la presente invención se conocen bien por los expertos en la materia e incluyen ácidos y bases orgánicas e inorgánicas.

Preferentemente, la composición farmacéutica puede usarse para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno relacionado con integrina $\alpha 2$. En el contexto de la presente invención, una enfermedad o trastorno relacionado con integrina $\alpha 2$ puede entenderse como cualquier afección no deseada del cuerpo que implica, está causada, contribuye a o se ve afectada por una o más de las funciones o actividades de integrina $\alpha 2$. Los ejemplos incluyen rutas de señalización o procesos que implican integrina $\alpha 2$ que median reacciones celulares aberrantes tales como proliferación celular aberrante o aumentada mediada por colágeno o secreción de citocinas, dando como resultado por ejemplo neo-angiogénesis, afecciones inflamatorias o trastornos de la curación de heridas. Los ejemplos específicos comprenden (pero sin limitación): Trombosis, enfermedad vascular, cáncer, incluyendo neoangiogénesis y metástasis, cáncer pancreático, cáncer de colon, por ejemplo expansión metastásica del cáncer de colon a otros órganos (por ejemplo pulmón e hígado) y melanoma, inflamación, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmune y una enfermedad caracterizada por angiogénesis anómala o aumentada, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, reacciones a trasplante, neuritis óptica, traumatismo de la médula espinal, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjorgen, esclerodermia, enfermedad cardiovascular, psoriasis, aterosclerosis e infecciones que inducen una respuesta inflamatoria.

En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica puede usarse para tratar o prevenir una enfermedad vascular y/o trombosis, particularmente en el tratamiento de ciertos indicios clínicos, como por ejemplo síndrome coronario agudo, intervención coronaria percutánea, apoplejía isquémica, estenosis de la arteria carótida o enfermedad oclusiva arterial periférica.

En el contexto de la presente invención, el tratamiento o prevención puede afectar a cualquier animal (humano o no humano, especialmente mamíferos tales como seres humanos, animales de granja o mascotas) que necesite tratamiento (es decir para atenuar o eliminar la patología o trastorno o para prevenir o retardar la aparición de la patología o trastorno en individuos que no presentan aún la patología o trastorno).

La integrina $\alpha 2\beta 1$ es una diana interesante en el tratamiento o prevención de trombosis. Estudios in vivo con ratones knock-out $\alpha 2\beta 1$ mostraron reducción en la formación de trombos y aumento del tiempo hasta oclusión en modelos de

trombosis arterial así como tiempos de hemorragia de la cola prolongados. En estudios clínicos relacionados con deficiencia y polimorfismos de integrina $\alpha 2$, los pacientes mostraron trastorno hemorrágico de suave a grave y respuesta de colágeno defectiva de las plaquetas. El polimorfismo conduce a aumento de la expresión de $\alpha 2\beta 1$, dando como resultado un factor de riesgo independiente para infarto de miocardio no letal en individuos de edad < 62, riesgo aumentado de apoplejía en pacientes de edad < 50 y riesgo aumentado de desarrollo de retinopatía diabética en diabéticos de tipo II. Además, las plaquetas y la integrina $\alpha 2$ están implicadas en la angiogénesis, progresión/metástasis tumoral. En consecuencia, el cáncer es un campo terapéutico interesante adicional. Se ha mostrado que la inhibición de integrina $\alpha 2$ antagoniza la invasión tumoral del estroma *in vitro* y la adhesión de colágeno de tipo I mediada por integrina $\alpha 2$/integrina-ECM en particular está implicada en la promoción del fenotipo maligno en cáncer pancreático *in vitro*. *In vivo*, los mAb antagonistas anti-$\alpha 2$ evitan el aumento inducido por operación de metástasis de hígado en un modelo de rata, inhiben la diferenciación de células cancerosas colorrectales humanas multipotentes y suprimen el crecimiento y vascularización de xenotrasplantes de carcinoma de células escamosas humanas.

Para cáncer colorrectal se ha mostrado que la retirada del carcinoma colorrectal primario puede aumentar paradójicamente el riesgo de desarrollo de metástasis, debido a que las pruebas acumuladas sugieren que el traumatismo quirúrgico puede estimular el crecimiento tumoral. La manipulación del tumor primario durante la cirugía da como resultado separación de las células tumorales que supera la necesidad de cambios celulares complejos. Además, el traumatismo de operación induce la exposición de ECM subendoteliales y de este modo facilita la unión a través de integrinas expresadas habitualmente, promoviendo la adherencia de células tumorales. En un modelo animal, el bloqueo de la integrina $\alpha 2$ en células tumorales anuló completamente la adhesión inducida por operación y revirtió completamente el crecimiento potenciado de metástasis de hígado después de cirugía abdominal.

Para cáncer pancreático, la terapia actual es con frecuencia insuficiente, debido a que alarga la vida solamente 4 meses. La adhesión de colágeno de tipo I mediada por integrina $\alpha 2\beta 1$ e integrina-ECM en particular están implicadas en la promoción del fenotipo maligno en cáncer pancreático in vitro. Los estudios en

modelos animales usando inhibidores de función de integrina $\alpha 2\beta 1$ tales como mAb están garantizados y deberían evaluarse con respecto a eficacia terapéutica en el tratamiento de cáncer pancreático.

Basándose en estos hallazgos, un bloqueo funcional de integrina $\alpha 2$ y/o $\alpha 2\beta 1$ puede proporcionar una oportunidad terapéutica interesante, en particular para cáncer colorrectal y pancreático.

Un séptimo aspecto de la presente invención está relacionado con un método para diagnosticar una enfermedad asociada con expresión de integrina $\alpha 2$ alterada, comprendiendo el método

a) poner en contacto una muestra de un sujeto que comprende integrina $\alpha 2$ con el péptido o complejo peptídico de la invención;

b) detectar la unión de la integrina $\alpha 2$ con el péptido o complejo peptídico; y

c) comparar la unión de la etapa b) con una referencia,

en el que una unión alterada de integrina $\alpha 2$ en la muestra en relación con la referencia es indicativa de la enfermedad. La unión alterada puede por ejemplo identificarse por una señal alterada (es decir una señal aumentada o reducida) como se detecta en la etapa b en comparación con una muestra de referencia.

El péptido (complejo) de la presente invención también puede usarse para ensayos de diagnóstico. Como se ha detallado anteriormente la expresión alterada de integrina $\alpha 2$ y/o mutaciones de la misma puede asociarse con enfermedades particulares. En consecuencia, el péptido (complejo) puede usarse para determinar la unión a integrina $\alpha 2$. Si la unión (cuantitativamente o cualitativamente) en relación con un control o referencia cambia, esto puede ser indicativo de una enfermedad.

En consecuencia, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad asociada con integrina $\alpha 2$ alterada, comprendiendo el método

a) poner en contacto una muestra tomada de un individuo con el péptido o complejo peptídico de la presente invención; y

b) detectar la unión de integrina $\alpha 2$ con el péptido o complejo peptídico; y

c) comparar la unión de la etapa b) con la unión de integrina $\alpha 2$ con el péptido o complejo peptídico en una o más muestras de referencia,

en el que una unión alterada en la muestra tomada en relación con la unión detectada en la o las muestras de referencia es indicativo de la enfermedad.

Generalmente, una muestra de ensayo obtenida de un sujeto puede ponerse en contacto con el péptido (complejo) de la invención que se une específicamente a integrina $\alpha 2$. Opcionalmente, el péptido (complejo) puede fijarse en un soporte sólido antes de poner en contacto el anticuerpo con una muestra de ensayo para facilitar el lavado y aislamiento posterior del complejo. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen vidrio o plástico en forma de, por ejemplo, una placa de microtitulación, un cubreobjetos o portaobjetos de microscopio de vidrio, una varilla, una perla o una microperla.

Después de incubar la muestra con anticuerpos, la muestra se lava y pueden detectarse los complejos de péptido (complejo)/integrina $\alpha 2$ formados. Esto puede conseguir incubando la mezcla lavada con un reactivo de detección. El reactivo de detección puede ser mediante el uso de un marcador detectable. Se conocen una diversidad de marcadores y métodos de detección por el experto en la materia. Por lo que respecta al marcador detectable, puede usarse cualquier marcador detectable conocido en la técnica. Por ejemplo, el marcador detectable puede ser un marcador radioactivo (tal como, por ejemplo, ^{3}H, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, ^{32}P y ^{33}P), un marcador enzimático (tal como, por ejemplo, peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y similares), un marcador quimioluminiscente (tal como, por ejemplo, ésteres de acridinio, tioésteres de acridinio, sulfonamidas de acridinio, ésteres de fenantridinio, luminal, isoluminol y similares), un marcador de fluorescencia (tal como, por ejemplo, fluoresceína (por ejemplo, 5-fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 3'6-carboxifluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, 6-hexaclorofluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína y similares)), rodamina, ficobiliproteínas, R-ficoeritrina, puntos cuánticos, (por ejemplo, seleniuro de cadmio cubierto con sulfuro de cinc), un marcador termométrico, una etiqueta, (como se ha definido anteriormente) o un marcador de reacción en cadena de inmunopolimerasa.

A lo largo de los ensayos, pueden requerirse etapas de incubación y/o lavado después de cada combinación de reactivos. Las etapas de incubación pueden variar de aproximadamente 5 segundos a varias horas, preferentemente de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 24 horas. Sin embargo, el tiempo

de incubación dependerá del formato de ensayo, biomarcador (antígeno), volumen de solución, concentraciones y similares. Habitualmente los ensayos se llevarán a cabo a temperatura ambiente, aunque pueden realizarse sobre un intervalo de temperaturas, tal como de 10 ºC a 40 ºC.

Por conveniencia, el péptido (complejo) puede proporcionarse en un kit, tal como una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones, incluyendo para realizar un ensayo de diagnóstico. Cuando el péptido (complejo) está marcado con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Otros aditivos pueden incluirse en el kit tales como estabilizadores, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos proporcionados en el kit pueden variarse ampliamente, por ejemplo, para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, habitualmente liofilizados, incluyendo excipientes, por ejemplo, que en disolución proporcionarán una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

La referencia puede ser una muestra de un sujeto sano o determinarse en un grupo de sujetos sanos. Como alternativa, puede ser un valor de referencia conocido. El experto en la materia conoce procedimientos estadísticos para evaluar si dos valores son significativamente diferentes entre sí tales como ensayo de t de Student o ensayos de chi cuadrada. Además, el experto en la materia sabe cómo seleccionar un control adecuado.

Las expresiones “muestra de un sujeto” y “muestra de ensayo” se refieren a todos los fluidos biológicos, excreciones y tejidos aislados de cualquier sujeto dado, particularmente un ser humano. En el contexto de la presente invención tales muestras incluyen, pero sin limitación, sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, aspirado del pezón, orina, semen, fluido seminal, plasma seminal, fluido prostático, excrementos, lágrimas, saliva, sudor, biopsia, líquido ascítico, fluido cerebroespinal, leche, linfa, lavado bronquial y otras muestras de lavado o muestras de extracción de tejido. Típicamente, las muestras sanguíneas son muestras de ensayo preferidas para su uso en el contexto de la presente invención.

En un octavo aspecto, la presente invención está relacionada con un artículo

de manufactura que comprende

a) un material de envasado (por ejemplo uno o más recipientes para el péptido o complejo peptídico y la etiqueta o prospecto)

b) un péptido o complejo peptídico de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

c) una etiqueta (por ejemplo que comprende información escrita y/o un código de barras y/o cualquier otro tipo de información) o un prospecto (es decir cualquier tipo de soporte de datos tal como una microplaca, un folleto, un librito, etc.), indicando el inserto contenido dentro de dicho material de envasado que dicho péptido o complejo peptídico es eficaz para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, especialmente una enfermedad o trastorno relacionada con integrina α2, tal como se ha definido en la presente memoria.

En un noveno aspecto, la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico para el diagnóstico de un trastorno o enfermedad relacionado con integrina α2 que comprende un péptido o complejo peptídico de la presente invención y un envase adecuado e instrucciones posiblemente adecuadas para usar dicho péptido o complejo peptídico en la detección de integrina α2.

Un kit de diagnóstico de acuerdo con el noveno aspecto de la presente invención es un artículo de manufactura que comprende al menos los componentes como se han definido en el noveno aspecto y opcionalmente uno o más componentes adicionales (por ejemplo tampones y otros reactivos necesarios o adecuados para llevar a cabo la detección de integrina alfa 2 en la muestra o medios adicionales para detectar integrina alfa 2 u otros marcadores de una enfermedad dada, o patrones negativos/positivos, uno o más anticuerpos secundarios (marcados de forma adecuada) para detectar, visualizar y/o cuantificar el complejo de integrina alfa 2-(péptido/complejo peptídico) contenido de forma adecuada dentro de uno o más recipientes adecuados) que se combinan preferentemente en una unidad ensamblada de forma espacial y que se pretende para su uso en el diagnóstico de un trastorno o enfermedad relacionado con integrina α2.

De acuerdo con una realización del noveno aspecto, el kit comprende adicionalmente un soporte de datos que comprende instrucciones para un método de acuerdo con el séptimo o décimo primer aspecto de la presente invención y una cualquiera de sus realizaciones.

En un décimo aspecto, la presente invención se refiere a un método de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad o trastorno relacionado con integrina α2 usando uno o más péptidos o complejos peptídicos de la presente invención y/o uno o más ácidos nucleicos.

En consecuencia, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad asociada con integrina α2 alterada, comprendiendo el método

a) poner en contacto una muestra tomada de un individuo con el péptido o complejo peptídico de la presente invención;

b) detectar y/o cuantificar la unión de integrina α2 con el péptido o complejo peptídico; y

c) comparar la unión de la etapa b) con la unión de la integrina α2 con el péptido o complejo peptídico en una o más muestras de referencia,

en el que una unión alterada en la muestra tomada en relación con la unión detectada en la o las muestras de referencia es indicativa de la enfermedad. La unión puede detectarse o cuantificarse en términos de la afinidad (por ejemplo, tasa KD, Koff, Kon) usando métodos conocidos o simplemente por medio de la señal (intensidad) del complejo péptido/complejo peptídico – integrina alfa 2 causada por ejemplo por un anticuerpo marcado contra el péptido/complejo peptídico en comparación con la de la muestra de referencia.

El término “referencia”, especialmente en el contexto de “referencia individual”, “muestra de referencia” o “valor de referencia” en el contexto de la presente invención se refiere a una comparación o patrón que es característico o representativo para un cierto estado (de salud), enfermedad, etc. Por lo tanto, un valor de referencia es un valor convencional para un cierto parámetro (por ejemplo nivel de expresión de una cierta molécula biomarcadora/indicadora) que es típico para un cierto estado (por ejemplo un estado de enfermedad o estado de salud), un individuo de referencia es un individuo que se ha seleccionado para comparación y tiene un cierto estado de salud o enfermedad, una muestra de referencia puede por ejemplo ser una muestra de un individuo de referencia o una muestra artificial con un nivel característico de un cierto indicador o biomarcador típico para una patología o estado de salud.

