

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 946**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2010 PCT/US2010/027422**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.09.2010 WO10107752**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2010 E 10708688 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 2408816**

54 Título: **Anticuerpo antagonista específico del heterodímero alfa-4-beta-7**

30 Prioridad:

20.03.2009 US 162154 P
22.02.2010 US 306829 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2020

73 Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)
Law Department One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320, US

72 Inventor/es:

HSU, HAILING;
FOLTZ, IAN;
ARORA, TARUNA y
JACOBSEN, FREDERICK, W.

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 751 946 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo antagonista específico del heterodímero alfa-4-beta-7

5 **Campo de la invención**

Esta solicitud proporciona composiciones y métodos que se refieren a las proteínas de unión a antígeno específicas del heterodímero alfa4beta7.

10 **Antecedentes**

Las integrinas son proteínas transmembrana de Tipo I heterodiméricas formadas por dos subunidades (una subunidad alfa y una subunidad beta) y median muchas interacciones de célula-célula y célula-matriz extracelular diferentes. Funcionalmente, las integrinas han demostrado estar implicadas en diversos procesos biológicos, incluyendo la migración y la recirculación leucocitaria y la respuesta inmunológica. En mamíferos, hay 18 subunidades alfa conocidas y ocho subunidades beta conocidas, que se combinan para formar 24 integrinas distintas. La especificidad del ligando se determina en gran parte por las combinaciones particulares de subunidades alfa y beta expresadas, mientras que la afinidad por el ligando está modulada por los cambios conformacionales de la integrina y es dependiente de cationes divalentes.

Los ligandos para las integrinas forman un grupo estructuralmente diverso que incluye proteínas de la matriz extracelular tales como colágenos, fibronectina, vitronectina y lamininas; contra-receptores tales como las moléculas de adhesión celular (por ejemplo, la molécula de adhesión celular vascular o VCAM) y las proteínas plasmáticas. Numerosos microorganismos patógenos también utilizan integrinas para iniciar la infección o como sitios para la unión de toxinas. Los ligandos estructuralmente diversos comparten un residuo de ácido glutámico o aspártico expuesto, habitualmente presente en un bucle flexible extendido, que es importante para el reconocimiento por integrinas.

Las integrinas alfa4 (alfa 4 asociadas con una de la subunidad beta1 o beta7) desempeñan un papel importante en el sistema inmunológico. Alfa4beta1 se expresa en linfocitos y células mieloides; parece ser el principal compañero de unión para la molécula de adhesión celular vascular (VCAM). VCAM se expresa de forma ubicua en el endotelio vascular, está regulada positivamente durante la inflamación y se une a alfa4beta7 así como a alfa4beta1 (aunque débilmente a alfa4beta7). Aunque también se detecta en las células T periféricas, células B, células NK y eosinófilos, alfa4beta7 se expresa más altamente en una subpoblación de células T de memoria CD4+CD45RA- que se ha demostrado que migran preferencialmente al intestino. El ligando primario para el heterodímero alfa4beta7 es la molécula de adhesión celular adreína mucosa 1 (MAdCAM-1 o MAdCAM), que se expresa en el endotelio intestinal.

Además de emparejarse con la cadena alfa4, la subunidad beta7 también se asocia a alfaE para formar alfaEbeta7, que se expresa principalmente en los linfocitos intraepiteliales (IEL) en el intestino, el pulmón y el tracto genitourinario. AlfaEbeta7 también se expresa en células dendríticas en el intestino. El heterodímero alfaEbeta7 se une a la E-cadherina, que se expresa en las células epiteliales. Se cree que las células IEL proporcionan un mecanismo de inmunovigilancia dentro del compartimento epitelial.

Los anticuerpos que se unen a alfa4 e inhiben la unión de alfa4beta1 a VCAM-1 y la fibronectina mapearon en una región de 52 aminoácidos de alfa4, entre los restos 152 y 203 (Schiffer et al., J. Biol. Chem. 270:14270; 1995). Tidswell et al. (J. Immuno 159:1497; 1997) identificaron dominios de beta7 que son importantes para unirse a MAdCAM-1, utilizando un panel de anticuerpos que se unen a beta7 en un enfoque de subunidad beta7 quimérico de ratón/humano. Descubrieron que seis de los siete anticuerpos que inhibían la unión a MAdCAM-1 y E-cadherina mapearon en una región que comprendía los aminoácidos 176 a 250, que parece tener homología con el sitio de adhesión dependiente de iones metálicos (MIDAS) de otras subunidades de integrinas. Uno de los anticuerpos usados por Tidswell et al. fue un anticuerpo específico para el heterodímero alfa4beta7 denominado ACT-1.

El anticuerpo ACT-1 fue descrito originalmente por Lazarovitz et al. (J. Immunol. 133:1857; 1984) como un anticuerpo desarrollado inmunizando ratones con una línea de linfocitos T específicos del toxoide tetánico humano a partir de PBMC. Más tarde se demostró que ACT-1 se une específicamente al heterodímero alfa4beta7 (Schweighoffer et al., J. Immunol. 151:717, 1993). Mientras que ACT-1 no se une a alfa4beta7 murino, se une a alfa4beta7 de al menos algunas especies de primates no humanos y se ha demostrado que atenúa la colitis espontánea en los tamarinos con capucha de algodón cautivos (Hesterberg et al., Gastroenterology 111:1373; 1996).

ACT-1 se ha humanizado y evaluado como un agente terapéutico humano en la colitis ulcerosa (Feagan et al., N Engl J Med. 352:2499; 2005) y recientemente en la enfermedad de Crohn (Feagan et al., Clinical Gastroenterology and Hepatology, 6:1370, 2008). El ACT-1 humanizado, también conocido como vedolizumab, se describe en el documento WO 98/06248 y en la patente de EE.UU. 7.147.85, así como en los documentos WO 07/061679 y US 2007-0122404. Otro anticuerpo humanizado, natalizumab (Tysabri®), se ha usado para tratar la enfermedad de Crohn. Natalizumab es una versión humanizada de un anticuerpo murino específico de alfa4. Se ha demostrado que

vedolizumab da lugar a una respuesta neutralizante de anticuerpos anti-humanizados en una parte de los pacientes y el natalizumab se ha asociado a leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML), un trastorno neurológico que se asocia a la reactivación de una infección previa con el virus JC en individuos inmunocomprometidos. En consecuencia, existe la necesidad de un agente terapéutico que mejore estas desventajas al tiempo que interrumpe la ruta alfa4beta7/MAdCAM-1.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones. En un aspecto, se desvela una proteína de unión a antígeno aislada que se une específicamente a alfa4beta7 humana (es decir, una proteína de unión a antígeno específica de heterodímero alfa4beta7). En un aspecto de la invención, el anticuerpo monoclonal aislado específico del heterodímero alfa4beta7 se une específicamente al alfa4beta7 de un primate no humano, un macaco cangrejero, un chimpancé, un mamífero no primate, un roedor, un ratón, una rata, un hámster, una cobaya, un gato o un perro. La proteína de unión a antígeno aislada descrita en el presente documento comprende un anticuerpo humano; un anticuerpo quimérico; un anticuerpo monoclonal; un anticuerpo recombinante; un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno; un anticuerpo de cadena única; un diacuerpo; un triacuerpo; un tetracuerpo; un fragmento Fab; un fragmento F(ab')₂; un anticuerpo de dominio; un anticuerpo IgD; un anticuerpo IgE; un anticuerpo IgM; un anticuerpo IgG1; un anticuerpo IgG2; un anticuerpo IgG3; un anticuerpo IgG4; o un anticuerpo IgG4 que tiene al menos una mutación en una región bisagra que alivia una tendencia a formar un enlace disulfuro intra-catenario H. En otro aspecto, la proteína de unión a antígeno aislada comprende una región constante de cadena pesada de uno de los anticuerpos mencionados anteriormente; en otro aspecto, la región constante es un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 72; un polipéptido al menos un 90 % idéntico a la SEQ ID NO: 72; un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 72, de la cual se han retirado uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos N-terminales y/o C-terminales; o uno de los polipéptidos mencionados anteriormente que incorpora una o más modificaciones postraduccionales. En una realización, la proteína de unión al antígeno aislado comprende una región constante de cadena ligera kappa, en otra comprende una región de cadena ligera lambda. En una realización, la región constante de la cadena ligera es un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 70; un polipéptido al menos un 90 % idéntico a la SEQ ID NO: 70; un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 70, de la cual se han retirado uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos N-terminales y/o C-terminales; o uno de los polipéptidos mencionados anteriormente que incorpora una o más modificaciones postraduccionales.