La expresión “muestra de referencia” como se usa en la presente memoria, se refiere a una muestra que se analiza de una manera sustancialmente idéntica a

la muestra de interés y cuya información se compara con la de la muestra de interés. Una muestra de referencia proporciona de este modo un patrón que permite la evaluación de la información obtenida de la muestra de interés.

Una muestra de referencia puede derivar de un tejido, órgano o individuo normal o sano, proporcionando de este modo un patrón de un estado de salud de un tejido, órgano o individuo. Las diferencias entre el estado de la muestra de referencia normal y el estado de la muestra de interés pueden ser indicativas del riesgo de desarrollo de enfermedad o la presencia o progresión adicional de dicha enfermedad o trastorno.

Una muestra de referencia puede derivar de un tejido, órgano o individuo enfermo o anómalo, proporcionando de este modo un patrón de un estado de enfermedad de un tejido, órgano o individuo. Las diferencias entre el estado de la muestra de referencia anómala y el estado de la muestra de interés pueden ser indicativas de un riesgo reducido de desarrollo de enfermedad o la ausencia o mejora de dicha enfermedad o trastorno.

Una muestra de referencia también puede derivar del mismo tejido, órgano o individuo que la muestra de interés pero se ha tomado en un punto más temprano en el tiempo. Las diferencias entre el estado de la muestra de referencia tomada más temprano y el estado de la muestra de interés pueden ser indicativas de la progresión de la enfermedad, es decir una mejoría o empeoramiento de la enfermedad a lo largo del tiempo. Una muestra de referencia se toma en un punto temporal más temprano o más tardío en caso de que haya pasado un periodo de tiempo entre la toma de la muestra de referencia y la toma de la muestra de interés. Dicho periodo de tiempo puede representar años (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 años), meses (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses), semanas (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 semanas), días (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 días), horas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 horas), minutos (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 minutos), o segundos (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 segundos).

La muestra de referencia representativa para un estado o etapa de dolor puede ser de un sujeto control que se sabe que padece el trastorno o enfermedad a diagnosticar, es decir una enfermedad o trastorno relacionado con integrina alfa

2, por ejemplo tal como se ha definido en la presente memoria. El sujeto de control puede ser un mamífero, tal como un ser humano, roedor (por ejemplo, rata, hámster, ratón) o mono, o puede ser otro animal distinto de un mamífero tal como un ave.

Preferentemente, tanto el valor o muestra como el valor o muestra de referencia son de sujetos de la misma especie (por ejemplo ser humano), más preferentemente del mismo género (por ejemplo hombre o mujer) y/o de una edad o fase de vida similar (por ejemplo recién nacido, niño, juvenil, adulto o anciano).

La referencia o muestra de referencia en los diferentes aspectos y realizaciones de la presente invención deriva preferentemente de un individuo sano, un individuo enfermo o del mismo individuo que la muestra de interés. Cuando la referencia (por ejemplo valor de referencia) o muestra de referencia se tomó del mismo individuo que la muestra de interés, la referencia (por ejemplo valor de referencia) o muestra de referencia se tomó preferentemente en un punto temporal más temprano o más tardío que la muestra de interés. El periodo de tiempo que ha pasado entre la toma de la referencia (por ejemplo valor de referencia) o muestra de referencia y la toma de la referencia (por ejemplo valor de referencia) o muestra o valor de interés preferentemente representa años (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 años), meses (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses), semanas (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 semanas), días (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 días), horas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 horas), minutos (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 minutos), o segundos (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 segundos). Como alternativa o adicionalmente, la muestra de referencia es una muestra de referencia con un nivel de integrina alfa 2 representativo de un individuo sano o representativo de la presencia o ausencia de un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 o representativo de un riesgo reducido o aumentado de desarrollar un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2.

En realizaciones en las que la referencia o muestra de referencia deriva de un individuo sano o un individuo con un riesgo reducido de desarrollar un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 o con un nivel de integrina alfa 2 representativo de la ausencia de un trastorno o enfermedad relacionado con

integrina alfa 2, un nivel elevado de integrina alfa 2 en la muestra o valor de referencia o en la muestra o valor de interés en comparación con dicho valor de referencia o muestra de referencia indica (a) la presencia de un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2, (b) un riesgo aumentado de desarrollar un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 y/o (c) la progresión de un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 en el individuo. En realizaciones en las que la referencia deriva de un individuo enfermo o un individuo con un riesgo aumentado de desarrollar un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 o un valor representativo de la presencia de un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2, un nivel similar de integrina alfa 2 indica (a) la presencia de un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2, (b) un riesgo aumentado de desarrollar un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 y/o (c) la progresión de un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 en el individuo.

En realizaciones en las que la referencia (valor) o muestra de referencia es (de) el mismo individuo que el individuo de interés es en un punto temporal más temprano, un nivel elevado de integrina alfa 2 en el individuo/valor/muestra de interés indica (a) la presencia de un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2, (b) un riesgo aumentado de desarrollar un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 y/o (c) la progresión de un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 en el individuo. En realizaciones en las que la referencia (valor) o muestra de referencia es (de) el mismo individuo que el individuo/muestra de interés en un punto temporal anterior, un nivel reducido de integrina alfa 2 en la muestra de interés indica (a) una alteración del trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 o una mejora o ausencia del trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2, (b) un riesgo reducido de desarrollar un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 y/o (c) una progresión reducida del trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 en el individuo.

En realizaciones en las que la referencia (valor) o muestra de referencia es (de) el mismo individuo que el individuo/muestra de interés en un punto temporal anterior, un nivel similar de integrina alfa 2 en la muestra de interés indica (a) un riesgo similar de desarrollar un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2, (b) una paralización de la progresión de un trastorno o enfermedad

relacionado con integrina alfa 2 y/o (c) una persistencia del trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 en el individuo.

En realizaciones en las que la referencia (valor) o muestra de referencia derivan de un individuo sano o de un individuo con un riesgo reducido de desarrollar un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 o comprende un nivel de integrina alfa 2 representativo de un individuo sano o de un estado de ausencia de enfermedad o de un riesgo reducido de desarrollar un trastorno o enfermedad relacionada con integrina alfa 2, un nivel elevado de integrina alfa 2 indica (a) la presencia de un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2, (b) un riesgo aumentado de desarrollar un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 y/o (c) la progresión de un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 en el individuo.

En realizaciones en las que la referencia (valor) o muestra de referencia deriva de un individuo enfermo o de un individuo con un riesgo aumentado de desarrollar un trastorno de enfermedad relacionado con integrina alfa 2 o comprende un nivel o cantidad de integrina de alfa 2 representativa de un individuo enfermo, de un estado de presencia de enfermedad o de un riesgo aumentado de desarrollar un trastorno o enfermedad relacionada con integrina alfa 2, un nivel similar de integrina alfa 2 indica (a) la presencia de un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2, (b) un riesgo aumentado de desarrollar un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 y/o (c) la progresión de un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 en el individuo.

En realizaciones en las que la referencia (valor) o muestra deriva del mismo individuo que la muestra de interés y se tomó en un punto temporal anterior, un nivel elevado de integrina alfa 2 en la muestra de interés indica (a) la presencia de un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2, (b) un riesgo aumentado de desarrollar un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 y/o (c) la progresión de un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 en el individuo.

En realizaciones en las que la referencia (valor) o muestra de referencia deriva del mismo individuo que la muestra de interés y se tomó en un punto temporal anterior, un nivel reducido de integrina alfa 2 en la muestra de interés indica (a) una alteración del trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 o una mejora o ausencia de un trastorno o enfermedad relacionado con integrina

alfa 2, (b) un riesgo reducido de desarrollar un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 y/o (c) una progresión reducida del trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2. En realizaciones en las que la muestra de referencia deriva del mismo individuo que la muestra de interés y se tomó en un punto temporal anterior, un nivel similar de integrina alfa 2 en la muestra de interés indica (a) un riesgo similar de desarrollar un trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2, (b) una paralización en la progresión del trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 y/o (c) una persistencia del trastorno o enfermedad relacionado con integrina alfa 2 en el individuo.

De acuerdo con una realización preferente de los diferentes aspectos de la presente invención, el péptido o complejo peptídico comprende o consiste en (es) un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo. A continuación, se enumeran algunas realizaciones preferentes que se refieren a un anticuerpo monoclonal o a un fragmento de unión a antígeno del mismo:

1. Anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho anticuerpo o fragmento se une específicamente al dominio I de la integrina α2 humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento un dominio de región variable de la cadena pesada (VH) y un dominio de región variable de la cadena ligera (VL), en el que dicho anticuerpo o fragmento presenta reactividad cruzada con integrina α2 no humana de primate pero no presenta reactividad cruzada con integrina α2 que no sea de primate.

2. Anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho anticuerpo o fragmento se une específicamente al dominio I de la integrina α2 humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento un dominio de región variable de la cadena pesada (VH) y un dominio de región variable de la cadena ligera (VL), en el que dicho anticuerpo o fragmento compite con un anticuerpo de referencia por la unión al epítopo del anticuerpo de referencia, comprendiendo dicho anticuerpo de referencia una cadena ligera codificada por el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de adhesión DSM 23944 y una cadena pesada codificada por (i) el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de adhesión DSM 23946 o bien (ii) el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de adhesión DSM 23945.

3. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la realización 1 o 2, en el que dicho anticuerpo o fragmento se une específicamente al dominio I de la integrina α2 humana con una afinidad de unión de orden nM.

4. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que dicho anticuerpo o fragmento inhibe la interacción de la integrina α2 humana con el colágeno *in vitro*, inhibiendo de esa manera la activación de las plaquetas debida a la adhesión de dichas plaquetas a dicho colágeno.

5. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las realizaciones previas, comprendiendo dicho dominio de región variable de la cadena pesada la cadena pesada HCDR3 de SEC ID Nº 5.

6. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las realizaciones previas, comprendiendo dicho dominio de región variable de la cadena pesada las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs) de la cadena pesada de SEC ID Nº 3 (HCDR1), SEC ID Nº 4 (HCDR2), y SEC ID Nº 5 (HCDR3), o variantes funcionalmente activas de las mismas.

7. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la realización 6, en el que la variante funcionalmente activa de HCDR2 comprende la mutación Asp→Glu en el aminoácido en la posición 6.

8. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las realizaciones previas, comprendiendo dicho dominio de región variable de la cadena ligera la cadena ligera LCDR3 de SEC ID Nº 8.

9. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las realizaciones previas, comprendiendo dicho dominio de región variable de la cadena ligera las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs) de la cadena ligera de SEC ID Nº 6 (LCDR1), SEC ID Nº 7 (LCDR2), y SEC ID Nº 8 (LCDR3), o variantes funcionalmente activas de las mismas.

10. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la realización 9, en el que la variante funcionalmente activa de LCDR1 comprende la mutación Asn→Gln en el aminoácido en la posición 11.

11. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las realizaciones previas, teniendo dicho dominio de región variable de la cadena pesada (VH) al menos 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de VH de SEC ID Nº 2.

12. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la realización 11, en el que dicho dominio de región variable de la cadena pesada (VH) comprende la secuencia de SEC ID Nº 2 o una variante funcionalmente activa de la misma.

13. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las realizaciones previas, teniendo dicho dominio de región variable de la cadena ligera (VL) al menos 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de VL de SEC ID Nº 1.

14. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la realización 13, en el que dicho dominio de región variable de la cadena ligera (VL) comprende la secuencia de SEC ID Nº 1 o una variante funcionalmente activa de la misma.

15. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que dicho dominio de región variable de la cadena pesada (VH) comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en H5, H7, H11, H12, H17, H20, H38, H40, H43, H55, H61, H65, H66, H67, H76, H81, H82, H87, H91, H93, H112, H113 y H116.

16. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la realización 15, en el que las una o más sustituciones de aminoácidos se seleccionan entre el grupo que consiste en 5His→Val, 7Pro→Ser, 11Leu→Val, 12Val→Lys, 17Pro→Ser, 20Leu→Val, 38Lys→Arg, 40Arg→Ala, 43Arg→Gln, 55Asp→Glu, 61Asn→Ala,

65Lys→Gln, 66Asp→Gly, 67Lys→Arg, 76Ser→Thr, 81Ile→Met, 82Gln→Glu, 87Thr→Arg, 91Ser→Thr, 93Val→Lys, 112Thr→Leu, 113Leu→Val y 116Ser→Val .

17. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que dicho dominio de región variable de la cadena ligera (VL) comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en L9, L12, L15, L22, L34, L46, L47, L80, L83, L85, L87, y L89.

18. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la realización 17, en el que las una o más sustituciones de aminoácidos se seleccionan entre el grupo que consiste en 9Ala→Ser, 12Ala→Ser, 15Leu→Val, 15Leu→Pro, 22Ser→Thr, 34Asn→Gln, 46Gln→Lys, 47Ala→Pro, 80Asp→Asn, 83Glu→Gln, 85Asp→Glu, 87Ala→Thr y 89Thr→Asn.

19. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las realizaciones previas, teniendo dicho dominio de región variable de la cadena pesada (VH) al menos 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de VH seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº 38 (HC1), SEC ID Nº 39 (HC2), SEC ID Nº 40 (HC3), SEC ID Nº 41 (HC4), SEC ID Nº 42 (HC5), SEC ID Nº 43 (HC6), y SEC ID Nº 44 (HC7).

20. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la realización 19, comprendiendo dicho dominio de región variable de la cadena pesada (VH) una secuencia de VH seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº 38 (HC1), SEC ID Nº 39 (HC2), SEC ID Nº 40 (HC3), SEC ID Nº 41 (HC4), SEC ID Nº 42 (HC5), SEC ID Nº 43 (HC6), y SEC ID Nº 44 (HC7).

21. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las realizaciones previas, teniendo dicho dominio de región variable de la cadena ligera (VL) al menos 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de VL seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº 33 (LC1), SEC ID Nº 34 (LC2), SEC ID Nº 35 (LC3), SEC ID Nº 36 (LC4), y SEC ID Nº 37 (LC5).

22. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la realización 21, comprendiendo dicho dominio de región variable de la cadena ligera (VL) una secuencia de VL seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº 33 (LC1), SEC ID Nº 34 (LC2), SEC ID Nº 35 (LC3), SEC ID Nº 36 (LC4), y SEC ID Nº 37 (LC5).

23. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que dicho anticuerpo o porción de unión es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

24. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las realizaciones previas, en el que la porción de unión a antígeno se seleccionan entre el grupo que consiste en un Fab, un Fab', un F(ab')2, un Fv, un Fv unido por puente disulfuro, un scFv, y un $(scFv)_2$.

25. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las realizaciones previas, que se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo específico doble, un anticuerpo de isotipo, un anticuerpo de dominio variable doble y un anticuerpo biespecífico.

26. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las realizaciones previas, que comprende un dominio constante de inmunoglobulina de la cadena pesada seleccionado entre el grupo que consiste en: un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgGl humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgE humana, y un dominio constante de IgA humana.

27. El anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las realizaciones previas, que comprende un dominio constante de IgG4 humana.

28. Un ácido nucleico aislado que codifica la secuencia de aminoácidos del anticuerpo, o de la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las realizaciones precedentes.

29. Un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico de la realización 28.

30. Una célula anfitriona que comprende el vector de expresión recombinante de la realización 29.

31. Un método para la producción de un anticuerpo o de una fracción de unión a antígeno de una cualquiera de las realizaciones 1-26, que comprende el cultivo de la célula anfitriona de la realización 30 en condiciones tales que la célula anfitriona produzca un anticuerpo.

32. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las realizaciones 1-27 y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

33. Un método para el tratamiento, prevención o diagnóstico de una enfermedad o trastorno relacionado con la integrina α2, comprendiendo dicho método la administración de la composición farmacéutica de la realización 32 a un sujeto con necesidad de la misma.

34. El método de la realización 33, en el que la enfermedad o el trastorno relacionado con la integrina α2 se selecciona entre el grupo que consiste en trombosis, una enfermedad vascular, cáncer, incluyendo neo-angiogénesis y metástasis, inflamación, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmune y una enfermedad caracterizada por una angiogénesis anormal o aumentada, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, reacciones a trasplantes, neuritis óptica, traumatismo de la médula espinal, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, síndrome de Reynaud, encefalomielitis autoinmune experimental, síndrome de Sjorgen,

esclerodermia, enfermedad cardiovascular, psoriasis, e infecciones que provocan una respuesta inflamatoria.

35. El método de la realización 33, en el que la enfermedad o el trastorno relacionado con la integrina α2 se selecciona entre el grupo que consiste en síndrome coronario agudo, intervención coronaria percutánea, apoplejía isquémica, estenosis de la arteria carótida o enfermedad oclusiva arterial periférica.

36. Un método para el diagnóstico de una enfermedad asociada con integrina α2 alterada, comprendiendo el método:

a) poner en contacto una muestra que contiene integrina α2 con el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las realizaciones 1-27;

b) detectar la unión de la integrina α2 al anticuerpo o al fragmento de unión a antígeno; y

c) comparar la unión de la etapa b) con una referencia, en el que una unión de integrina α2 alterada en la muestra con respecto a la referencia es indicativa de la enfermedad.

37. Un artículo de manufactura que comprende:

a) un material de envasado,

b) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las realizaciones 1-27,

c) una etiqueta o un prospecto, estando contenido el prospecto dentro de dicho material de envasado, que indica que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es eficaz para el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad o trastorno relacionado con la integrina α2.

La invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos en la presente memoria debido a que pueden variar. Además, la terminología usada en la presente memoria es para el fin de describir realizaciones particulares solamente y no se pretende que limite el alcance de la presente invención. Como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un” y “el” incluyen referencias plurales a no ser que

el contexto claramente dicte otra cosa. De forma similar, las palabras “comprender”, “contener” y “abarcar” deben interpretarse de forma inclusiva en lugar de exclusiva.

A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos y cualquier acrónimo usado en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la materia y en el campo de la invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria pueden usarse en la práctica de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen en la presente memoria.

La invención se ilustra adicionalmente por el siguiente ejemplo, aunque se entenderá que los ejemplos se incluyen meramente para fines de ilustración y no se pretende que limiten el alcance de la invención a no ser que se indique específicamente de otro modo.

FIGURAS:

La Figura 1 A y B muestra unión de mAb anti integrina α2 purificado de sobrenadante de hibridoma en Tecnología HUVEC MesoScale.

La Figura 2 muestra el efecto de mAb anti integrina α2 purificado de sobrenadante de hibridoma en angiogénesis HUVEC. El mAb anti integrina α2 fue capaz de inhibir la angiogénesis inducida por FGF2 de una manera dependiente de dosis.

La Figura 3 muestra inhibición de adhesión de plaquetas a colágeno en flujo por Fab-mAb anti integrina α2. Se incubó sangre humana anti coagulada durante 10 minutos con colorante DiOC6(3) y diluciones seriadas de Fab anti integrina α2 a 37 ºC. Después se hace fluir la muestra a través de capilares recubiertos con colágeno a una tasa de cizallamiento de 3000 s-1. A partir de 10 figuras como ejemplos representativos del área cubierta se calcula la cobertura de superficie. Los valores muestran el porcentaje de inhibición de dicha cobertura de superficie como un efecto dependiente de dosis de Fab anti integrina α2.

La Figura 4 muestra estudios de reactividad cruzada entre especies realizados por análisis de FACS usando un mAb de α2 de sobrenadante de hibridoma y muestras sanguíneas de macaco (Figura 4a y b) y ser humano (Figura 4c y d). Las Figuras 4a y 4c representan controles negativos que usan solamente el anticuerpo secundario sin usar el anticuerpo primario.

Figura 5: La Figura 5a) muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº:1) y secuencia codificante (SEC ID Nº:12) de la cadena ligera variable del anticuerpo de ratón monoclonal anti integrina α2 producido por hibridoma. La Figura 5b) muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº:2) y secuencia codificante (SEC ID Nº:13) de la cadena pesada variable del anticuerpo de ratón monoclonal anti integrina α2. En las secuencias de aminoácidos, las CDR se marcan en negrita y subrayadas.

La Figura 6 muestra las secuencias de aminoácidos de las diferentes CDR del anticuerpo de ratón monoclonal anti integrina α2, en la que la Figura 6a muestra las CDR de cadena pesada y la Figura 6b muestra las CDR de cadena ligera siendo HCDR1 SEC ID Nº:3, siendo HCDR2 SEC ID Nº:4, siendo HCDR3 SEC ID Nº:5, siendo LCDR1 SEC ID Nº:6, siendo LCDR2 SEC ID Nº:7, siendo LCDR3 SEC ID Nº:8.

La Figura 7 muestra las secuencias de las construcciones quiméricas generadas por acoplamiento de la región de cadena ligera variable murina anterior (SEC ID Nº: 1) o regiones variables de cadena pesada (SEC ID Nº: 2) a (partes de) una región constante humana como se detalla en los Ejemplos. La Figura 7a muestra las secuencias de aminoácidos (SEC ID Nº: 9) y codificante (SEC ID Nº: 14) de la cadena ligera quimérica, la Figura 7b muestra las secuencias de aminoácidos (SEC ID Nº: 10) y codificante (SEC ID Nº: 15) de la cadena pesada quimérica, la Figura 7c muestra las secuencias de aminoácidos (SEC ID Nº: 11) y codificante (SEC ID Nº: 16) del fragmento Fab de cadena pesada quimérico. En las secuencias de aminoácidos, las CDR se han subrayado, la secuencia que representa los dominios variables de α2 se han marcado en negrita y el marcador His está escrito en *cursiva*.

La Figura 8 muestra las secuencias de aminoácidos de diferentes regiones constantes humanas usadas para generación de las construcciones quiméricas: SEC ID Nº:17 es la secuencia de aminoácidos de la proteína IGKC humana, la región constante de cadena ligera de acuerdo con el número de acceso de Swiss-Prot Q502W4 como se usa para la generación de la quimera de cadena ligera de acuerdo con SEC ID Nº:9, SEC ID Nº:18 es la secuencia de aminoácidos de IGHG4 mutada humana, la región constante de cadena pesada de acuerdo con el número de acceso Swiss-prot P01861.1 como se usa para la construcción de la quimera de cadena pesada de acuerdo con SEC ID Nº:10 (los aminoácidos mutados están

marcados en negrita), SEC ID Nº:19 es la secuencia de aminoácidos de proteína IGHG1 humana, la región constante de cadena pesada de acuerdo con el número de acceso de Swiss-Prot Q569F4 como se usa para la generación de la quimera del fragmento Fab de cadena pesada de acuerdo con SEC ID Nº:11.

La Figura 9 muestra las secuencias de aminoácidos y codificante de integrina α2 y β1 humana siendo SEC ID Nº: 20 la secuencia de aminoácidos de la proteína precursora de integrina α2 de acuerdo con NP_002194.2. El dominio I, que se usó para experimentos y se expresó de forma recombinante en *E. coli*, está subrayado y en negrita. SEC ID Nº: 21 es la secuencia codificante de integrina α2 de acuerdo con el número de acceso de NCBI: NM_002203.3, SEC ID Nº: 22 es la secuencia de aminoácidos de la proteína precursora de isoforma 1A de integrina β1 de acuerdo con el número de acceso de NCBI: NP_002202.2 y SEC ID Nº: 23 es la secuencia codificante de la isoforma 1A de integrina β1 de acuerdo con el número de acceso de NCBI: NM_002211.3.

La Figura 10 muestra las secuencias de aminoácidos y codificante del anticuerpo anti integrina α2 murino original de hibridoma de ratón y verificadas por MS: SEC ID Nº: 45 es la secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica la LC del mAb anti integrina α2, SEC ID Nº: 46 es la secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica HC de mAb anti integrina α2, SEC ID Nº: 47 es la secuencia de aminoácidos de la LC de mAb anti integrina α2 como se secreta del hibridoma, SEC ID Nº:48 es la secuencia de aminoácidos de la LC de mAb anti integrina α2 como se secreta del hibridoma. SEC ID Nº: 53 es la secuencia de aminoácidos de la LC del mAb comparador TMC2206, SEC ID Nº: 54 es la secuencia de aminoácidos de la HC del mAb comparador TMC2206.

La Figura 11 muestra constantes de disociación de los diferentes anticuerpos anti integrina alfa 2 como se determinó por Biacore. Los resultados muestran una constante de disociación en muchos casos mejor o al menos igual que el mAb TMC2206

La Figura 12 muestra la unión del mAb comparador TMC2206 con el dominio I de integrina α2 preunido por Fab no humanizado medida usando Biacore (tiempo en (*s*) segundos (eje x) frente a la diferencia en (UR) unidades de respuesta (eje y)). Como puede observarse a partir de la Figura 12, TMC2206 se une al dominio I de integrina preunido por Fab no humanizado.

La Figura 13 muestra la unión de Fab no humanizado con dominio I de integrina α_2 preunido por mAb comparador TMC2206 (tiempo en (*s*) segundos (eje x) frente a la diferencia en (UR) unidades de respuesta (eje y)). Como puede observarse a partir de la Figura 13, Fab no humanizado se une al dominio I de integrina α2 preunido por el mAb comparador TMC2206.

La Figura 14 muestra la inhibición de adhesión de plaquetas a colágeno en condiciones estáticas usando plaquetas lavadas. El lote 660 corresponde a LC1/HC1, el lote 661 corresponde a LC2/HC2, el lote 662 corresponde a LC3/HC3, el lote 663 corresponde a LC3/HC4, el lote 664 corresponde a LC4/HC5, el lote 665 corresponde a LC4/HC6, el lote 666 corresponde a LC5/HC7 y el lote 667 es el comparador. Los resultados también pueden derivarse de la tabla 12. Los números de lote 660, 662 y 663 muestran inhibición al menos igual o mejor de la lesión de plaquetas a colágeno que mAb TMC2206.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación y selección de mAb y Fab anti integrina α2 funcionales.

A – Aislamiento de secuencia de células clonadas de mAb de integrina α2.

Producción y purificación de mAb de integrina α2 de hibridoma

Se descongeló un criovial que contenía $2x10^6$ células del banco celular de mAb de integrina α2 rápidamente a 37 ºC. Las células se transfirieron a un matraz T-25 cm^2 en 5 ml de medio fresco consistente en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (Gibco 31053-028) complementado con FBS 10 %, ITS 1X (Gibco 41 400-045), piruvato sódico 1 X (Gibco 11 360-039), ácido oxaloacético 150 μg/ml, glutamina 2 mM (Gibco 25030-024) y penicilina/estreptomicina 100 U/ml (Gibco 15070-063) en un incubador a 37 ºC en una atmósfera humidificada de CO_2 5 % en aire en una plataforma de agitación orbital que rotaba a 110 rpm.

La caracterización de isotipos de mAb purificado de hibridoma se realizó usando el kit de caracterización de isotipos comercial convencional de Serotec (Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Test Kit; ref. MMT1) y reveló un isotipo mIgG2a mCk.

Las células se subcultivaron cada 2 a 3 días para amplificación celular.

Para la producción, las células se inocularon a 1,8 x 10^5 C/ml en Medio de Dulbecco Modificado por Iscove (Sigma I3390) complementado con FBS 10 %, ITS 1X, piruvato sódico 1 X, ácido oxaloacético 150 μg/ml, glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina 100 U/ml en seis matraces T500 (200 ml) durante 10 días.

Para purificación, el mAb anti integrina α2 se capturó directamente del sobrenadante en la cromatografía de afinidad de Proteína G (Hitrap Protein G, GE Healthcare) y se eluyó por ácido acético 0,1 M. Después de pulir la proteína por SEC usando un Superdex 200 (GE Healthcare) y ultrafiltración la proteína se usó en los experimentos indicados.

Determinación de la secuencia de las cadenas pesadas y ligeras del mAb de integrina α2

El ADNc que codifica los dominios variables del anticuerpo monoclonal se obtuvieron como sigue: se extrajo ARNm de células de hibridoma con el kit Oligotex de Qiagen. El ADNc correspondiente se amplificó por RT-PCR por el método RACE utilizando el kit Gene Racer (Invitrogen), la transcriptasa SuperScript III a 55 ºC (Invitrogen) y cebadores descritos en la Tabla 1 (RACEMOG2a o CKFOR). Los fragmentos de ADNc se amplificaron por PCR con la polimerasa Phusion a 55 ºC (Finnzymes) y cebadores también descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores usados para RT-PCR y PCR

Cebador	Secuencia 5' a 3'
Cebador 5'-GeneRacer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA (SEC ID Nº: 24)
RACEMOG2a: Cebador 3' interno a la bisagra murina	AGGACAGGGCTTGATTGTGGG (SEC ID Nº: 25)
CKFOR: Cebador 3'interno a la murina Ck murina	CTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGAC (SEC ID Nº: 26)

Los fragmentos amplificados que codifican las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) se clonaron en plásmidos pCR4-Topo de

Invitrogen que se amplificaron en *E. coli*. Después se secuenció el ADNc clonado en ambas hebras.

Las secuencias proteicas se tradujeron a partir de secuencias codificantes plasmídicas y se calcularon las masas de las cadenas pesada (HC) y ligera (LC) (Tabla 2). Los valores obtenidos estaban en perfecto acuerdo con los datos de espectrometría de masas obtenidos de la preparación de mAb purificada a partir de cultivo del hibridoma correspondiente, véase Tabla 2. Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de HC y LC se indican en la lista de secuencias como sigue: SEC ID Nº 46 y 48 corresponden a la HC del mAb de integrina α2 purificado a partir de sobrenadante de hibridoma y SEC ID Nº 45 y 47 corresponden a la LC de mAb de integrina α2 purificada a partir del sobrenadante de hibridoma.

Tabla 2: Análisis de espectrometría de masas de mAb de integrina α2 de hibridoma

	Cadena	Masa (Da) por LC/MS	Valor *in silico* de masa (Da)
mAb de INTEGRINA α2	LC	23899	23896
	HC	50728 (G0F)	50725 (G0F)

B – Determinación de las secuencias de la CDR de los mAb anti integrina α2.

Las secuencias para las regiones CDR se dedujeron a partir de la secuencia proteica usando la nomenclatura KABAT.

Para la HC, CDR1 corresponde a SEC ID Nº: 3, CDR2 corresponde a SEC ID Nº: 4, CDR3 corresponde a SEC ID Nº: 5.

Para la LC, CDR1 corresponde a SEC ID Nº: 6, CDR2 corresponde a SEC ID Nº: 7, CDR3 corresponde a SEC ID Nº: 8.

C – Generación de plásmidos de expresión de mAb anti integrina α2 quiméricos.

La cadena pesada y ligera variable del mAb anti integrina α2 se generó por PCR, usando el SuperMix AccuPrimePfx (Invitrogen; Cat. Nº: 12344-040) y el ADNc de cadena ligera y pesada de mAb anti integrina α2 respectivamente (para generación de ADNc véase anteriormente). En una reacción de PCR de 25 μl, se

ejecutaron 5 ciclos con los cebadores α2 mAb-VH DIR e INV (cadena pesada) o los cebadores α2 mAb-VL DIR e INV (cadena ligera) (95 ºC, 15 segundos; 62 ºC, 30 segundos; 68 ºC, 1minuto). Para introducir la secuencia líder se usaron 0,5 µl de cada una de las primeras muestras de PCR como un molde para una segunda PCR con Líder DIR 1-54 y los cebadores α2mAB-VL (o –VH) INV usando las mismas condiciones de PCR que para la primera PCR. Finalmente, se usaron 0,5 µl de la segunda PCR como un molde para una tercera PCR realizando 25 ciclos con líder DIR 1-23 y los cebadores de mAb -VL (o –VH) INV de integrina α2 usando las mismas condiciones de PCR que para la primer reacción. Los productos de PCR de la tercera PCR se purificaron usando el kit de purificación de PCR (Qiagen, Cat. Nº 28104) como se describe en el protocolo del kit. Los productos de PCR se clonaron en el pCR2.1-TOPO usando el kit de clonación TOPO TA de Invitrogen (Cat Nº 450001) como se describe en el manual del proveedor y se secuenciaron usando los cebadores directo M13 e inverso M13 incluidos en el kit de clonación.

Las secuencias de la cadena pesada y ligera variable de anticuerpo α2 murino pueden obtenerse a partir de la Figura Nº: 5 refiriéndose SEC ID Nº: 1 a la secuencia de aminoácidos, refiriéndose SEC ID Nº: 12 a la secuencia codificante del dominio variable de cadena ligera, refiriéndose SEC ID Nº: 2 a la secuencia de aminoácidos y refiriéndose SEC ID Nº: 13 a la secuencia codificante del dominio variable de cadena pesada.

El dominio variable ligero (de acuerdo con SEC ID Nº:1) se fusionó con la cadena ligera constante (IGKC, Swiss-Prot: Q502W4), digiriendo la VL con NheI/BsiWI e IGKC BsiWI/HindIII dando lugar a la quimera de cadena ligera VL-IGKC del anticuerpo de α2 de acuerdo con SEC ID Nº: 9 y 14. Esta fusión se ligó en los sitios NheI/HindIII del vector de expresión episomal pXL (Durocher *et al*. (2002), Nucl. Acids Res. 30(2)), E9, creando el plásmido de expresión de mamífero de la cadena ligera de anticuerpo de α2 quimérico “pFF0033_pXLc-AscII-IGKC” como está depositado en DSMZ con el Nº de acceso DSM 23944.

El dominio variable pesado (de acuerdo con SEC ID Nº: 2) se fusionó con una variante mutada de la cadena pesada constante humana (IGHG4, Swiss-Prot P01861, S108P, L115E) dando lugar a la quimera de cadena pesada constante VH-IGHG4 de integrina α2 de acuerdo con SEC ID Nº: 10/15 o para crear un Fab, fusionado con un dominio CH1 marcado con His 6x de la IGHG1 constante humana

(Swiss-Prot: Q569F4) dando lugar a la quimera de Fab de cadena pesada constante VH-IGHG1 de integrina α2 de acuerdo con SEC ID Nº: 11/16. Para este fin, la VH se digirió con NheI/ApaLI y se fusionó con el dominio CH1 marcado con His o IGHG4 digerido con ApaI/HindIII respectivamente. Esta fusión se ligó en los sitios de NheI/HindIII del vector de expresión episomal pXL, creando respectivamente para el plásmido de expresión de mamífero de la cadena pesada de anticuerpo α2 quimérico IgG4 "pFF0036_pXLc-AscII-IGHG4" como está depositado en DSMZ con el acceso DSM 23946 o para el plásmido de expresión de mamífero de la cadena pesada de anticuerpo α2 quimérico-Fab "pFF0035_pXLc-AscII-CH1-Hi" como está depositado en DSMZ con el Nº de acceso DSM 23945.

Los diferentes plásmidos se han depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig con los siguientes números de acceso: DSM 23945 (plásmido para expresión eucariota del fragmento Fab de cadena pesada de anticuerpo anti α2 quimérico), DSM 23946 (plásmido para la expresión de la cadena pesada de IgG4 de anticuerpo anti α2 quimérico) y DSM 23944 (plásmido para la expresión de la cadena ligera IGKC del anticuerpo anti α2 quimérico).

Secuencias de los Cebadores usados anteriormente

	SEC ID Nº:
α2 mAb-VL DIR:	
CTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGCACAGCAACATTGTGCTGACCCAATCTC	27
α2 mAb -VL INV:	
ACCGTACGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCCC	28
α2 mAb mAb-VH DIR:	
CTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGCACAGCCAGGTCCAACTGCATCAGCCTG	29
α2mAB mAb-VH INV:	
TAGGGCCCTTGGTGCTGGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGG	30
Líder para 1-54:	
GCTAGCACCATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCAC	31
Líder para 1-23:	
CAAGCTAGCACCATGGGCTGGTCCTG	32

Ejemplo 2: Propiedades de mAb y Fab anti integrina α2

A – Producción de mAb y fragmentos Fab anti integrina α2 recombinantes

Expresión de moléculas de IgG4 anti integrina α2 y Fab anti integrina α2 quiméricas

Los plásmidos de expresión que codifican la cadena pesada y ligera del anticuerpo se propagaron en *E. coli* DH5a. Los plásmidos usados para la transfección se prepararon a través de *E. coli* usando el Kit Qiagen EndoFree Plasmid Mega.

Se transfectaron células HEK 293-FS que crecían en Medio Freestyle (Invitrogen) con plásmidos LC y HC indicados usando reactivo de transmisión Fugene (Roche). Después de 7 días las células se retiraron por centrifugación y el sobrenadante se pasó sobre un filtro de 0,22 μm para retirar partículas.

Purificación de moléculas de IgG4 anti integrina α2 y Fab anti integrina α2 quiméricas

Se purificó proteína IgG4 por cromatografía de afinidad en proteína A (HiTrap Protein A HP Columns, GE Life Sciences). Después de elución de la columna con tampón de acetato 100 mM con NaCl 100 mM pH 3,5, los anticuerpos monoclonales se desalaron usando columnas de desalación HiPrep 26/10, formuladas en PBS a una concentración de 1 mg/ml y filtradas en 0,22 μm.

Las proteínas Fab se purificaron por IMAC en Columnas HiTrap IMAC HP (GE Life Sciences). Después de la elución de la columna con un gradiente lineal (tampón de elución: fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 50-500 mM, pH 7,4), las fracciones que contenían proteínas se agruparon y se desalaron usando Columnas de Desalación HiPrep 26/10, formuladas en PBS a una concentración de 1 mg/ml y se filtraron a 0,22 μm.

La concentración de proteína se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm. Cada lote se analizó usando un kit Protein 200 Plus LabChip en el bioanalizador Agilent 2100 en condiciones reductoras y no reductoras para determinar la pureza y el peso molecular de cada subunidad y del monómero.

B – Propiedades de unión del mAb o Fab anti integrina α2.

Se usó tecnología de resonancia de plasmón superficial en un Biacore

3000 (GE Healthcare) para caracterización cinética detallada del anticuerpo purificado y el fragmento Fab correspondiente. Se usó un ensayo de unión directa con el anticuerpo o el fragmento Fab anti integrina como ligando y el dominio I de integrina $\alpha 2\beta 1$ como analito. Típicamente, se inmovilizaron 600 UR de anticuerpo o fragmento Fab en una microplaca CM5 de uso en investigación por acoplamiento reactivo de amina, dando como resultado una Rmax de 80 y 140 UR para el dominio I unido al anticuerpo y el fragmento Fab, respectivamente. La cinética de unión se midió sobre un intervalo de concentración entre 0,4 a 28 nM de dominio I en tampón HBS-P complementado con MgCl2 4 mM (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tensioactivo P20 0,005 %) a un caudal de 30 µl/minuto. Las superficies de microplacas se regeneraron con glicina 10 mM pH 2,2. Se analizaron los parámetros cinéticos y se calcularon en el paquete de programas BIAevaluation (versión 4.1) usando una celda de flujo sin anticuerpo o fragmento Fab anti integrina inmovilizado como referencia. Se aplicó un modelo de unión 1:1 con transferencia de masas para un ajuste global de los datos para curvas correspondientes a concentraciones de analitos de 0,4-28 nM del anticuerpo o fragmento Fab.

Tabla 3: Las cinéticas de unión de mAb y fragmento Fab anti integrina $\alpha 2$ contra el dominio I de integrina

Ligando	ka (1/Ms) E+05	kd (1/s) E-04	KD (M) E-10
Anticuerpo	8,6	11,7	13,5
Fragmento Fab	9,9	8,3	8,4

El Fab y mAb de bloqueo presentaron afinidades en el intervalo nanomolar al dominio $\alpha 2\beta 1$ humano (Tabla 3).

Para evaluar adicionalmente las propiedades de unión del mAb anti integrina a2, se realizó un ensayo basado en células con células HUVEC (promocell C12200, lote 6062203). Se recubrieron placas de alta unión con las células (Meso Scale Discovery (MSD), L15XB-3) en PBS (10.000 células/pocillo) y

se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después las placas se vaciaron, se lavaron dos veces con PBS y se bloquearon con solución de bloqueo (MSD, R93BA-4) durante 90 minutos. Después de vaciar y lavar las placas otra vez como se ha descrito anteriormente, se añadieron diluciones seriadas de mAb anti $\alpha 2$ y se incubaron con las células durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de otra etapa de lavado como anteriormente, se añadió tampón de Lectura T sin tensioactivo (Meso scale Discovery, R92TD-2). La electroquimioluminiscencia se leyó en un dispositivo adecuado (Meso scale Discovery, Sector imager). Se usó un análisis de representación de Scatchard para determinar la KD de los mAb ensayados (véase Figura 1).

C – Propiedades de reactividad cruzada del mAb anti integrina $\alpha 2$

El mAb anti integrina $\alpha 2$ se evaluó con respecto a su capacidad para interaccionar específicamente con plaquetas de macaco y hombre por medio de experimentos de FACS usando muestras de sangre o plaquetas humanas. El mAb se incubó con muestras de sangre humana, sangre de macaco o plaquetas humanas y con mAb secundarios acoplados con Ficoeritrina (PE) anti-IgG de ratón de cabra (Beckman Coulter Nº 731856). Las muestras se trataron con Solución de Lisado (BD Nº 349202) y las plaquetas se centrifugaron, se resuspendieron y se analizaron por FACS.

El mAb anti integrina $\alpha 2$ mostró una reactividad similar con muestras sanguíneas de M*acaca fascicularis* (97,3 % de positivos, Figura 4b) que con muestra sanguínea completa humana (>98 % positivos, Figura 4d), mientras que no se ha detectado reactividad contra integrina $\alpha 2\beta 1$ de ratón, rata, perro, cobaya, cerdo o conejo como se ensayó con sangre completa de esas especies (datos no mostrados). Por lo tanto, de acuerdo con los análisis de FACS, parece existir una reactividad cruzada entre especies del anticuerpo con integrina $\alpha 2\beta 1$ de primate en plaquetas de sangre de macaco, mientras que no se ha detectado reactividad cruzada contra integrina $\alpha 2\beta 1$ de ratón, rata, perro, cobaya, cerdo o conejo como se ha ensayado con sangre completa de estas especies.

Ejemplo 3- Humanización y modificación por ingeniería genética del dominio Fv de IgG y Fab anti $\alpha 2$

Humanización

Los modelos de homología 3D de las secuencias VL y VH del anticuerpo mAb anti integrina α2 se construyeron usando la aplicación de modelado de anticuerpos en MOE 2008. Se identificaron varios moldes de PDB para construir los armazones LC y HC y los bucles CDR. Todos los moldes tenían una identidad por encima de 83 % frente a las secuencias de mAb anti integrina α2 de VL y VH, excepto el mejor molde frente al bucle H3 (56 % de identidad). Los modelos de LC y HC resultantes se minimizaron posteriormente con respecto a su energía usando el procedimiento convencional implementado en MOE. Se realizó posteriormente un cálculo dinámico molecular (MD) del modelo de homología 3D minimizado de la VL/VH murina, con restricciones en la cadena principal de proteína y una temperatura de 500 K durante 1,1 nanosegundos en disolvente implícito de Born Generalizado. Se extrajeron 10 conformaciones diversas de este primer ciclo de MD cada 100 ps para el último 1 ns. Se sometió después cada una de estas 10 conformaciones diversas a un MD, sin restricciones en la cadena principal de proteína y a una temperatura de 300K, durante 2, 3 nanosegundos en disolvente implícito de Born Generalizado. Para cada uno de los 10 ciclos de MD, las últimas 2.000 instantáneas, una cada picosegundo, de la trayectoria de MD se usaron después para calcular, para cada aminoácido de mAb anti integrina α2, sus desviaciones del valor cuadrático medio (rmsd) en comparación con una posición medoide de referencia. Comparando la rmsd media de los 10 ciclos de MD separados de un aminoácido dado con la rmsd media global de todos los aminoácidos murinos de mAb anti integrina α2, se decide si el aminoácido es suficientemente flexible, como se ve durante el MD, para considerar que interacciona probablemente con receptores de linfocitos T y responsable de la activación de la respuesta inmune. Finalmente se identifican 64 aminoácidos como flexibles en el anticuerpo mAb anti integrina α2, de los que 34 no se localizan en las CDR o sus alrededores inmediatos (5 Å). Los aminoácidos localizados en la zona "Vernier" tampoco se consideran (J. Mol. Biol. 1992, 224, 487-499).