Una realización de la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal específico de heterodímero alfa4beta7 como se define en las reivindicaciones que tienen una cadena pesada y una cadena ligera, cada una de las cuales comprende una o más regiones determinantes de complementariedad o CDR. En otro aspecto de la divulgación, la región variable de la cadena pesada comprende CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera comprende CDR1, CDR2 y CDR3, en donde cada CDR respectiva se selecciona del grupo que consiste en las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 55 y las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 58; las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 56 y las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 59; y las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 57 y las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 60.

En otro aspecto de la invención, la región variable de la cadena pesada comprende además cuatro regiones marco (Framework Regions, FR) designadas FR1, FR2, FR3 y FR4 y la región variable de la cadena ligera comprende además cuatro regiones marco (FR) designadas FR1, FR2, FR3 y FR4. En un aspecto, las FR se seleccionan de la misma SEQ ID NO que las CDR; en otro, las FR se seleccionan de una SEQ ID NO diferente. En una realización adicional, la divulgación proporciona una proteína de unión a antígeno específica del heterodímero alfa4beta7 en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 55 y la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 58; la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 56 y la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 59; o la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 57 y la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 60.

En otro aspecto de la invención, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal específico del heterodímero alfa4beta7 aislado como se define en las reivindicaciones que tienen una cadena pesada y una cadena ligera, cada una de las cuales comprende una o más regiones determinantes de complementariedad o CDR. En otro aspecto de la invención, la región variable de la cadena pesada comprende CDR1, CDR2 y CDR3 y la región variable de la cadena ligera comprende CDR1, CDR2 y CDR3. En una realización, las CDR de cadena ligera se seleccionan del grupo que consiste en una CDR1, CDR2 y CDR3 al menos un 90 % idénticas a una CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de la SEQ ID NO: 3; una CDR1, CDR2 y CDR3 al menos un 90 % idénticas a una CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de la SEQ ID NO: 5; una CDR1, CDR2 y CDR3 al menos un 90 % idénticas a una CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de la SEQ ID NO: 7; una CDR1, CDR2 y CDR3 al menos un 90 % idénticas a una CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de la SEQ ID NO: 22; y una CDR1, CDR2 y CDR3 al menos un 90 % idénticas a una CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de la SEQ ID NO: 24; y las CDR1, CDR2 y CDR3 variables de cadena pesada son de SEQ ID NO: 58.

En otro aspecto de la invención, la región variable de la cadena pesada comprende además cuatro regiones marco

(FR) designadas FR1, FR2, FR3 y FR4 y la región variable de la cadena ligera comprende además cuatro regiones marco (FR) designadas FR1, FR2, FR3 y FR4. En un aspecto, las FR se seleccionan de la misma SEQ ID NO que las CDR; en otro, las FR se seleccionan de una SEQ ID NO diferente. En una realización adicional, la divulgación proporciona una proteína de unión a antígeno específica del heterodímero alfa4beta7 en donde la región variable de la cadena ligera se selecciona del grupo que consiste en una región variable de la cadena ligera al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 3; una región variable de cadena ligera al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 5; una región variable de cadena ligera al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 7; una región variable de cadena ligera al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 22; y una región variable de cadena ligera al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 24; y la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 58.

Otro aspecto de la divulgación es una proteína de unión a antígeno específica del heterodímero alfa4beta7 aislada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3, en donde las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera se seleccionan del grupo que consiste en una CDR1, CDR2 y CDR3 al menos un 90 % idénticas a una CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de la SEQ ID NO: 12; una CDR1, CDR2 y CDR3 al menos un 90 % idénticas a una CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de la SEQ ID NO: 25; y una CDR1, CDR2 y CDR3 al menos un 90 % idénticas a una CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de la SEQ ID NO: 26; y las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste en una CDR1, CDR2 y CDR3 al menos un 90 % idénticas a una CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de la SEQ ID NO: 41; y una CDR1, CDR2 y CDR3 al menos un 90 % idénticas a una CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de SEQ ID NO: 54. En una realización, la región variable de la cadena ligera se selecciona del grupo que consiste en regiones variables que son al menos el 90 % idénticas a una cualquiera de las SEQ ID NO: 12, 25 y 26 y la región variable pesada se selecciona del grupo que consiste en regiones variables que son al menos el 90 % idénticas a una cualquiera de las SEQ ID NO: 41 y 54. En otro aspecto de la invención, la región variable de la cadena pesada comprende además cuatro regiones marco (FR) designadas FR1, FR2, FR3 y FR4 y la región variable de la cadena ligera comprende además cuatro regiones marco (FR) designadas FR1, FR2, FR3 y FR4. En un aspecto, las FR se seleccionan de la misma SEQ ID NO que las CDR; en otro, las FR se seleccionan de una SEQ ID NO diferente.

En una realización, la divulgación proporciona una proteína de unión a antígeno específica del heterodímero alfa4beta7 aislada que tiene una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3, en donde cada CDR respectiva es al menos el 90 % idéntica a una CDR seleccionada del grupo que consiste en una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 10 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 38; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 2 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 30; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 20 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 51; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 11 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 39; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 13 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 42; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 17 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 46; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 8 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 36; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 19 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 49; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 18 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 47; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 21 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 52; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 3 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 31; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 7 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 35; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 6 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 34; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 1 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 29; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 22 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 50; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 24 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 40; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 9 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 37; una cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 4, y una cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID NO: 32; una cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 28, y una cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID NO: 53; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 16 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 45; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 15 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 44; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 14 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 43; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 27 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 43; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 33; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 12 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 41; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 23 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 48; una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 25 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 54; y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 26 y una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 54. En otro aspecto, las CDR de cadena pesada y cadena ligera son idénticas a las CDR respectivas de las SEQ ID NO. recitadas. En una realización de la invención, la región variable de la cadena pesada comprende además cuatro

regiones marco (FR) designadas FR1, FR2, FR3 y FR4 y la región variable de la cadena ligera comprende además cuatro regiones marco (FR) designadas FR1, FR2, FR3 y FR4. En un aspecto, las FR se seleccionan de la misma SEQ ID NO que las CDR; en otro, las FR se seleccionan de una SEQ ID NO diferente.

5 En otra realización, una proteína de unión a antígeno específica del heterodímero alfa4beta7 comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, en donde la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 10 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 38; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 30; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 20 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 51; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 11 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 39; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 13 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 42; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 17 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 46; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 8 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 36; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 19 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 49; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 18 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 47; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 21 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 52; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 3 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 31; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 7 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 35; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 6 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 34; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 29; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 22 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 50; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 24 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 40; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 9 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 37; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 32; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 28 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 53; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 16 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 45; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 15 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 44; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 14 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 43; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 27 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 43; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 5 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 33; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 12 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 41; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 23 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 48; la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 25 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 54; o la región variable de la cadena ligera es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 26 y la región variable de la cadena pesada es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 54. En otro aspecto, las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera son idénticas a las regiones variables respectivas de las SEQ ID NO. citadas.

Un aspecto de la invención proporciona un anticuerpo monoclonal específico del heterodímero alfa4beta7 aislado como se define en las reivindicaciones que tienen una CE50 de menos de 35 ng/ml en un ensayo de unión de células T de memoria CD4+; otro proporciona una unión al antígeno específico del heterodímero alfa4beta7 aislado que tiene una CE50 de menos de 10 ng/ml en un ensayo de unión de células T de memoria CD4+. En otra realización, la invención proporciona anticuerpo monoclonal específico del heterodímero alfa4beta7 aislado como se define en las reivindicaciones que tienen una CI50 en un ensayo de competición MAdCAM de menos de 30 ng/m; en otro se proporciona unión al antígeno específico del heterodímero alfa4beta7 aislado que tiene una CI50 de menos de 10 ng/ml en un ensayo de competición MAdCAM. Un aspecto de la divulgación proporciona una proteína de unión a antígeno específico del heterodímero alfa4beta7 aislada que se une a un mutante S250N de alfa4beta7.

En un aspecto de la invención, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo monoclonal anteriormente mencionado como se define en las reivindicaciones. En otro aspecto de la invención el ácido nucleico es un vector. En otra realización de la invención, la invención proporciona células hospedadoras transformadas o transfectadas con los ácidos nucleicos de la invención. En otro aspecto de la invención, se

proporciona un método para preparar un polipéptido que comprende incubar las células hospedadoras en condiciones que promueven la expresión de los polipéptidos y la recolección de los polipéptidos.

- 5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula aislada que secreta un anticuerpo monoclonal como se define en las reivindicaciones. En otra realización, la célula es un hibridoma. En otra realización, la presente invención proporciona un método para producir un anticuerpo monoclonal como se define en las reivindicaciones que comprende incubar dicha célula aislada en condiciones que le permiten expresar dicha proteína de unión a antígeno.
- 10 En otra realización, el anticuerpo monoclonal como se define en las reivindicaciones, cuando se une a un alfa4beta7 humano, inhibe la unión de alfa4beta7 a MAdCAM-1. En consecuencia, una realización de la invención proporciona un método para inhibir al menos una actividad de alfa4beta7, que comprende poner en contacto una célula que expresa alfa4beta7 con una proteína de unión a antígeno específica del heterodímero alfa4beta7 de tal manera que la actividad se inhiba parcial o totalmente. En un aspecto de la divulgación, tal método se lleva a cabo *in vivo*. En un aspecto de la invención, la proteína de unión a antígeno aislada inhibe la adhesión de células que expresan alfa4beta7 a células que expresan MAdCAM-1. En otro aspecto más la proteína de unión a antígeno aislada inhibe el tráfico de células que expresan alfa4beta7 a áreas o tejidos poblados por células que expresan MAdCAM-1; en un ejemplo de tal realización, las proteínas de unión a antígeno aisladas inhiben el tráfico de linfocitos al intestino.
- 15 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal como se define en las reivindicaciones. En una realización, la presente divulgación proporciona un método para tratar una afección en un sujeto que comprende administrar la composición farmacéutica al sujeto, en donde la afección es tratable al reducir la actividad (parcial o totalmente) de alfa4beta7 en el sujeto. En otra realización, el sujeto es un ser humano. En otra realización, la afección es una afección inflamatoria del sistema gastrointestinal. Por lo tanto, se proporciona un método para tratar a un individuo afligido por una afección caracterizada por el tráfico inadecuado de células que expresan alfa4beta7 a tejidos que comprenden células que expresan MAdCAM, que comprende administrar al individuo una proteína de unión a antígeno específico del heterodímero alfa4beta7 en una cantidad suficiente para inhibir (parcial o totalmente) el tráfico de células que expresan alfa4beta7 a tejidos que comprenden células que expresan MAdCAM. De acuerdo con la invención la afección es una enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca (esprue no tropical), enteropatía asociada a artropatías seronegativas, colitis microscópica o colagenosa, gastroenteritis eosinofílica o reservoritis resultante de proctocolectomía y anastomosis ileoanal. En otra realización, la afección es pancreatitis, mastitis, colecistitis, colangitis, pericolangitis, bronquitis crónica, sinusitis crónica o asma.
- 20 En otra realización, el método comprende además administrar al sujeto un segundo tratamiento. En otra realización, el segundo tratamiento se administra al sujeto antes y/o simultáneamente con y/o después de que la composición farmacéutica se administre al sujeto. En otra realización, el segundo tratamiento comprende un agente antiinflamatorio. En otra realización, la segunda composición farmacéutica comprende un agente seleccionado del grupo que consiste en medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, esteroides y agentes inmunomoduladores. En otra realización, el método comprende administrar al sujeto un tercer tratamiento.
- 25
- 30
- 35
- 40

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aumentar la longevidad de un sujeto que comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir la actividad de alfa4beta7 en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para disminuir el tráfico mediado por alfa4beta7 (por ejemplo la migración intestinal mediada por alfa4beta7) en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica.

45

Descripción detallada de la invención

- 50 La presente divulgación y, en la medida definida en las reivindicaciones, la presente invención proporcionan composiciones, kits y métodos relacionados con las moléculas que se unen a la integrina alfa4beta7 ("alfa4beta7"), que incluyen moléculas que agonizan o antagonizan alfa4beta7, tales como anticuerpos anti-alfa4beta7, fragmentos de anticuerpos y derivados de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos anti-alfa4beta7 antagonistas, fragmentos de anticuerpos o derivados de anticuerpos. También se proporcionan ácidos nucleicos y derivados y fragmentos de los mismos, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica todo o una parte de un polipéptido que se une a alfa4beta7, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica todo o parte de un anticuerpo anti-alfa4beta7, un fragmento de anticuerpo o un derivado de anticuerpo, plásmidos y vectores que comprenden tales ácidos nucleicos y células o líneas celulares que comprenden tales ácidos nucleicos y/o vectores y plásmidos. Los métodos proporcionados incluyen, por ejemplo, métodos para fabricar, identificar o aislar moléculas que se unen a alfa4beta7, tales como anticuerpos anti-alfa4beta7, métodos para determinar si una molécula se une a alfa4beta7, métodos para determinar si una molécula agoniza o antagoniza alfa4beta7, métodos para fabricar composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, que comprende una molécula que se une a alfa4beta7 y métodos para administrar una molécula que se une a alfa4beta7 a un sujeto, por ejemplo, métodos para tratar una afección mediada por alfa4beta7 y para agonizar o antagonizar una actividad biológica de alfa4beta7, *in vivo* o *in vitro*.
- 55
- 60
- 65

Las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos se indican usando abreviaturas convencionales de una o tres letras. Salvo que se indique otra cosa, cada secuencia polipeptídica tiene un amino terminal a la izquierda y un carboxi terminal a la derecha; cada secuencia de ácido nucleico monocatenario y la cadena superior de cada secuencia de ácido nucleico bicatenario tiene un extremo 5' a la izquierda y un extremo 3' a la derecha. Una secuencia de polipéptido o polinucleótido particular también puede describirse explicando en qué se diferencia de una secuencia de referencia.

Salvo que se defina de otra forma en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la invención solicitud deberán tener los significados que entienden comúnmente aquellos expertos en la materia. Adicionalmente, salvo que se requiera de otra forma por el contexto, los términos singulares deberán incluir las formas plurales y los términos plurales deberán incluir el singular. Generalmente, las nomenclaturas usadas en conexión con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química e hibridación de proteínas y de ácidos nucleicos descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente solicitud se realizan generalmente de acuerdo con los métodos convencionales bien conocidos en la técnica y según se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva salvo que se indique otra cosa. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992) y Harlow y Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como comúnmente se realizan en la técnica o como se describen en el presente documento. La terminología usada en conexión con, y los procedimientos de laboratorio y las técnicas de, la química analítica, la química orgánica sintética y la química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Se pueden utilizar técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparaciones farmacéuticas, formulaciones y administración y tratamiento de pacientes.