El movimiento de la mayoría de los 34 aminoácidos de mAb anti integrina α2 (excluyendo la región CDR+5Å), durante los 20 ns (10x2ns), se compara después con el movimiento de los aminoácidos flexibles correspondientes de 49 modelos de homología de línea germinal humanos, para cada uno de los cuales se

ejecutaron las simulaciones de MD de 10x2ns. Los 49 modelos de línea germinal humana se construyeron combinando sistemáticamente las 7 cadenas ligeras de línea germinal humana más habituales (vk1, vk2, vk3, vk4, vlambda1, vlambda2, vlambda3) y las 7 cadenas pesadas de línea germinal humana más habituales (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6). El anticuerpo de línea germinal humana vk1-vh1b mostró una similitud de 4D de 62 % de sus aminoácidos flexibles en comparación con los aminoácidos flexibles del mAb anti integrina α2; el anticuerpo de línea germinal vk1-vh1b se usó por lo tanto para humanizar el anticuerpo mAb anti integrina α2 centrándose en los aminoácidos flexibles. Para la asociación de aminoácidos por parejas entre mAb anti integrina α2 y los aminoácidos de vk1-vh1b, las dos secuencias se alinearon basándose en la superposición tridimensional óptima de los carbonos α de los 2 modelos de homología correspondientes.

Estabilización

Se propone originalmente que los aminoácidos de las cadenas ligera y pesada con baja frecuencia de aparición frente a sus secuencias canónicas respectivas, excluyendo las CDR, se muten a los aminoácidos más frecuentemente hallados ($\Delta\Delta$Gth > 0.5 kcal/mol; [E. Monsellier, H. Bedouelle. Improving the stability of an antibody variable fragment by a combination of knowledge-based approaches: validation and mechanisms. J. Mol. Biol. 2006, 362,580-593]). Una primera lista de mutaciones consenso para la LC y para la HC se ha restringido a los aminoácidos hallados en la línea germinal humana más cercana (es decir vk1-vh1b), es decir a 4 mutaciones potenciales en la LC y 3 en la HC. Ninguna de estas mutaciones se localiza en las CDR, sus alrededores inmediatos (+5 Ángstrom) o en la zona “Vernier” (J. Mol. Biol. 1992, 224, 487-499). Se han tenido en cuenta otros criterios para considerar estas mutaciones consenso para estabilizar potencialmente el anticuerpo anti integrina α2. Estos criterios son un cambio favorable de hidropatía en la superficie o una estabilización predicha basada en la mecánica molecular del mutante.

Humanización por Injerto

La humanización comienza identificando las líneas germinales humanas más cercanas a, respectivamente, las cadenas ligera y pesada de mAb anti

integrina α2. Esto se hace realizando una búsqueda de BLAST frente a todas las líneas germinales humanas que se enumeran sistemáticamente (todas las combinaciones posibles de los dominios V y J para las cadenas kappa y lambda; dominios V, D y J para las cadenas pesadas). Las búsquedas de BLAST se realizaron usando una aplicación de intranet interna.

Las siguientes líneas germinales humanas más cercanas se identificaron con respectivamente 77 % y 68 % de identidad con las cadenas ligera y pesada anti integrina α2:

α2_lc	NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QQKPGQAPKL LIYLASNLAS
IGLKV79_IGLKJ2	DIVLTQSPAS LAVSPGQRAT ITCRASESVS FLGINLIHWY QQKPGQPPKL LIYQASNKDT
α2_lc	GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K
IGLKV79_IGLKJ2	GVPARFSGSG SGTDFTLTIN PVEANDTANY YCLQSKNFPY TFGQGTKLEI K
α2_hc	QVQLHQPGAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR IDPSDSETHY
IGHV11_IGHD33_IGHJ8	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYYMHWVRQA PGQGLEWMGI INPSGGSTSY
α2_hc	NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG RGYFDYWGQG TTLTVSS
IGHV11_IGHD33_IGHJ8	AQKFQGRVTM TRDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARL-TGYFDYWGQG TLVTVSS

IGLKV79_IGLKJ2 corresponde a SEC ID Nº: 49. IGHV11_IGHD33_IGHJ8 corresponde a SEC ID Nº: 50.

Las mutaciones humanizadoras se obtienen realizando una comparación por pares de las 2 secuencias alineadas, excluyendo los restos de zona de Vernier y CDR (numeración de Kabat).

Mutación de motivos de secuencia no deseados

Se consideraron los siguientes motivos de secuencias: Asp-Pro (enlace lábil ácido), Asn-X-Ser/Thr (glucosilación, X = cualquier aminoácido excepto Pro), Asp-Gly/Ser/Thr (formación de iso-asp/succinimida en áreas flexibles), Asn-Gly/His/Ser/Ala/Cys (sitio de desamidación expuestos), Met (oxidación en área

expuesta). Las secuencias humanizadas resultantes se compararon por blast con respecto a similitud de secuencia frente a la base de datos IEDB (http://www.immuneepitope.org/home.do; versión de junio de 2009) para asegurar que ninguna de las secuencias contenga ningún epítopo linfocito T o B conocido.

1. Secuencias originales de los dominios variables anti-integrina a2b1

   a. Cadena ligera (las CDR+5Å están destacadas, un motivo problemático potencial NS en la región CDR subrayado)

NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QQKPGQAPKL LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K

   b. Cadena pesada (las CDR+5Å están destacadas, un sitio problemático en la región CDR [sitio de formación de iso-Asp y succinimida DS] subrayado)

QVQLHQPGAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR IDPSDSETHY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG RGYFDYWGQG TTLTVSS

Secuencias obtenidas por ingeniería genética

Se diseñaron cinco versiones para la cadena ligera (variantes de cadena ligera LC1, LC2, LC3, LC4, LC5) y siete versiones para la cadena pesada (variantes de cadena pesada HC1, HC2, HC3, HC4, HC5, H6, H7). La versión LC1 presenta cuatro mutaciones que derivan de la comparación directa entre los aminoácidos más flexibles no CDR de la cadena ligera de mAb anti-integrina α 2 y la cadena ligera de línea germinal humana VK1. La versión LC2 incluye una mutación adicional para retirar un sitio de desamidación potencial en la región CDR (N34Q). La versión LC3 incluye mutaciones humanizadoras y estabilizadoras que se predice que estabilizan óptimamente la cadena ligera de mAb anti-integrina α2. La versión LC4 incluye una mutación adicional para retirar el sitio de desamidación potencial (N34Q). La versión LC5 presenta 6 mutaciones que derivan del método de injerto.

La versión HC1 presenta 3 mutaciones, que derivan de la comparación directa entre los aminoácidos más flexibles no CDR de la cadena pesada de mAb anti-integrina α 2 y la línea germinal humana VH1b. La versión HC2 incluye otra

mutación adicional para retirar un sitio de formación de Asp-Iso succinimida potencialmente problemático en la región de CDR (D55E). La versión HC3 incluye mutaciones humanizadoras y estabilizadoras que se predice que estabilizan óptimamente la cadena pesada de mAb anti-integrina α 2. La versión HC4 incluye una mutación adicional para afrontar un problema de agregación potencial. La versión HC5 incluye mutaciones de HC3 y una mutación adicional para retirar un sitio de formación de Asp-Iso succinimida potencialmente problemático en la región CDR (D55E). La versión HC6 incluye una mutación adicional para afrontar el problema de agregación potencial. La versión HC7 presenta 20 mutaciones que derivan del método de injerto

En total se han preparado siete combinaciones:

- LC1/HC1 (mutaciones que se dirigen solamente a humanización)
- LC2/HC2 (mutaciones que se dirigen a mutación y sitio potencialmente problemático de LC/HC [NS y DS])
- LC3/HC3 (mutaciones que se dirigen a humanización y estabilización)
- LC3/HC4 (mutaciones que se dirigen a humanización, estabilización y anti-agregación)
- LC4/HC5 (mutaciones que se dirigen a humanización, estabilización, sitio potencialmente problemático de LC [NS] y sitio potencialmente problemático de HC [DS])
- LC4/HC6 (mutaciones que se dirigen a humanización, estabilización, anti-agregación, sitio potencialmente problemático de LC [NS] y sitio potencialmente problemático de HC [DS])
- LC5/HC7 (mutaciones que se dirigen a humanización por injerto)

Tabla 4: sumario de las 7 combinaciones LCxHC

	(LC1) Humanización	LC2 humanización y sitio NS en CDR	LC3 humanización y estabilización	LC4 humanización, sitio NS en CDR y estabilización	LC5 (injerto)
(HC1) Humanización	x				
(HC2) Humanización y DS en CDR		x			
(HC3) Humanización y estabilización			x		
(HC4) Humanización, estabilización y “anti-agregación”			x		
(HC5) Humanización, DS en CDR y estabilización				x	
(HC6) Humanización, estabilización, “anti-agregación” y DS en CDR				x	
HC7 (injerto)					x

Tabla 5: Sumario de las mutaciones introducidas para la cadena ligera obtenida por ingeniería genética del Fab anti-$\alpha 2\beta 1$

Cadena ligera (Numeración secuencial)	(LC1) Humanización	(LC2) humanización y NS en CDR	(LC3) humanización y estabilización	(LC4) humanización, NS en CDR y estabilización	(LC5) injerto
ALA9	SER	SER	SER	SER	
ALA12			SER	SER	
LEU15	VAL	VAL	VAL	VAL	PRO
SER22					THR
ASN34		GLN		GLN	
GLN46	LYS	LYS			
ALA47					PRO
ASP80					ASN
GLU83	GLN	GLN	GLN	GLN	
ASP85			GLU	GLU	
ALA87					THR
THR89					ASN

Tabla 6: Mutaciones de las 7 variantes de HC del anticuerpo anti-integrina α 2

Cadena pesada (Numeración secuencial)	(HC1) Humanización	(HC2) Humanización y DS en CDR	(HC3) Humanización y estabilización	(HC4) Humanización, estabilización y "anti-agregación"·	(HC5) Humanización, DS en CDR y estabilización	(HC6) Humanización, estabilización, "anti-agregación" y DS en CDR	(HC7) injerto
HIS5							VAL
PRO7							SER
LEU11							VAL
VAL12							LYS
PRO17			SER	SER	SER	SER	SER
LEU20							VAL
LYS38							ARG
ARG40							ALA
ARG43	GLN	GLN					GLN
ASP55		GLU			GLU	GLU	
ASN61							ALA
LYS65							GLN
ASP66							GLY
LYS67	ARG	ARG					ARG
SER76							THR
ILE81							MET
GLN82							GLU
THR87							ARG
SER91							THR
VAL93				LYS		LYS	
THR112							LEU
LEU113							VAL
SER116	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL	
	3 mutaciones	4 mutaciones	2 mutaciones	3 mutaciones	3 mutaciones	4 mutaciones	20 mutaciones

Se generaron secuencias variables humanizadas por síntesis génica y se clonaron en los vectores de expresión de cadena pesada y ligera correspondientes como se describe en el Ejemplo 1C.

Secuencias de cadena ligera obtenidas por ingeniería genética

Se clonaron cinco versiones variantes de cadena ligera (LC1, LC2, LC3,

LC4, LC5). Las mutaciones introducidas a través de ingeniería genética de las cadenas variables están destacadas o subrayadas.

LC1 (mutaciones humanizadoras subrayadas en negrita):

NIVLTQSPSS LAVSVGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QQKPGKAPKL LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQADDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K (SEC ID Nº: 33)

LC2 (las mutaciones humanizadoras están destacadas, las mutaciones para el sitio NS de CDR subrayadas):

NIVLTQSPSS LAVSVGQRAT ISCRASESVE SYGQSFIYWY QQKPGKAPKL LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQADDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K (SEC ID Nº: 34)

LC3 (las mutaciones humanizadoras y estabilizadoras están destacadas):

NIVLTQSPSS LSVSVGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QQKPGQAPKL LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQAEDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K (SEC ID Nº: 35)

LC4 (las mutaciones humanizadoras y estabilizadoras están destacadas, la mutación para el sitio NS de CDR subrayada en negrita):

NIVLTQSPSS LSVSVGQRAT ISCRASESVE SYGQSFIYWY QQKPGQAPKL LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQAEDAATY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K (SEC ID Nº: 36)

LC5 (las mutaciones injertadas están destacadas):

NIVLTQSPAS LAVSPGQRAT ITCRASESVE SYGNSFIYWY QQKPGQPPKL LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTIN PVEADDTANY YCQQNNEDPY TFGGGTKLEI K (SEC ID Nº: 37)

A continuación está el alineamiento de la LC anti-integrina $\alpha 2\beta 1$ frente a la línea germinal humana VK1-Vh1b:

LC_anti_a2b1 NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE SYGNSFIYWY QQKPGQAPKL
Vk1LC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS SYLN----WY QQKPGKAPKL

LC_anti_a2b1 LIYLASNLAS GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPY
Vk1LC LIYAASSLQS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDLATY YCQQSYSTPP

LC_anti_a2b1 TFGGGTKLEI K-
Vk1LC TFGQGTKVEI KR (SEC ID Nº: 51)

Secuencias de cadena pesada obtenidas por ingeniería genética

Se clonaron siete versiones de variantes de cadena pesada (HC1, HC2, HC3, HC4, HC5, HC6, HC7). Las mutaciones introducidas a través de ingeniería genética de las cadenas variables están destacadas.