Los siguientes términos, salvo que se indique otra cosa, deben entenderse que tiene los siguientes significados:

La frase "molécula aislada" (donde la molécula es, por ejemplo, un polipéptido, un polinucleótido o un anticuerpo) es una molécula que, en virtud de su origen o fuente de derivación (1), no está asociada a componentes asociados de forma natural que lo acompañan en su estado nativo, (2) está sustancialmente libre de otras moléculas de la misma especie (3) se expresa por una célula de una especie diferente o (4) no se produce en la naturaleza sin la intervención humana. Por lo tanto, una molécula que se sintetiza químicamente, o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina naturalmente, estará "aislado" de sus componentes asociados naturalmente. Una molécula también puede quedar sustancialmente libre de componentes asociados de forma natural por aislamiento, usando técnicas de purificación bien conocidas en la técnica. La pureza u homogeneidad de la molécula puede ensayarse por varios medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la pureza de una muestra polipeptídica puede ensayarse usando electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción del gel para visualizar el polipéptido usando técnicas bien conocidas en la técnica. Para ciertos fines, puede proporcionarse una resolución más alta usando HPLC u otros medios bien conocidos en la técnica para la purificación.

Las frases "inhibidor de alfa4beta7" y "antagonista de alfa4beta7" se usan indistintamente. Cada una es una molécula que inhibe de forma detectable al menos una función de alfa4beta7. Por el contrario, un "agonista alfa4beta7" es una molécula que aumenta de forma detectable al menos una función de alfa4beta7. La inhibición provocada por un inhibidor de alfa4beta7 no necesita ser completa mientras sea detectable, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo. Puede usarse cualquier ensayo de una función de alfa4beta7, ejemplos de los cuales se proporcionan en el presente documento. Algunos ejemplos de funciones de alfa4beta7 que pueden inhibirse por un inhibidor de alfa4beta7 (o aumentarse por un agonista de alfa4beta7) incluyen la unión de ligandos (es decir, la unión a MADCAM-1), la adhesión a células que expresan ligandos, el tráfico a un compartimento particular tales como el intestino, la liberación de citocinas, quimiocinas y otros mediadores, la potenciación o exacerbación de la respuesta inflamatoria y el daño tisular y así sucesivamente. Los ejemplos de los tipos de inhibidores de alfa4beta7 y agonistas de alfa4beta7 incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de unión a alfa4beta7 tales como proteínas de unión a antígeno (por ejemplo, proteínas de unión a antígeno alfa4beta7), anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y derivados de anticuerpos.

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se refieren cada uno a una molécula que comprende dos o más restos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Estos términos abarcan, por ejemplo, proteínas nativas y artificiales, fragmentos de proteínas y análogos de polipéptidos (tales como muteínas, variantes y proteínas de fusión) de una secuencia proteica, así como post-traduccionalmente, o proteínas modificadas covalentemente o no covalentemente de otro modo. Un péptido, un polipéptido o una proteína puede ser monomérico o polimérico.

La frase "fragmento de polipéptido" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino-terminal y/o carboxi-terminal en comparación con una proteína de longitud completa correspondiente. Los fragmentos pueden ser, por ejemplo, de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 50, 70, 80, 90, 100, 150 o 200 aminoácidos de longitud. Los fragmentos también pueden ser, por ejemplo, como máximo

1.000, 750, 500, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 14, 13, 12, 11, o 10 aminoácidos de longitud. Los fragmentos también pueden resultar del procesamiento proteolítico (u otro), que, por ejemplo, da como resultado una variación en el amino y/o carboxi terminal de uno a cinco aminoácidos a partir de lo predicho. Un fragmento puede comprender, además, en cualquiera o ambos de sus extremos, uno o más aminoácidos adicionales, por ejemplo, Una secuencia de aminoácidos de una proteína diferente de origen natural (por ejemplo, un Fc o un dominio de cremallera de leucina) o una secuencia de aminoácidos artificial (por ejemplo, una secuencia enlazadora artificial o una proteína de marcaje).

Los polipéptidos de la invención incluyen polipéptidos que se han modificado de cualquier manera y por cualquier motivo, por ejemplo, para: (1) reducir la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducir la susceptibilidad a la oxidación, (3) alterar la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) alterar las afinidades de unión y (4) conferir o modificar otras propiedades fisicoquímicas o funcionales. Los análogos incluyen muteínas de un polipéptido. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos simples o múltiples (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia de origen natural (por ejemplo, en la porción del polipéptido fuera del dominio o dominios que forman contactos intermoleculares). Pueden usarse secuencias de consenso para seleccionar restos de aminoácidos para la sustitución; aquellos expertos en la materia reconocen que también pueden sustituirse restos de aminoácidos adicionales.

Una "sustitución conservativa de aminoácidos" es aquella que no cambia sustancialmente las características estructurales de la secuencia principal (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe tender a romper una hélice que se produce en la secuencia principal, o interrumpir otros tipos de estructura secundaria que caracterizar la secuencia principal o son necesarios para su funcionalidad). Algunos ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidos en la técnica, se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton *et al.* *Nature* 354:105 (1991).

La presente invención también proporciona análogos no peptídicos de polipéptidos de unión a alfa4beta7. Los análogos no peptídicos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos de péptidos" o "peptidomiméticos", véase, por ejemplo, Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber y Freidinger *TINS* p.392 (1985); y Evans *et al.* *J. Med. Chem.* 30:1229, 1987). Los miméticos de péptidos que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica deseada), tales como un anticuerpo humano, pero tiene uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado del grupo que consiste en: --CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂--CH₂--, --CH=CH- (*cis* y *trans*), --COCH₂--, --CH(OH)CH₂-- y --CH₂SO--, por métodos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) también puede usarse para generar péptidos más estables. Además, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de la secuencia consenso sustancialmente idéntica pueden generarse por métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992), por ejemplo, añadiendo restos de cisteína internos capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

Una "variante" de un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) comprende una secuencia de aminoácidos en donde uno o más restos de aminoácidos se insertan, se eliminan de y/o se sustituyen en la secuencia de aminoácidos en relación con otra secuencia de polipéptidos. Las variantes de la invención incluyen proteínas de fusión.

Un "derivado" de un polipéptido es un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) que se ha modificado químicamente, por ejemplo, a través de la conjugación a otro resto químico (tales como, por ejemplo, polietilenglicol o albúmina, por ejemplo, seroalbúmina humana), fosforilación y/o glicosilación. Salvo que se indique otra cosa, el término "anticuerpo" incluye, además de los anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa, derivados, variantes, fragmentos y muteínas de los mismos, ejemplos de los cuales se describen a continuación.

Una "proteína de unión a antígeno" es una proteína que comprende una porción que se une a un antígeno y, opcionalmente, un armazón o porción marco que permite que la porción de unión a antígeno adopte una conformación que promueva la unión de la proteína de unión a antígeno al antígeno. Algunos ejemplos de proteínas de unión a antígeno incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, una porción de unión a antígeno de un anticuerpo), derivados de anticuerpos y análogos de anticuerpos. La proteína de unión a antígeno puede comprender, por ejemplo, un andamio proteico alternativo o un andamio artificial con CDR o derivados de CDR injertados. Tales andamios incluyen, pero no se limitan a, andamios derivados de anticuerpos que comprenden mutaciones introducidas para, por ejemplo, estabilizar la estructura tridimensional de la proteína de unión al antígeno así como los andamios totalmente sintéticos que comprenden, por ejemplo, un polímero biocompatible. Véase, por ejemplo, Komdorfer *et al.*, 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Volumen 53, Artículo 1:121-129; Roque *et al.*, 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654. Además, pueden usarse miméticos de anticuerpos peptídicos ("PAM"), así como andamios basados en miméticos de anticuerpos que utilizan componentes de fibronectina como

andamios.

Una proteína de unión a antígeno puede tener, por ejemplo, la estructura de una inmunoglobulina de origen natural. Una "inmunoglobulina" es una molécula tetramérica. En una inmunoglobulina de origen natural, cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. La parte carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon y define el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de cadenas ligeras y pesadas, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase en general, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Las regiones variables de cada par de cadenas ligeras/pesadas forman el sitio de unión al anticuerpo de modo que una inmunoglobulina intacta tiene dos sitios de unión.

Las regiones variables de las cadenas de inmunoglobulina de origen natural exhiben la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Desde el N terminal hasta el C terminal, tanto las cadenas ligeras como las pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat *et al.* en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, N.º de Publicación NIH 91-3242, 1991. Otros sistemas de numeración para los aminoácidos en las cadenas de inmunoglobulinas incluyen IMGT® (el sistema de información internacional ImMunoGeneTics; Lefranc *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* 29:185-203; 2005) y AHo (Honegger y Pluckthun, *J. Mol. Biol.* 309(3):657-670; 2001).

Los anticuerpos pueden obtenerse de fuentes tales como el suero o plasma que contienen inmunoglobulinas que tienen una especificidad antigénica variada. Si tales anticuerpos se someten a purificación por afinidad, pueden enriquecerse para una especificidad antigénica particular. Tales preparaciones enriquecidas de anticuerpos están hechas habitualmente de menos de aproximadamente un 10 % de anticuerpo que tiene actividad de unión específica para el antígeno particular. Someter estas preparaciones a varias rondas de purificación por afinidad puede aumentar la proporción de anticuerpos que tienen actividad de unión específica por el antígeno. Los anticuerpos preparados de esta manera a menudo se denominan "monoespecíficos". Las preparaciones de anticuerpos monoespecíficos pueden estar formadas por aproximadamente un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 97 %, un 99 % o un 99,9 % de anticuerpo que tiene actividad de unión específica por el antígeno particular.

Un "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina intacta o a una porción de unión a antígeno de la misma que compete con el anticuerpo intacto por la unión específica, a menos que se especifique lo contrario. Las porciones de unión a antígeno pueden producirse por técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Las porciones de unión a antígeno incluyen, entre otros, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio (dAb) y fragmentos de la región determinante de la complementariedad (CDR), fragmentos de región variable, anticuerpos de cadena única (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir un antígeno específico a la unión al polipéptido.

Un fragmento Fab es un fragmento monovalente que tiene los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}; un fragmento F(ab')₂ es un fragmento bivalente que tiene dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd tiene los dominios V_H y C_{H1}; un fragmento Fv tiene los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; y un fragmento dAb tiene un dominio V_H, un dominio V_L o un fragmento de unión a antígeno de un dominio V_H o V_L (Patente de EE.UU. N.º 6.846.634, 6.696.245, Pub. Sol. de EE.UU. N.º 05/0202512, 04/0202995, 04/0038291, 04/0009507, 03/0039958, Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546, 1989).

Un anticuerpo de cadena única (scFv) es un anticuerpo en donde una región V_L y una V_H se unen a través de un enlazador (por ejemplo, una secuencia sintética de restos de aminoácidos) para formar una cadena de proteína continua en donde el enlazador es lo suficientemente largo para permitir que la cadena de proteína se repliegue sobre sí misma y forme un sitio de unión a antígeno monovalente (véase, por ejemplo, Bird *et al.*, 1988, *Science* 242:423-26 y Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83). Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes que comprenden dos cadenas polipeptídicas, en donde cada cadena polipeptídica comprende dominios V_h y V_l unidos por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios en la misma cadena, permitiendo así que cada dominio se empareje con un dominio complementario en otra cadena polipeptídica (véase, por ejemplo, Holliger *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48 y Poljak *et al.*, 1994, *Estructura* 2:1121-23). Si las dos cadenas polipeptídicas de un diacuerpo son idénticas, entonces un diacuerpo resultante de su emparejamiento tendrá dos sitios de unión a antígeno idénticos. Se pueden usar cadenas polipeptídicas que tienen diferentes secuencias para hacer un diacuerpo con dos sitios de unión a antígeno diferentes. De forma similar, los

triacuerpos y los tetracuerpos son anticuerpos que comprenden tres y cuatro cadenas polipeptídicas, respectivamente, y que forman tres y cuatro sitios de unión a antígeno, respectivamente, que pueden ser iguales o diferentes.

- 5 Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y las regiones marco (FR) de un anticuerpo dado pueden identificarse utilizando el sistema descrito por Kabat *et al. supra*; Lefranc *et al., supra* y/o Honegger y Pluckthun, *supra*. Pueden incorporarse una o más CDR en una molécula covalentemente o no covalentemente para convertirla en una proteína de unión a antígeno. Una proteína de unión a antígeno puede incorporar la o las CDR como parte de una cadena polipeptídica más grande, puede enlazar covalentemente la o las CDR a otra cadena polipeptídica o puede incorporar la o las CDR no covalentemente. Las CDR permiten que la proteína de unión a antígeno se una específicamente a un antígeno particular de interés.

- 15 Una proteína de unión a antígeno puede tener uno o más sitios de unión. Si hay más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina humana de origen natural tiene típicamente dos sitios de unión idénticos, mientras que un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene dos sitios de unión diferentes.

- 20 La frase "anticuerpo humano" incluye todos los anticuerpos que tienen una o más regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. En una realización, todos los dominios variables y constantes derivan de secuencias de inmunoglobulina humana (un anticuerpo completamente humano). Estos anticuerpos pueden prepararse de varias maneras, ejemplos de las cuales se describen a continuación, incluyendo a través de la inmunización con un antígeno de interés de un ratón que está genéticamente modificado para expresar anticuerpos derivados de genes que codifican cadenas pesadas y/o ligeras humanas.

- 25 Un anticuerpo humanizado tiene una secuencia que difiere de la secuencia de un anticuerpo derivado de una especie no humana por una o más sustituciones, supresiones y/o adiciones de aminoácidos, de modo que es menos probable que el anticuerpo humanizado induzca una respuesta inmune y/o induzca una respuesta inmune menos grave, en comparación con el anticuerpo de especie no humana, cuando se administra a un sujeto humano. En una realización, ciertos aminoácidos en los dominios marco y constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras del anticuerpo de especie no humana se mutan para producir el anticuerpo humanizado. En otra realización, el dominio o dominios constantes de un anticuerpo humano se fusionan al dominio o dominios variables de una especie no humana. En otra realización, uno o más restos de aminoácidos en una o más secuencias CDR de un anticuerpo no humano se cambian para reducir la posible inmunogenicidad del anticuerpo no humano cuando se administra a un sujeto humano, en donde los restos de aminoácidos cambiados no son críticos para la unión inmunoespecífica del anticuerpo a su antígeno, o los cambios en la secuencia de aminoácidos que se realizan son cambios conservativos, de tal manera que la unión del anticuerpo humanizado al antígeno no es significativamente peor que la unión del anticuerpo no humano al antígeno. Algunos ejemplos de cómo fabricar anticuerpos humanizados pueden encontrarse en las Pat. de EE.UU. N.º 6.054.297, 5.886.152 y 5.877.293.

- 40 La frase "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de uno o más anticuerpos. En una realización, una o más de las CDR derivan de un anticuerpo anti-alfa4beta7 humano. En otra realización, todas las CDR derivan de un anticuerpo anti-alfa4beta7 humano. En otra realización, las CDR de más de un anticuerpo humano anti-alfa4beta7 se mezclan y se combinan en un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender una CDR1 de la cadena ligera de un primer anticuerpo humano anti-alfa4beta7, una CDR2 y una CDR3 de la cadena ligera de un segundo anticuerpo anti-alfa4beta7 humano, y las CDR de la cadena pesada de un tercer anticuerpo anti-alfa4beta7. Otras combinaciones son posibles y están incluidas dentro de las realizaciones de la invención.