HC1 (mutaciones humanizadoras destacadas):

QVQLHQPGAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGQGLEWIGR IDPSDSETHY NQKFKDRATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG RGYFDYWGQG TTLTVVS (SEC ID Nº: 38)

HC2 (las mutaciones humanizadoras están destacadas, motivos potencialmente problemáticos [sitio DS de CDR]):

QVQLHQPGAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGQGLEWIGR IDPSESETHY NQKFKDRATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG RGYFDYWGQG TTLTVVS (SEC ID Nº: 39)

HC3 (las mutaciones humanizadoras y estabilizadoras destacadas):

QVQLHQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR IDPSDSETHY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG RGYFDYWGQG TTLTVVS (SEC ID Nº: 40)

HC4 (las mutaciones humanizadoras y estabilizadoras están destacadas, mutación anti-agregación):

QVQLHQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR IDPSDSETHY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAKYYCAKVG RGYFDYWGQG TTLTVVS (SEC ID Nº: 41)

HC5 (las mutaciones humanizadoras y estabilizadoras están destacadas, motivos potencialmente problemáticos [sitio DS de CDR]):

QVQLHQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR IDPSESETHY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG RGYFDYWGQG TTLTVVS (SEC ID Nº: 42)

HC6 (las mutaciones humanizadoras y estabilizadoras están destacadas, motivos potencialmente problemáticos [sitio DS de CDR], *mutación anti-agregación*):

QVQLHQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR IDPSESETHY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SA*K*YYCAKVG RGYFDYWGQG TTLTVVS (SEC ID Nº: 43)

HC7 (las mutaciones injertadas están destacadas):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGR IDPSDSETHY AQKFQGRATL TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAKVG RGYFDYWGQG TLVTVSS (SEC ID Nº: 44)

A continuación está el alineamiento de mAb anti-integrina α21 de HC frente a la línea germinal humana Vk1_Vh1b:

```
HC2_anti_α2   QVQLHQPGAE LVKPGAPVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGRGLEWIGR
Vh1b          QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYYMHWVRQA PGQGLEWMGW
HC2_anti_α2   IDPSDSETHY NQKFKDKATL TVDKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCAKVG
Vh1b          INPNSGGTNY AQKFQGRVTM TRDKSSSTAY MELSSLRSED TAVYYCARWG
HC2_anti_α2   RGY------F DYWGQGTTLT VSS
```

Vh1b YDYDVFYYAM DYWGQGTLVT VSS (SEC ID Nº: 52)

Las cadenas pesada y ligera variables de cada variante de mAb anti-integrina α2 (5 cadenas ligeras diferentes: VL1-VL5 y 7 siete cadenas pesadas diferentes: VH1-VH7) se generaron por síntesis génica incluyendo una secuencia 5'UTR (5'-GTGCACAGC-3') con ApaLI y una 3'UTR (5'-GCTTCCACCAAGGGCCC-3') con ApaI (cadena pesada) o BsiWI (cadena ligera). Los dominios pesados variables se ligaron a los sitios ApaLI/ApaI de un vector de expresión pXL modificado que contiene una variante mutada de la cadena pesada constante humana (IGHG4, Swiss-Prot P01861, S108P, L115E) dando lugar a un mAb de cadena pesada constante VH-IGHG4 anti-integrina α2.

Los dominios ligeros variables se ligaron a los sitios ApaLI/BsiWI de un vector de expresión pXL modificado que contiene la cadena ligera constante humana (IGKC, Swiss-Prot: Q502W4) dando lugar a un mAb de cadena ligera constante VL-IGKC anti-integrina α2. El procedimiento completo de síntesis génica, clonación y producción de ADN se realizó por un proveedor comercial (Geneart AG).

Para comparación, se usó un anticuerpo anti-integrina alfa-2 hIgG4 humanizado conocido en la técnica (TMC2206) ("el comparador"). Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y pesada del comparador se enumeran en la presente memoria como SEC ID Nº: 53 y 54 en la Figura 10e.

Tabla 7: Lista de variantes de humanización de mAb anti-integrina α_2

Combinación LC/HC	Variante de humanización
LC1/HC1	Mutaciones que se dirigen solamente a humanización
LC2/HC2	Mutaciones que se dirigen solamente a humanización y sitios potencialmente problemáticos de LC/HC (NS; DS)
LC3/HC3	Mutaciones que se dirigen a humanización y estabilización
LC3/HC4	Mutaciones que se dirigen a humanización, estabilización y anti-agregación
LC4/HC5	Mutaciones que se dirigen a humanización y estabilización y sitios potencialmente problemáticos de LC/HC (NS; DS)
LC4/HC6	Mutaciones que se dirigen a humanización, estabilización, anti-agregación y sitios potencialmente problemáticos de LC/HC (NS; DS)
LC5/HC7	Mutaciones que se dirigen a humanización por injerto
TMC2206	Comparador de acuerdo con SEC ID Nº: 53

Para verificar las secuencias, los mAb se analizaron usando espectrometría de masas. Para mediciones de masa intactas la muestra se atrapó durante 20 minutos y se desaló con 20 μl/min en una columna de trampa monolítica con Acetonitrilo 2 %/TFA 0,1 % (v/v) antes de elución con un gradiente que variaba de Eluyente A 15 % (H2O/TFA 0,05 %) a Eluyente B 50 % (Acetonitrilo/TFA 0,05 %).

La muestra se separó actuando en nanoflujo (300 nl/min) en una columna monolítica (PS-DVB; 100 μm I.D. x 5 cm) con una temperatura de 37 °C. La introducción de la muestra se llevó a cabo usando agujas de electropulverización de nuevo objetivo con un diámetro exterior de 365 μm, diámetro interior de 75 μm y un diámetro del extremo de la punta de 15 μm más gas de protección. Después de la adquisición los espectros se sumaron sobre el intervalo temporal correspondiente y se sometieron a desconvolución usando la herramienta de reconstrucción

proteica suministrada con BioAnalyst de Applied Biosystems/MDS Sciex.

Se tradujeron secuencias proteicas de secuencias codificantes de plásmido y se calcularon las masas de HC y LC (Tabla 8).

Tabla 8: Análisis espectrométrico de masas de los mAb anti-integrina α_2 humanizados purificados.

Combinación de LC/HC	Cadena Ligera			Cadena pesada		
	Da esperado	Da medido	ppm	Da esperado (G0F)	Da medido	ppm
LC1/HC1	**23727,38**	**23724,56**	**119**	**50314,47**	**50311,80**	**53**
LC2/HC2	**23741,41**	**23738,26**	**130**	**50328,5**	**50327,52**	**19**
LC3/HC3	**23757,36**	**23753,89**	**146**	**50304,47**	**50301,96**	**50**
LC3/HC4	**23757,36**	**23754,17**	**134**	**50333,52**	**50331,29**	**44**
LC4/HC5	**23771,39**	**23769,87**	**64**	**50318,5**	**50317,68**	**16**
LC4/HC6	**23771,39**	**23768,13**	**137**	**50347,54**	**50350,26**	**54**
LC5/HC7	**23792,41**	**23789,01**	**142**	**50187,3**	**50184,84**	**49**
TMC2206	**23378,01**	**23374,51**	**150**	**50237,54**	**50233,48**	**81**

Los valores observados estuvieron en concordancia con las masas calculadas y verifican las construcciones clonadas.

Ejemplo 4 – Evaluación de mAb de integrina α2 en ensayos basados en células y bioquímicos *in vitro*

Para el Ensayo de Fase Sólida, se inmovilizó integrina (dominio α_2-I: dominio α_2-I GST aminoácidos 140-339 en TBS/Mn^{2+} 5 mM, 50 µl/pocillo) en una placa de 96 pocillos (Corning Costar, 3690), a temperatura ambiente durante una noche. Después, se añadió solución de bloqueo 25 µl/pocillo (BSA 5 % (en bruto) (A7906), TBS 1x) y se descartó. Se añadieron 200 µl/pocillo de solución de bloqueo y se dejaron durante 3 h a temperatura ambiente. Después de una etapa de lavado (3 veces con tampón de lavado 200 µl/pocillo: TBS 1x y BSA 0,1 % (A7638) y Mn^{2+} 2mM; TBS: NaCl 150 mM, Tris 25 mM (Fluka 93371) pH 7,4), las muestras se incubaron a TA durante 3 h en reposo con 50 µl de:

a) colágeno biotinilado solamente - control (10 μl de tampón de unión y 40 μl de colágeno biotinilado)

b) 10 μl/pocillo de compuesto, 40 μl/pocillo de colágeno biotinilado

c) Blanco: 50 μl/pocillo de tampón de unión

Después de una etapa de lavado (3 veces con 200 μl/pocillo de tampón de unión), las muestras se incubaron con 50 μl/pocillo de Peroxidasa ExtrAvidin (conjugado de Peroxidasa, Sigma E2886; 1:500 en tampón de unión) durante 30 minutos a TA y se lavaron de nuevo 4 veces con 200 μl/pocillo de tampón de unión. Después de la adición de 50 μl/pocillo de sustrato de peroxidasa (solución ABTS; ácido 2,2'-Azino-bis 3-Etilbenztiazolin-6-sulfónico), Sigma A-1888; 275 μl (11 mg de ABTS disueltos en 0,5 ml de dH_2O; y 5,5 ml de acetato sódico 0,1 M (Sigma S-3272)/NaH_2PO_4 0,05 M (Riedel de Haen 04270) pH 5,0; y 55 μl de H_2O_2 Sigma H-1009 (10 μl (= 30 %) y 1045 μl de dH_2O) durante 10 - 30 minutos a TA, en reposo (hasta que se obtuvo una tinción verde) y adición de 50 μl/pocillo de SDS 2 %, se leyó la absorbancia a 405 nm (SpectraMax 190). El % de inhibición se calculó como 100-((valor medio de los compuestos *100)/valor medio del control positivo de colágeno) después de la resta del blanco.

Tabla 9: Inhibición de interacción de colágeno por mAb de integrina α 2

Ensayo	Interacción de α2β1-colágeno	Interacción de dominio α2-I-colágeno	Interacción de α2β1-colágeno (HSA 4 %)	Adhesión de plaqueta humana estática a colágeno (PLT lavado)	Adhesión de plaqueta humana estática a colágeno (PRP)	Adhesión de plaqueta humana a colágeno en cizallamiento (sangre completa) 3000 s-1
CI50 de IgG4 (μg/ml)	0,05	0,2	nd	0,017	0,3	nd
CI50 de IgG4 (nM)	0,3	1,5	nd	0,1	6,7	nd
CI50 de Fab (μg/ml)	0,2	nd	0,4	0,04	0,3	0,06
CI50 de Fab (nM)	4,2	nd	8,2	0,8	6,7	1,3

En resumen, el mAb de integrina α 2 no mostró efecto en la interacción de $\alpha 1\beta 1$/colágeno (ensayo de fase sólida), interacción de $\alpha 5\beta 1$/fibronectina (ensayo de fase sólida), activación de aIIbb3 (GPIIbIIIa) (ensayo de FACS), expresión de selectina P en hu plt (ensayo de FACS), agregación de plaquetas humanas en sangre completa sola o después de estimulación con ADP, TRAP, colágeno, liberación de LDH-, TNFα-, o IL1β -de PBL hu (solo o en combinación con LPS).

Formación de longitud de túbulos de Huvec

Para valorar la actividad del mAb anti-integrina $\alpha 2$ en la angiogénesis se realizó un ensayo *in vitro* con células HUVEC. Se mezcló Matrigel (BD Biosciences, nº 354230) con colágeno de tipo I (BD Biosciences nº 35429) (matrigel 1/3,25, PBS 5x 1/5, colágeno I 1 mg/ml, agua qsp) y se incubó durante 1 h a 37 °C, CO2 5 %. Las células HUVEC adherentes se separaron cuidadosamente de los matraces de cultivo con solución de Accutase, se centrifugaron y se suspendieron en medio de cultivo (EBM, FCS 2 %, kit de bala EGF) a 1,2 105 células/ml. Se añadieron 100 μl de la suspensión celular a los pocillos con la matriz en presencia o ausencia de diluciones seriadas de mAb anti-$\alpha 2$ y FGF2 (Peptrotech, 10 ng/ml) y se incubaron durante 18 h a 37 °C, CO2 5 %. Para la detección de formación de túbulos se añadió solución de violeta de cresilo y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. La formación de túbulos se determinó midiendo la suma de la longitud de los túbulos por pocillo. Se realizaron cálculos frente al control negativo (sin FGF2) y controles positivos (con FGF2 pero sin mAb anti-a2) usando software Image Proand (MediaCybernetics), midiendo 6 réplicas por condición. Los resultados consecuentes se muestran en la Figura 2. El mAb anti-integrina alfa2 fue capaz de inhibir la angiogénesis inducida por FGF2 de una manera dependiente de dosis.

Ejemplo 5 – Inhibición de adhesión de plaquetas a colágeno por mAb-Fab anti-integrina $\alpha 2$ en condiciones de flujo y estáticas.

Para estudios de interacción proteína-proteína se recubrieron placas de 96 pocillos (Corning Costar 3690) con integrina $\alpha 2\beta 1$ expresada de forma recombinante o el dominio I de la integrina $\alpha 2\beta 1$ en tampón TBS durante una noche a 4 °C. Después de retirar por lavado la proteína excesiva, las placas se

bloquearon con solución de BSA (Sigma A7906 5 %) y se lavaron de nuevo. Se añadieron diluciones en serie de mAb de integrina α2 a las placas así como colágeno biotinilado (cola de rata, Sigma C8897). Esto se realizó en presencia o ausencia de HSA 4 %. Después de una incubación de 2 h a temperatura ambiente las placas se lavaron de nuevo. Se añadió solución de peroxidasa Extravidin (Sigma E2886) y las placas se incubaron durante 20 minutos en oscuridad. Se realizó medición en un lector de Elisa (SpectraMax190 Molecular Devices) a 405 nM. El porcentaje de inhibición y las CI50 se calcularon frente a patrones conocidos.

Para estudios de unión de plaquetas con colágeno, las placas (Isoplate, Perkin Elmer, F1450 571) se recubrieron con colágeno (Sigma C8897) en TBS durante 1 h a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron con TBS repetidamente antes de que se añadieran diluciones seriadas de mAb anti-integrina α2. Se añadieron plaquetas humanas aisladas o plasma rico en plaquetas humanas de nueva preparación, que se anticoagularon con hirudina, PGE1 y ReoPro y se marcaron con Calceína AM (C-3099 Molecular Probes) y se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Después de lavar, las placas se midieron en un lector M5 (Molecular Devices) a 492 nm EX, 535 nm EM. El porcentaje de inhibición y las CI50 se calcularon frente a patrones conocidos.

En experimentos con cizallamiento, se analizó mAb anti-integrina α2 con respecto a su capacidad para inhibir la adhesión de plaquetas a colágeno en flujo. Se recubrieron capilares de vidrio con colágeno durante una noche a 4 °C. Después de lavar y bloquear con BSA, se instalaron en un dispositivo de flujo. Se marcó sangre humana anticoagulada recién extraída de voluntarios con DiOC6(3) y se incubó durante 10 minutos con diluciones en serie de mAb anti-integrina α2 a 37 °C. Se hizo fluir a las muestras a través de los capilares a una tasa de cizallamiento de 3000s-1 imitando el flujo arterial. Después de aclarar los capilares, se tomaron 10 imágenes que representan la superficie del capilar que estaba en contacto con la sangre en flujo. Usando un software de formación de imágenes, se determinó la cobertura de superficie y el porcentaje de inhibición y CI50 se calcularon frente a patrones conocidos.