- 50 Adicionalmente, las regiones marco pueden derivar de uno de los mismos anticuerpos anti-alfa4beta7, de uno o más anticuerpos diferentes, tales como un anticuerpo humano, o de un anticuerpo humanizado. En un ejemplo de un anticuerpo quimérico, una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a, homóloga a o derivada de un anticuerpo de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es/son idénticas a, homólogas a o derivadas de un anticuerpo o anticuerpos de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo. También se incluyen fragmentos de dichos anticuerpos que exhiben la actividad biológica deseada (es decir, la capacidad de unirse específicamente a alfa4beta7). Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.816.567 y Morrison, 1985, Science 229:1202-07.

- 60 Un "anticuerpo neutralizante" o un "anticuerpo inhibidor" es un anticuerpo que inhibe la interacción de alfa4beta7 con MAdCAM-1 cuando un exceso del anticuerpo anti-alfa4beta7 reduce la cantidad de interacción en al menos aproximadamente el 20 % usando un ensayo tales como aquellos descritos en el presente documento en los Ejemplos. En diversas realizaciones, la proteína de unión al antígeno reduce la interacción de alfa4beta7 con MAdCAM-1 alfa4beta7 en al menos un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 97 %, un 99 % y un 99,9 %.

- 65 Aquellos expertos en la materia pueden preparar fácilmente fragmentos o análogos de anticuerpos siguiendo las enseñanzas de esta memoria descriptiva y usando técnicas bien conocidas en la técnica. Los amino y carboxi

terminales de los fragmentos o análogos se encuentran cerca de los límites de los dominios funcionales. Pueden identificarse dominios estructurales y funcionales por comparación de los datos de los nucleótidos y/o las secuencias de aminoácidos en bases de datos públicas o privadas. Pueden usarse métodos informatizados de comparación para identificar motivos de secuencias o predecir los dominios de conformación de proteínas que se producen en otras proteínas de estructura y/o función conocida. Se conocen métodos para identificar secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Véase, por ejemplo, Bowie *et al.*, 1991, Science 253:164.

Un "anticuerpo injertado en la CDR" es un anticuerpo que comprende una o más CDR derivadas de un anticuerpo de una especie o isotipo particular y el marco de otro anticuerpo de la misma especie o isotipo diferente o diferente.

Un "anticuerpo multiespecífico" es un anticuerpo que reconoce más de un epítipo en uno o más antígenos. Una subclase de este tipo de anticuerpo es un "anticuerpo biespecífico" que reconoce dos epítopos distintos en el mismo o en diferentes antígenos.

Una proteína de unión a antígeno "se une específicamente" a un antígeno (por ejemplo, alfa4beta7 humana) si se une al antígeno con una constante de disociación de 1 nanomolar o menos. Como se usa en el presente documento, una proteína de unión a antígeno es "específica para heterodímeros" si se une a una primera integrina heterodimérica pero no a otras integrinas que comparten una cadena con la primera integrina. Por ejemplo, un anticuerpo que es alfa4beta7 heterodímero específico se unirá a alfa4beta7 pero no a alfa4beta1 o alfaEbeta7.

Se sabe que las integrinas se adaptan diferentes conformaciones, dependiendo del estado de activación de la célula o células que los expresa y de la presencia o ausencia de ciertos iones metálicos. Una integrina en conformación "activa" se une a su ligando afín con mayor afinidad que la misma integrina en conformación "inactiva". Una proteína de unión a antígeno puede unirse a una integrina solo en su conformación activa, solo en su conformación inactiva o en ambas o cualquiera de las conformaciones. Por ejemplo, una proteína de unión al antígeno heterodímero alfa4beta7 específica puede unirse a alfa4beta7 en presencia o ausencia del catión divalente manganeso²⁺ (Mn²⁺), lo que indica que la proteína de unión al antígeno se une tanto a alfa4beta7 activa como inactiva.

Un "dominio de unión a antígeno", "región de unión a antígeno" o "sitio de unión a antígeno" es una porción de una proteína de unión a antígeno que contiene restos de aminoácidos (u otros restos) que interactúan con un antígeno y contribuyen a la especificidad y afinidad por el antígeno de la proteína de unión a antígeno. Para un anticuerpo que se une específicamente a su antígeno, esto incluirá al menos parte de al menos uno de sus dominios CDR.

Un "epítipo" es la porción de una molécula que está unida por una proteína de unión a antígeno (por ejemplo, por un anticuerpo). Un epítipo puede comprender porciones no contiguas de la molécula (por ejemplo, en un polipéptido, restos de aminoácidos que no son contiguos en la secuencia primaria del polipéptido pero que, en el contexto de la estructura terciaria y cuaternaria del polipéptido, están lo suficientemente cerca entre sí como para unirse a una proteína de unión a antígeno).

El "porcentaje de identidad" de dos polinucleótidos o dos secuencias polipeptídicas se determina comparando las secuencias usando el programa informático GAP (una parte del paquete GCG Wisconsin, versión 10.3 (Accelrys, San Diego, CA)) usando sus parámetros por defecto.

Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente en todas partes e incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), análogos del ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos y análogos de nucleótidos que no se producen de forma natural) e híbridos de los mismos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria. En una realización, las moléculas de ácido nucleico de la invención comprenden un marco de lectura abierto contiguo que codifica un anticuerpo, o un fragmento, derivado, muteína, o variante de la misma, de la invención.

Dos polinucleótidos monocatenarios son "el complemento" uno del otro si sus secuencias pueden alinearse en una orientación antiparalela de modo que cada nucleótido en un polinucleótido esté opuesto a su nucleótido complementario en el otro polinucleótido, sin la introducción de huecos, y sin nucleótidos desapareados en el extremo 5' o 3' de cada secuencia. Un polinucleótido es "complementario" a otro polinucleótido si los dos polinucleótidos pueden hibridarse entre sí en condiciones moderadamente rigurosas. Por lo tanto, un polinucleótido puede ser complementario a otro polinucleótido sin ser su complemento.

Un "vector" es un ácido nucleico que puede usarse para introducir otro ácido nucleico enlazado a él en una célula. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a una molécula de ADN de doble cadena lineal o circular en donde pueden ligarse segmentos adicionales de ácido nucleico. Otro tipo de vector es un vector vírico (por ejemplo, replicación de retrovirus defectuosos, adenovirus y virus adenoasociados), en donde pueden introducirse segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en donde se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que comprenden un origen bacteriano de replicación y vectores episómicos de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episómicos) se integran en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y

por tanto, se replican junto con el genoma hospedador. Un "vector de expresión" es un tipo de vector que puede dirigir la expresión de un polinucleótido elegido.

5 Una secuencia de nucleótidos está "unida operativamente" a una secuencia reguladora si la secuencia reguladora afecta a la expresión (por ejemplo, el nivel, el tiempo, o la ubicación de la expresión) de la secuencia de nucleótidos. Una "secuencia reguladora" es un ácido nucleico que afecta a la expresión (por ejemplo, el nivel, el tiempo, o la ubicación de la expresión) de un ácido nucleico al que está unido operativamente. La secuencia reguladora puede, por ejemplo, ejercer sus efectos directamente sobre el ácido nucleico regulado o a través de la acción de una o más moléculas distintas (por ejemplo, polipéptidos que se unen a la secuencia reguladora y/o al ácido nucleico). Algunos ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Algunos ejemplos adicionales de secuencias reguladoras se describen en, por ejemplo, Goeddel, 1990, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA y Baron *et al.*, 1995, *Nucleic Acids Res.* 23:3605-06.

15 Una "célula hospedadora" es una célula que puede usarse para expresar un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico de la invención. Una célula hospedadora puede ser un procarionta, por ejemplo, *E. coli*, o puede ser un eucariota, por ejemplo, un eucariota unicelular (por ejemplo, una levadura u otro hongo), una célula vegetal (por ejemplo, una célula vegetal de tabaco o tomate), una célula animal (por ejemplo, una célula humana, una célula de mono, una célula de hámster, una célula de rata, una célula de ratón o una célula de insecto) o un hibridoma. Los ejemplos de células hospedadoras incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (véase Gluzman *et al.*, 1981, *Cell* 23:175), células L, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO) o sus derivados tales como Veggie CHO y líneas celulares relacionadas que crecen en medios sin suero (véase Rasmussen *et al.*, 1998, *Cytotechnology* 28:31) o la cepa CHO DX-B11, que es deficiente en DHFR (véase Urlaub *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-20), células HeLa, líneas celulares BHK (ATCC CRL 10), la línea celular CV1/EBNA derivada de la línea celular CV1 de riñón de mono verde africano (ATCC CCL 70) (véase McMahan *et al.*, 1991, *EMBO J.* 10:2821), células renales embrionarias humanas tales como 293, 293 EBNA o MSR 293, células A431 epidérmicas humanas, células Colo205 humanas, otras líneas celulares de primate transformadas, células diploides normales, cepas celulares derivadas de cultivo *in vitro* del tejido primario, explantes primarios, HL-60, U937, células HaK o Jurkat. Típicamente, una célula hospedadora es una célula cultivada que se puede transformar o transfectar con un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que después puede expresarse en la célula hospedadora. La frase "célula hospedadora recombinante" puede usarse para denotar una célula hospedadora que se ha transformado o transfectado con un ácido nucleico para expresarse. Una célula hospedadora también puede ser una célula que comprende el ácido nucleico pero no lo expresa a un nivel deseado a menos que se introduzca una secuencia reguladora en la célula hospedadora de manera que quede unida operativamente con el ácido nucleico. Se entiende que el término célula hospedadora se refiere no solo a la célula sujeto particular, sino también a la progenie o progenie potencial de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a, por ejemplo, mutación o influencia ambiental, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula madre, pero aún así se incluyen dentro del alcance del término como se usa en el presente documento.

40 Proteínas de unión a antígeno

En un aspecto, la presente descripción proporciona proteínas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, derivados de anticuerpos, muteínas de anticuerpos y variantes de anticuerpos) que se unen a alfa4beta7, por ejemplo, alfa4beta7 humana.

Las proteínas de unión a antígeno de acuerdo con la presente divulgación incluyen proteínas de unión a antígeno que inhiben una actividad biológica de alfa4beta7. Algunos ejemplos de tales actividades biológicas incluyen la unión de alfa4beta7 a MAdCAM-1 y la adhesión entre células que expresan alfa4beta7 y aquellas que expresan MAdCAM-1. Otras actividades biológicas incluyen aquellas mediadas por alfa4beta7 *in vivo*, tales como el tráfico o la migración; en particular, alfa4beta7 está implicado en el tráfico de linfocitos al intestino. El aumento de la expresión de MAdCAM-1 en el intestino inflamado mejora el reclutamiento de linfocitos que expresan alfa4beta7 en el intestino, donde la activación aberrante de linfocitos aumenta la respuesta inflamatoria y el daño tisular.

55 Diferentes proteínas de unión a antígeno pueden unirse a diferentes dominios o epítopos de alfa4beta7 o actuar por diferentes mecanismos de acción. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, proteínas de unión a antígeno que interfieren con la capacidad de alfa4beta7 para unirse a MAdCAM-1 o que inhiben interacciones celulares tales como la adhesión entre células que expresan alfa4beta7 y células que expresan MAdCAM-1. El sitio de acción puede ser, por ejemplo, intracelular (por ejemplo, interfiriendo con una cascada de señalización intracelular) o extracelular. Una proteína de unión a antígeno no necesita inhibir completamente la actividad inducida por alfa4beta7 para encontrar uso en la presente invención; más bien, las proteínas de unión a antígeno que reducen una actividad particular de alfa4beta7 también se contemplan para su uso. (Las discusiones en el presente documento sobre mecanismos de acción particulares de las proteínas de unión al antígeno de unión a alfa4beta7 en el tratamiento de enfermedades particulares son solo ilustrativas, y los métodos presentados en el presente documento no están vinculados de ese modo).

Otros derivados de anticuerpos anti-alfa4beta7 dentro del alcance de la presente invención incluyen conjugados covalentes o agregantes de los anticuerpos monoclonales anti-alfa4beta7 como se define en las reivindicaciones con otras proteínas o polipéptidos, tal como mediante la expresión de proteínas de fusión recombinantes que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados al N terminal o al C terminal del anticuerpo. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser un polipéptido señal (o líder) heterólogo, por ejemplo, el líder del factor alfa de la levadura, o un péptido como una etiqueta de epítipo. Las proteínas de fusión que contienen anticuerpos monoclonales pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación o identificación de la proteína de unión a antígeno (por ejemplo, poli-His). El anticuerpo monoclonal también puede unirse al péptido FLAG® Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 62) como se describe en Hopp *et al.*, *Bio/Technology* 6:1204, 1988 y la Patente de EE.UU. 5.011.912. El péptido FLAG® es altamente antigénico y proporciona un epítipo unido de manera reversible por un anticuerpo monoclonal específico (mAb), permitiendo el ensayo rápido y la purificación fácil de la proteína recombinante expresada. Los reactivos útiles para preparar proteínas de fusión en donde el péptido FLAG® se fusiona con un polipéptido dado están disponibles comercialmente (Sigma-Aldrich, St. Louis MO).

Los oligómeros que contienen una o más proteínas de unión a antígeno pueden emplearse como antagonistas alfa4beta7. Los oligómeros pueden estar en forma de dímeros, trímeros u oligómeros superiores unidos covalentemente o no covalentemente. Los oligómeros que comprenden dos o más proteínas de unión a antígeno se contemplan para su uso, siendo un ejemplo un homodímero. Otros oligómeros incluyen heterodímeros, homotrímeros, heterotrímeros, homotetrámeros, heterotetrámeros, etc.

Una realización se dirige a oligómeros que comprenden múltiples proteínas de unión a antígeno unidas a través de interacciones covalentes o no covalentes entre restos peptídicos fusionados a las proteínas de unión a antígeno. Dichos péptidos pueden ser enlazadores de péptidos (espaciadores), o péptidos que tienen la propiedad de promover la oligomerización. Las cremalleras de leucina y ciertos polipéptidos derivados de anticuerpos se encuentran entre los péptidos que pueden promover la oligomerización de proteínas de unión a antígeno adheridas a ellos, como se describe con más detalle a continuación.

En realizaciones particulares, Los oligómeros comprenden de dos a cuatro proteínas de unión a antígeno. Las proteínas de unión al antígeno del oligómero pueden estar en cualquier forma, tales como cualquiera de las formas descritas anteriormente, por ejemplo, variantes o fragmentos. Preferentemente, los oligómeros comprenden proteínas de unión a antígeno que tienen actividad de unión a alfa4beta7.

En una realización, se prepara un oligómero usando polipéptidos derivados de inmunoglobulinas. Se ha descrito la preparación de proteínas de fusión que comprenden ciertos polipéptidos heterólogos fusionados a varias porciones de polipéptidos derivados de anticuerpos (incluyendo el dominio Fc), por ejemplo, por Ashkenazi *et al.*, 1991, PNAS USA 88:10535; Byrn *et al.*, 1990, Nature 344:677; y Hollenbaugh *et al.*, 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en *Current Protocols in Immunology*, Supl. 4, páginas 10.19.1 - 10.19.11.

Una realización de la presente divulgación se dirige a un dímero que comprende dos proteínas de fusión creadas mediante la fusión de un fragmento de unión alfa4beta7 de un anticuerpo anti-alfa4beta7 a la región Fc de un anticuerpo. El dímero puede fabricarse, por ejemplo, insertando una fusión génica que codifica la proteína de fusión en un vector de expresión apropiado, expresando la fusión génica en células hospedadoras transformadas con el vector de expresión recombinante y permitiendo que la proteína de fusión expresada se ensamble de manera muy similar a las moléculas de anticuerpos, después de lo cual se forman enlaces disulfuro entre las cadenas Fc para producir el dímero.