Para el ensayo de adhesión de trombocitos, se enriquecieron trombocitos como sigue: se centrifugó Hirudina (Refludan 20 μg/ml; (Pharmion)) y sangre a 150

g durante 20 minutos para producir sangre humana anticoagulada. Se recogió plasma rico en plaquetas (PRP) y se centrifugó de nuevo y se recogió como anteriormente. Se obtuvo plasma pobre en plaquetas de la sangre restante por centrifugación a 1940 g durante 10 minutos (2 veces). Se añadió PPP a las células diluidas (Mg 2 mM) y se ajustó la concentración de células a 2 x 10^5/µl. Se dejaron las células durante 0,5 horas y se diluyeron a 5x10^4/µl. A continuación las células se pusieron en contacto con ReoPro 3 µg/ml (2,5 µg/ml; Centocor B.V., Leiden, NL) (10 min, TA), se añadió $MnCl_2$x4H_2O 6 mM (5 mM) (incubación durante 10 minutos).

Se prepararon placas como sigue: se incubaron placas (Perkin Elmer, IsoPlate, 1450-571) con 100 µl/pocillo de colágeno de Tipo I 10 µg/ml (Tipo I de reserva de Sigma C8897 de cola de rata 200 µg/ml en ácido acético 0,01 M) a TA durante 1 hora. Después, se lavaron 3 veces con 200 µl/pocillo de TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 120 mM, KCl 2,7 mM, $CaCl_2$ 0,05mM, $MgCl_2$ x 6 H_2O 2 mM, BSA 0,1 %. A continuación, se añadieron 10 µl/pocillo de compuesto y trombocitos tratados con ReoPro- y Mn (5x10^4 células/µl, 50 µl/pocillo). Las células se incubaron durante 1,5 horas (oscuridad) y se lavaron 3 veces con 200 µl/pocillo de TBS. Se añadió calceína AM 2,5 µM (50 µl/pocillo, C-3099, Molecular Probes, PM 994,87, 30 minutos, TA), seguido de una etapa de lavado. La etapa de lectura se llevó a cabo usando un SpectraMax M5: Fluorescencia EX 492 EM 535 Punto de corte: 530 Automático en ausencia de células. El porcentaje de inhibición se calculó como 100-((valor medio de los compuestos*100)/valor medio del control) después de restar el blanco.

Como puede observarse a partir de la figura 3, el mAb anti-integrina α2 inhibe de forma dependiente de dosis la adhesión de plaquetas en estrés de cizallamiento, con una CI50 nanomolar

Ejemplo 6 – Comportamiento de agregación de mAb anti-integrina α2 según se determina por cromatografía de exclusión de tamaño

Todas las variantes humanizadas y el comparador se ensayaron con respecto al porcentaje de reacción. Se realizó cromatografía de exclusión de tamaños en un explorador ÄKTA 10 (GE Healthcare) usando una columna TSKgel

G3000SWXL (7,8 mm ID x 30,0 cm L, TosohBioscience) con una precolumna TSKgel SWXL (TosohBioscience). Se inyectaron 30 µl de la muestra a 0,4-1 mg/ml y la cromatografía se realizó a 1 ml/min usando Na_2SO_4 100 mM, Na_2HPO_4 100 mM, NaN_3 0,05 %, pH 6,7 como tampón de ejecución y un longitud de onda de detección de 280 nm. La columna se calibró usando marcadores de peso molecular de filtración en gel (Sigma Aldrich). Se realizó una evaluación de los datos usando software Unicorn v5.11 (GE Healthcare).

Tabla 10: Porcentaje de agregación de mAb anti-integrina α_2 determinado por cromatografía de exclusión de tamaños

Combinación de LC/HC	Agregación [%]	Altura pico [mAU]
LC1/HC1	< 0,5	74,4
LC2/HC2	< 0,5	47,8
LC3/HC3	< 0,5	93,7
LC3/HC4	2,3	67,2
LC4/HC5	1,8	67,9
LC4/HC6	< 0,5	29,1
LC5/HC7	< 0,5	46,5
TMC2206	11,8	20,7

Como puede observarse a partir de la tabla 10, todas las variantes ensayadas del mAb de integrina alfa-2 tienen un bajo porcentaje de agregados. Cuando se compararon con el comportamiento de agregación del comparador, todos los anticuerpos de integrina alfa-2 ensayados mostraron valores de porcentaje de agregación menores que el comparador.

Ejemplo 7 – Datos de unión cinética de mAb anti-integrina α_2 determinados por Biacore

Se usó tecnología de resonancia de plasmón superficial en un Biacore 3000

(GE Healthcare) para una caracterización cinética detallada de los anticuerpos humanizados purificados. Se usó un anticuerpo de captura con el anticuerpo anti-integrina capturado por un anticuerpo específico anti-Fc humano (MAB1302, Millipore) y se usó el dominio I de integrina α_2 como analito. Típicamente, se capturaron 120 UR de anticuerpo anti-integrina en CM5 de uso en investigación por el anticuerpo específico anti- Fc humano inmovilizado, dando como resultado una Rmax de 30 UR para el dominio I unido al anticuerpo. El cinética de unión se midió sobre un intervalo de concentraciones entre 0,8 y 25 nM del dominio I en tampón HBS-P complementado con $MgCl_2$ 4 mM (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, tensioactivo P20 0,005 %) a un caudal de 30 µl/min. Se regeneraron las superficies de microplacas con glicina 10 mM, pH 2,5. Se analizaron los parámetros cinéticos y se calcularon en el paquete de programas BIAevaluation (versión 4.1) usando una celda de flujo con el anticuerpo específico anti- Fc humano como referencia. Se aplicó un modelo de unión 1:1 con transferencia de masas para un ajuste global de los datos para las curvas correspondientes a las concentraciones de analitos de anticuerpo 0,8-25 nM.

Tabla 11). Tres variantes tienen una K_D similar en Biacore que el mAb no humanizado:

- combinación LC1/HC1 (Mutaciones que se dirigen solamente a humanización)
- combinación LC3/HC3 (Mutaciones que se dirigen a humanización y estabilización)
- combinación LC3/HC4 (Mutaciones que se dirigen a humanización, estabilización y anti-agregación).

La mutación variante por injerto es cercana al mAb no humanizado.

Ejemplo 8 – Determinación de epítopos de anticuerpo anti-integrina alfa 2

Para verificar el epítopo del mAb anti-alfa 2 no humanizado con el mAb comparador se realizó caracterización de epítopos usando tecnología de resonancia de plasmón superficial en un Biacore 3000 (GE Healthcare). El fragmento Fab correspondiente al mAb anti-alfa 2 no humanizado se inmovilizó en una microplaca CM5 por acoplamiento reactivo de amina a 500 UR. El dominio I de

integrina se capturó por el fragmento Fab a 10 μl/min y después de un periodo corto de disociación, se permitió que el anticuerpo TMC2206 se uniera a 30 μl/min al dominio I de α_2. Se realizó regeneración con tampón de glicina 10 mM, pH 2,0. En un segundo experimento se capturó el mAb comparador TMC2206 en una superficie de anticuerpo específico anti- Fc humano (MAB1302 Millipore). Después se unió el dominio I de integrina seguido del Fab no humanizado. Los resultados pueden obtenerse de las figuras 13 y 14. Los resultados claramente muestran que el anticuerpo comparador TMC2206 se une al dominio I de integrina preunido por Fab no humanizado.

Por lo tanto, el Fab no humanizado se une al dominio I de integrina que está preunido por el mAb comparador TMC2206. La unión simultánea del Fab no humanizado y el mAb comparador con el dominio I de integrina α_2 indica que el epítopo de tanto el Fab como el mAb comparador no son idénticos. Esto indica que el anticuerpo anti-alfa 2 de la presente invención y el anticuerpo comparador son diferentes epítopos dentro de la integrina alfa-2.

Ejemplo 9 – Ensayo de unión de plaquetas en condiciones estáticas usando placas recubiertas con colágeno y plaquetas lavadas o plasma rico en plaquetas.

Como la integrina $\alpha 2\beta 1$ se expresa en plaquetas de sangre, desempeñando un papel importante en su adhesión a colágeno, se usó un sistema de ensayo *in vitro* para estudios de unión de plaquetas usando estas células. Para estudios de unión de plaquetas, se recubrieron placas (Isoplate, Perkin Elmer, F1450 571) con colágeno (Sigma C8897) en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron con TBS repetidamente antes de que se añadieran diluciones en serie de mAb anti-integrina $\alpha 2$. Se añadieron plasma con plaquetas humano de nueva preparación o plaquetas humanas recién aisladas, que se anticoagularon con hirudina, PGE1 y ReoPro y se marcaron con Calceína AM (C-3099 Molecular Probes) y se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. Después de lavar, las placas se midieron en un lector M5 (Molecular Devices) a 492 nm de Excitación, 535 nm de Emisión. El porcentaje de inhibición y las CI50 se calculan frente a curvas de valoración preparadas usando moléculas pequeñas inhibidoras de integrina alfa 2 o el mAb de alfa 2 no humanizado. Los resultados pueden obtenerse a partir de la Tabla 12.

Tabla 12: Inhibición de la unión de plaquetas lavadas con colágeno

Combinación de LC/HC	CI50 μg/ml
LC1/HC1	0,021
LC2/HC2	0,092
LC3/HC3	0,012
LC3/HC4	0,016
LC4/HC5	0,057
LC4/HC6	0,068
LC5/HC7	0,031
TMC2206 (comparador)	0,023

Como puede observarse a partir de los resultados mostrados en la Tabla 12, la inhibición de plaquetas presentada por las diferentes variantes de anticuerpo anti- alfa 2 en condiciones estáticas usando plaquetas lavadas es comparable a la del anticuerpo comparador y para algunas variantes (LC3/HC3 o LC3/HC4) incluso significativamente o ligeramente (LC1/HC1) más fuerte.

Tabla 13: Inhibición de la unión de plaquetas a colágeno en plasma rico en plaquetas

Combinación de LC/HC	PM CI50 μg/ml
LC1/HC1	0,277
LC2/HC2	3,963
LC3/HC3	0,132
LC3/HC4	0,193
LC4/HC5	3,251
LC4/HC6	4,113
LC5/HC7	0,224
TMC2206	0,110

Como puede observarse a partir de los resultados mostrados en la tabla 13, la inhibición de plaquetas presentada por las diferentes variantes del anticuerpo anti- alfa 2 en condiciones estáticas usando plasma rico en plaquetas, variantes

LC1/HC1, LC3/HC3, LC3/HC4 y LC5/HC7 es comparable a la del anticuerpo comparador.

Como puede concluirse a partir de los ensayos de unión de plaquetas estáticos, las formas humanizadas del anticuerpo anti-integrina α_2 bloquea la adhesión de plaquetas humanas recién aisladas en presencia o ausencia de plasma sanguíneo de una manera dependiente de concentración. Cuatro de las variantes muestran una actividad inhibidora similar en el bioensayo que el mAb no humanizado:

- combinación LC1/HC1 (Mutaciones que se dirigen solamente a humanización)
- combinación LC3/HC3 (Mutaciones que se dirigen a humanización y estabilización)
- combinación LC3/HC4 (Mutaciones que se dirigen a humanización, estabilización y anti-agregación)
- combinación LC5/HC7 (Mutaciones que se dirigen a humanización por injerto)

Las tres variantes que se dirigen a los sitios problemáticos (NS; DS) LC2/HC2, LC4/HC5 y LC4/HC6 y que muestran inhibición de plaquetas menor en los experimentos de unión a plaquetas anteriores eran idénticas a las variantes que mostraban actividad de unión a dominio I de alfa 2 más débil que el anticuerpo anti-integrina alfa 2 no humanizado en los anteriores experimentos de Biacore del Ejemplo 7 (véase tabla 11). Por lo tanto, los resultados de los ensayos de unión de plaquetas concuerdan bien con los datos de afinidad de las evaluaciones de Biacore.

Ejemplo 10 – Estabilidad térmica de las diferentes variantes de anticuerpo anti- alfa 2

Los resultados con respecto a estabilidad térmica se resumen en la Tabla 14. Los anticuerpos muestran estabilidad térmica comparable, igual o mejor que el comparador. Las mediciones de termoestabilidad se realizan usando un termociclador de PCR (My-IQ – dos) en un intervalo de temperatura entre 10 y 90 °C con 1 ºC/min. Se complementaron 2 microgramos de anticuerpos diluidos en tampón PBS con Naranja 40XSYPRO (Invitrogen).

Tabla 14: estabilidad térmica de las diferentes variantes

Combinación de LC/HC	Temp. de fusión °C (1)	Temp. de fusión °C (2)
LC1/HC1	64	-
LC2/HC2	63	-
LC3/HC3	64	68
LC3/HC4	66	-
LC4/HC5	62	67
LC4/HC6	66	-
LC5/HC7	65	72
TMC2206 (comparador)	65	71

REIVINDICACIONES

1. Péptido o complejo peptídico, preferentemente anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho péptido o complejo peptídico, anticuerpo o fragmento se unen específicamente al dominio I de la integrina α2 humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento un dominio de región variable de la cadena pesada (VH) y un dominio de región variable de la cadena ligera (VL), en el que dicho anticuerpo o fragmento presenta reactividad cruzada con integrina α2 no humana de primate pero no presenta reactividad cruzada con integrina α2 que no sea de primate.

2. Péptido o complejo peptídico, preferentemente anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho péptido o complejo peptídico, anticuerpo o fragmento se unen específicamente al dominio I de la integrina α2 humana, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento un dominio de región variable de la cadena pesada (VH) y un dominio de región variable de la cadena ligera (VL), en el que dicho anticuerpo o fragmento compite con un anticuerpo de referencia por la unión al epítopo del anticuerpo de referencia, comprendiendo dicho anticuerpo de referencia una cadena ligera codificada por el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de adhesión DSM 23944 y una cadena pesada codificada por (i) el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de adhesión DSM 23946 o bien (ii) el plásmido que está depositado en la DSMZ con el Nº de adhesión DSM 23945.

3. Péptido o complejo peptídico, preferentemente anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende uno o más de los siguientes componentes a) a f):

a) LCDR1, en el que LDR1 es RASESVESYGNSFIY (SEC ID Nº 6) o una variante funcionalmente activa de la misma,

b) LCDR2, en el que LDR2 es LASNLAS (SEC ID Nº 7) o una variante funcionalmente activa de la misma,

c) LCDR3, en el que LDR3 es QQNNEDPYT (SEC ID Nº 8) o una variante funcional activa de la misma,

d) HCDR1, en el que HDR1 es (GYTFTSYWMN, SEC ID Nº 3) o una variante funcionalmente activa de la misma,

e) HCDR2, en el que HDR2 es RIDPSDSETHYNQKFK (SEC ID Nº 4) o una variante funcionalmente activa de la misma, y

f) HCDR3, en el que HDR3 es VGRGYFDY (SEC ID Nº 5) o una variante funcional activa de la misma,

y en el que el uno o más de los componentes a) a f) se disponen para permitir la unión del péptido o complejo peptídico a la integrina α2.

4. Péptido o complejo peptídico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-3,

(i) en el que los componentes a) a c) están comprendidos en un dominio variable de una cadena ligera (VL); y/o

(ii) en el que los componentes d) a f) están comprendidos en un dominio variable de una cadena pesada (VH); y/o

(iii) en el que el péptido o complejo peptídico es un anticuerpo; y/o

(iv) en el que el péptido o complejo peptídico es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un Fab, un Fab', un F(ab')2, un Fv, un Fv unido por puente disulfuro, un scFv, un $(scFv)_2$, un anticuerpo de dominio único, un dianticuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo específico doble, un anticuerpo de isotipo, un anticuerpo de dominio variable doble y un anticuerpo biespecífico; y/o

(v) en el que el péptido o complejo peptídico comprende un dominio constante de inmunoglobulina de la cadena pesada seleccionado entre el grupo que consiste en: un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgGl humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgE humana y un dominio constante de IgA humana; y/o

(vi) en el que la variante funcionalmente activa es un fragmento funcionalmente activo que consiste en al menos 90 % de identidad de

secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEC ID Nº 3 a 8; y/o

(vii) en el que la variante funcionalmente activa es una variante funcionalmente activa que tiene al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEC ID Nº 3 a 8, particularmente en el que la variante funcionalmente activa deriva de una o más sustituciones conservativas de aminoácidos en las secuencias de aminoácidos de cualquiera de SEC ID Nº 3 a 8; y/o

(viii) que comprende la secuencia de aminoácidos de:

- SEC ID Nº 1, o una variante funcionalmente activa de la misma, y/o
- SEC ID Nº 2, o una variante funcionalmente activa de la misma, y/o
- SEC ID Nº 9, o una variante funcionalmente activa de la misma, y/o
- SEC ID Nº 10, o una variante funcionalmente activa de la misma, y/o
- SEC ID Nº 11, o una variante funcionalmente activa de la misma, o

(ix) que comprende la secuencia de aminoácidos de:

- SEC ID Nº 1, o una variante funcionalmente activa de la misma, y
- SEC ID Nº 2, o una variante funcionalmente activa de la misma, y
- opcionalmente 50 restos de aminoácido adicionales, preferentemente de 1 a 40, más preferentemente de 1 a 30, incluso más preferentemente como máximo de 1 a 25, todavía más preferentemente como máximo de 1 a 10, lo más preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 restos de aminoácido adicionales o

(x) que comprende la secuencia de aminoácidos de:

- SEC ID Nº 9, o una variante funcionalmente activa de la misma, y
- SEC ID Nº 10, o una variante funcionalmente activa de la misma, y
- opcionalmente 50 restos de aminoácido adicionales, preferentemente de 1 a 40, más preferentemente de 1 a 30, incluso más preferentemente como máximo de 1 a 25, todavía

más preferentemente como máximo de 1 a 10, lo más preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 restos de aminoácido adicionales o

(xi) que comprende la secuencia de aminoácidos de:

- SEC ID Nº 9, o una variante funcionalmente activa de la misma, y
- SEC ID Nº 11, o una variante funcionalmente activa de la misma, y
- opcionalmente 50 restos de aminoácido adicionales, preferentemente de 1 a 40, más preferentemente de 1 a 30, incluso más preferentemente como máximo de 1 a 25, todavía más preferentemente como máximo de 1 a 10, lo más preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 restos de aminoácido adicionales.

5. Péptido o complejo peptídico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 - 4;

- en el que la variante funcionalmente activa de LDR1 comprende una mutación en el aminoácido en la posición 11, particularmente 11Asn→Gln; y/o
- en el que la variante funcionalmente activa de HDR2 comprende una mutación en el aminoácido de la posición 6, particularmente 6Asp→Glu; y/o
- en el que la variante funcionalmente activa de SEC ID Nº 1 comprende una o más mutaciones en los aminoácidos en las posiciones 9, 12, 15, 22, 34, 46, 47, 80, 83, 85, 87 y/o 89, seleccionadas particularmente entre el grupo que consiste en 9Ala→Ser, 12Ala→Ser, 15Leu→Val, 15Leu→Pro, 22Ser→Thr, 34Asn→Gln, 46Gln→Lys, 47Ala→Pro, 80Asp→Asn, 83Glu→Gln, 85Asp→Glu, 87Ala→Thr y 89Thr→Asn; y/o
- en el que la variante funcionalmente activa de SEC ID Nº 2 comprende una o más mutaciones en los aminoácidos en las posiciones 5, 7, 11, 12, 17, 20, 38, 40, 43, 55, 61, 65, 66, 67, 76, 81, 82, 87, 91, 93, 112, 113 y/o 116, seleccionadas particularmente entre el grupo que consiste en 5His→Val, 7Pro→Ser, 11Leu→Val, 12Val→Lys, 17Pro→Ser, 20Leu→Val, 38Lys→Arg, 40Arg→Ala, 43Arg→Gln, 55Asp→Glu, 61Asn→Ala, 65Lys→Gln, 66Asp→Gly, 67Lys→Arg, 76Ser→Thr,

81Ile→Met, 82Gln→Glu, 87Thr→Arg, 91Ser→Thr, 93Val→Lys, 112Thr→Leu, 113Leu→Val y 116Ser→Val .

6. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho anticuerpo o fragmento se une específicamente al dominio I de la integrina α2 humana con una afinidad de unión de orden nM.

7. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho péptido o complejo peptídico inhibe la interacción de la integrina α2 humana con el colágeno *in vitro*, inhibiendo de esa manera la activación de las plaquetas debida a la adhesión de dichas plaquetas a dicho colágeno.

8. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, comprendiendo dicho dominio de región variable de la cadena pesada la cadena pesada HCDR3 de SEC ID Nº 5.

9. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, comprendiendo dicho dominio de región variable de la cadena pesada las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs) de la cadena pesada de SEC ID Nº 3 (HCDR1), SEC ID Nº 4 (HCDR2), y SEC ID Nº 5 (HCDR3), o variantes funcionalmente activas de las mismas.

10. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la variante funcionalmente activa de HCDR2 comprende la mutación Asp→Glu en el aminoácido en la posición 6.

11. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, comprendiendo dicho dominio de región variable de la cadena ligera la cadena ligera LCDR3 de SEC ID Nº 8.

12. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, comprendiendo dicho dominio de región variable de la

cadena ligera las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs) de la cadena ligera de SEC ID Nº 6 (LCDR1), SEC ID Nº 7 (LCDR2), y SEC ID Nº 8 (LCDR3), o variantes funcionalmente activas de las mismas.

13. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la variante funcionalmente activa de LCDR1 comprende la mutación Asn→Gln en el aminoácido en la posición 11.

14. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, teniendo dicho dominio de región variable de la cadena pesada (VH) al menos 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de VH de SEC ID Nº 2.

15. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho dominio de región variable de la cadena pesada (VH) comprende la secuencia de SEC ID Nº 2 o una variante funcionalmente activa de la misma.

16. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, teniendo dicho dominio de región variable de la cadena ligera (VL) al menos 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de VL de SEC ID Nº 1.

17. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho dominio de región variable de la cadena ligera (VL) comprende la secuencia de SEC ID Nº 1 o una variante funcionalmente activa de la misma.

18. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que dicho dominio de región variable de la cadena pesada (VH) comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en H5, H7, H11, H12, H17, H20, H38, H40, H43, H55, H61, H65, H66, H67, H76, H81, H82, H87, H91, H93, H112, H113 y H116.

19. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con la reivindicación 18, en el que las una o más sustituciones de aminoácidos se seleccionan entre el grupo que consiste en 5His→Val, 7Pro→Ser, 11Leu→Val, 12Val→Lys, 17Pro→Ser, 20Leu→Val, 38Lys→Arg, 40Arg→Ala, 43Arg→Gln, 55Asp→Glu, 61Asn→Ala, 65Lys→Gln, 66Asp→Gly, 67Lys→Arg, 76Ser→Thr, 81Ile→Met, 82Gln→Glu, 87Thr→Arg, 91Ser→Thr, 93Val→Lys, 112Thr→Leu, 113Leu→Val y 116Ser→Val .

20. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que dicho dominio de región variable de la cadena ligera (VL) comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en L9, L12, L15, L22, L34, L46, L47, L80, L83, L85, L87, y L89.

21. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con la reivindicación 20, en el que las una o más sustituciones de aminoácidos se seleccionan entre el grupo que consiste en 9Ala→Ser, 12Ala→Ser, 15Leu→Val, 15Leu→Pro, 22Ser→Thr, 34Asn→Gln, 46Gln→Lys, 47Ala→Pro, 80Asp→Asn, 83Glu→Gln, 85Asp→Glu, 87Ala→Thr y 89Thr→Asn.

22. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, teniendo dicho dominio de región variable de la cadena pesada (VH) al menos 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de VH seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº 38 (HC1), SEC ID Nº 39 (HC2), SEC ID Nº 40 (HC3), SEC ID Nº 41 (HC4), SEC ID Nº 42 (HC5), SEC ID Nº 43 (HC6), y SEC ID Nº 44 (HC7).

23. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con la reivindicación 22, comprendiendo dicho dominio de región variable de la cadena pesada (VH) una secuencia de VH seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº 38 (HC1), SEC ID Nº 39 (HC2), SEC ID Nº 40 (HC3), SEC ID Nº 41 (HC4), SEC ID Nº 42 (HC5), SEC ID Nº 43 (HC6), y SEC ID Nº 44 (HC7).

24. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, teniendo dicho dominio de región variable de la cadena

ligera (VL) al menos 90%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de VL seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº 33 (LC1), SEC ID Nº 34 (LC2), SEC ID Nº 35 (LC3), SEC ID Nº 36 (LC4), y SEC ID Nº 37 (LC5).

25. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con la reivindicación 24, comprendiendo dicho dominio de región variable de la cadena ligera (VL) una secuencia de VL seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº 33 (LC1), SEC ID Nº 34 (LC2), SEC ID Nº 35 (LC3), SEC ID Nº 36 (LC4), y SEC ID Nº 37 (LC5).

26. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que dicho anticuerpo o porción de unión es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

27. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la porción de unión a antígeno se selecciona entre el grupo que consiste en un Fab, un Fab', un F(ab')2, un Fv, un Fv unido por puente disulfuro, un scFv, y un $(scFv)_2$.

28. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, que se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo específico doble, un anticuerpo de isotipo, un anticuerpo de dominio variable doble y un anticuerpo biespecífico.

29. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, que comprende un dominio constante de inmunoglobulina de la cadena pesada seleccionado entre el grupo que consiste en: un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgGl humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgE humana, y un dominio constante de IgA humana.

30. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, que comprende un dominio constante de IgG4 humana.

31. El péptido o complejo peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que el péptido o complejo peptídico comprende o consiste en un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

32. Uno o más ácidos nucleicos que codifican el péptido o complejo peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31.

33. Péptido o complejo peptídico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-31 para su uso en el tratamiento, profilaxis o diagnóstico de una enfermedad o trastorno relacionado con la integrina α2.

34. El ácido o ácidos nucleicos de la reivindicación 32, en el que el ácido o ácidos nucleicos se localizan en un vector.

35. Una célula que expresa de forma heteróloga uno de los ácidos nucleicos de acuerdo con las reivindicaciones 32 o 34.

36. Un método para la producción de un péptido o complejo peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 que comprende el cultivo de la célula de acuerdo con la reivindicación 35 en condiciones que permitan la expresión del péptido o complejo peptídico y opcionalmente la recuperación del péptido o complejo peptídico de la célula anfitriona.

37. Una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido o complejo peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 y/o al menos un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 32 o 34 para su uso como un medicamento.

38. La composición farmacéutica de la reivindicación 37 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno relacionado con la

integrina α2, seleccionado preferentemente entre el grupo que consiste en trombosis, una enfermedad vascular, cáncer, incluyendo neo-angiogénesis y metástasis, inflamación, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmune y una enfermedad caracterizada por una angiogénesis anormal o aumentada, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, reacciones a trasplantes, neuritis óptica, traumatismo de la médula espinal, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, síndrome de Reynaud, encefalomielitis autoinmune experimental, síndrome de Sjorgen, esclerodermia, enfermedad cardiovascular, psoriasis, e infecciones que provocan una respuesta inflamatoria.

39. La composición farmacéutica de la reivindicación 37 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad vascular y/o trombosis, particularmente en el tratamiento de síndrome coronario agudo, intervención coronaria percutánea, apoplejía isquémica, estenosis de la arteria carótida o enfermedad oclusiva arterial periférica.

40. Un método para el diagnóstico de una enfermedad asociada con integrina α2 alterada, comprendiendo el método:

a) poner en contacto una muestra que comprende integrina α2 con el péptido o complejo peptídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31; y
b) detectar la unión de la integrina α2 al péptido o complejo peptídico; y
c) comparar la unión de la etapa b) con una referencia,

en el que una unión a integrina α2 alterada en la muestra con respecto a la referencia es indicativa de la enfermedad.

41. Artículo de manufactura que comprende:

a) un material de envasado,
b) un péptido o complejo peptídico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-31 o 33 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o que comprenda la composición farmacéutica de una de las reivindicaciones 36-38

c) una etiqueta o un prospecto, estando contenido el prospecto dentro de dicho material de envasado, que indica que dicho péptido o complejo peptídico es eficaz para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, especialmente para una enfermedad o trastorno relacionado con la integrina α2.

42. Kit de diagnóstico para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno relacionado con la integrina α2 que comprende un péptido o complejo peptídico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-31 y un envasado adecuado, y posiblemente instrucciones adecuadas para el uso de dicho péptido o complejo peptídico en la detección de integrina α2.

43. Método de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad o trastorno relacionado con la integrina α2 que usa uno o más péptidos o complejos de péptidos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-31 y/o uno o más ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 32 o 34 o una de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con una de las reivindicaciones 36-38.

44. Un método para el diagnóstico de una enfermedad asociada con integrina α2 alterada, comprendiendo dicho método:

a) poner en contacto una muestra tomada de un individuo con el péptido o complejo peptídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31; y
b) detectar la unión de la integrina α2 al péptido o complejo peptídico; y
c) comparar la unión de la etapa b) con la unión de la integrina α2 al péptido o complejo peptídico en una o más muestras de referencia,

en el que una unión alterada en la muestra tomada con respecto a la unión detectada en las una o más muestras de referencia es indicativa de la enfermedad.

Resumen

PÉPTIDO O COMPLEJO PEPTÍDICO QUE SE UNE A INTEGRINA α2 Y MÉTODOS Y USOS QUE IMPLICAN A LOS MISMOS

La presente invención se refiere a un péptido o complejo peptídico que se unen a integrina α2, a uno o más ácidos nucleicos que codifican el péptido o complejo peptídico, a una célula recombinante que produce el péptido o complejo peptídico, a un método para la producción del péptido o complejo peptídico, a una composición farmacéutica que comprende el péptido o complejo peptídico o el ácido o ácidos nucleicos para su uso como un medicamento, a un método para la detección de integrina α2 y a un método de cribado.