La frase "polipéptido Fc" como se usa en el presente documento incluye formas nativas y muteínas de polipéptidos derivados de la región Fc de un anticuerpo. También se incluyen formas truncadas de tales polipéptidos que contienen la región bisagra que promueve la dimerización. Las proteínas de fusión que comprenden restos Fc (y oligómeros formados a partir de los mismos) ofrecen la ventaja de una purificación fácil mediante cromatografía de afinidad sobre columnas de Proteína A o Proteína G.

Un polipéptido Fc adecuado, descrito en la solicitud PCT WO 93/10151 es un polipéptido de cadena única que se extiende desde la región bisagra N-terminal al C-terminal nativo de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano. Otro polipéptido Fc útil es la muteína Fc descrita en la Patente de EE.UU. 5.457.035 y en Baum. *et al.*, 1994, EMBO J. 13:3992-4001. La secuencia de aminoácidos de esta muteína es idéntica a la de la secuencia Fc nativa presentada en el documento WO 93/10151, excepto que el aminoácido 19 se ha cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 se ha cambiado de Leu a Glu y el aminoácido 22 se ha cambiado de Gly a Ala. La muteína exhibe una afinidad reducida por los receptores Fc.

En otras realizaciones, la porción variable de las cadenas pesadas y/o ligeras de un anticuerpo anti-alfa4beta7 puede sustituirse por la porción variable de una cadena pesada y/o ligera de anticuerpos.

Como alternativa, el oligómero es una proteína de fusión que comprende múltiples proteínas de unión a antígeno, con o sin enlazadores peptídicos (péptidos espaciadores). Entre los enlazadores peptídicos adecuados están aquellos descritos en las Patentes de EE.UU. 4.751.180 y 4.935.233.

Otro método para preparar proteínas de unión al antígeno oligomérico implica el uso de una cremallera de leucina. Los dominios de cremallera de leucina son péptidos que promueven la oligomerización de las proteínas en las cuales se encuentran. Las cremalleras de leucina se identificaron originalmente en varias proteínas de unión al ADN (Landschulz *et al.*, 1988, Science 240:1759) y desde entonces se han descubierto en una diversidad de proteínas diferentes. Entre las cremalleras de leucina conocidas se encuentran péptidos naturales y derivados de los mismos que dimerizan o trimerizan. Algunos ejemplos de dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas oligoméricas solubles se describen en la solicitud PCT WO 94/10308 y la cremallera de leucina derivada de la proteína D del tensoactivo (SPD) pulmonar descrita en Hoppe *et al.*, 1994, FEBS Letters 344:191. El uso de una cremallera de leucina modificada que permite la trimerización estable de una proteína heteróloga fusionada a la misma se describe en Fanslow *et al.*, 1994, Semin. Immunol. 6:267-78. En un enfoque, las proteínas de fusión recombinantes que comprenden un fragmento de anticuerpo anti-alfa4beta7 fusionado con un péptido de cremallera de leucina se expresan en células hospedadoras adecuadas y los fragmentos de anticuerpo anti-alfa4beta7 oligoméricos solubles o derivados que se forman se recuperan del sobrenadante del cultivo.

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal como se define en las reivindicaciones que interfieren con la unión de alfa4beta7 a MAdCAM-1. Tal anticuerpo monoclonal puede producirse contra alfa4beta7, o un fragmento, variante o derivado del mismo, y se analizan en ensayos convencionales para determinar la capacidad de interferir con la unión de alfa4beta7 a MAdCAM-1. Algunos ejemplos de ensayos adecuados son ensayos que prueban las proteínas de unión a antígeno para determinar la capacidad de inhibir la unión de MAdCAM-1 (es decir, MAdCAM-1 soluble) a células que expresan alfa4beta7, o que prueban proteínas de unión a antígeno para determinar la capacidad de reducir una respuesta biológica o celular que resulta de la interacción de MAdCAM-1 y alfa4beta7 (es decir, adhesión de células que expresan alfa4beta7 a MAdCAM-1, o células que expresan MAdCAM-1). Algunos ensayos adicionales que prueban las proteínas de unión a antígeno incluyen aquellos que comparan cualitativa o cuantitativamente la unión de una proteína de unión a antígeno a un polipéptido alfa4beta7 a la unión de una proteína de unión a antígeno conocida a un polipéptido alfa4beta7, varios ejemplos de los cuales se describen en el presente documento.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una proteína de unión a antígeno que demuestra la selectividad de especies. En una realización, la proteína de unión al antígeno se une a uno o más alfa4beta7 de mamíferos, por ejemplo, a alfa4beta7 humano y uno o más de alfa4beta7 de ratón, de rata, de cobaya, de hámster, de jerbo, de gato, de conejo, de perro, de cabra, de oveja, de vaca, de caballo, de camello y de primate no humano. En otra realización, la proteína de unión al antígeno se une a uno o más alfa4beta7 de primate, por ejemplo, a alfa4beta7 humano y uno o más de alfa4beta7 de macaco cangrejero, de tití, de macaco de la India, de tamarino y de chimpancé. En otra realización, la proteína de unión al antígeno se une específicamente a alfa4beta7 de humano, de macaco cangrejero, de tití, de macaco de la India, de tamarino o de chimpancé. En otra realización, la proteína de unión al antígeno no se une a uno o más de alfa4beta7 de ratón, de rata, de cobaya, de hámster, de jerbo, de gato, de conejo, de perro, de cabra, de oveja, de vaca, de caballo, de camello y de primate no humano. En otra realización, la proteína de unión al antígeno no se une a una especie de mono del Nuevo Mundo, tales como un tití.

En otra realización, la proteína de unión a antígeno no exhibe unión específica a ninguna proteína de origen natural distinta de alfa4beta7. En otra realización, la proteína de unión a antígeno no exhibe unión específica a ninguna proteína de origen natural distinta de alfa4beta7 de mamífero. En otra realización, la proteína de unión a antígeno no exhibe unión específica a ninguna proteína de origen natural distinta de alfa4beta7 de primate. En otra realización, la proteína de unión a antígeno no exhibe unión específica a ninguna proteína de origen natural distinta de alfa4beta7 de humano. En otra realización, la proteína de unión al antígeno se une específicamente a alfa4beta7 de al menos un primate no humano, por ejemplo, de macaco cangrejero, y alfa4beta7 de humano. En otra realización, la proteína de unión al antígeno se une específicamente a alfa4beta7 de primate no humano, de macaco cangrejero y de humano con una afinidad de unión similar. En otra realización, la proteína de unión al antígeno bloquea una actividad de alfa4beta7 de primate no humano, de macaco cangrejero y de humano. En otra realización, la proteína de unión al antígeno tiene una CI_{50} o CE_{50} similar contra alfa4beta7 de primate no humano, de macaco cangrejero y de humano en un ensayo como se describe en el presente documento.

Uno puede determinar la selectividad de una proteína de unión a antígeno para una alfa4beta7 usando métodos bien conocidos en la técnica y siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva. Por ejemplo, uno puede determinar la selectividad usando transferencia Western, FACS, ELISA o RIA.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una proteína de unión al antígeno de unión a alfa4beta7 (por ejemplo, un anticuerpo anti-alfa4beta7), que tiene una o más de las siguientes características: se une tanto a alfa4beta7 de humano como de primate no humano, inhibe la unión de MAdCAM-1 a alfa4beta7, inhibe la adhesión de células que expresan alfa4beta7 a MAdCAM-1, inhibe la adhesión de células que expresan alfa4beta7 a células que expresan MAdCAM-1, inhibe el tráfico de células que expresan alfa4beta7 a tejidos que comprenden células que expresan MAdCAM-1, une formas tanto activas como inactivas de alfa4beta7, provoca relativamente poca regulación negativa de alfa4beta7 expresada en la superficie celular.

Los fragmentos de unión a antígeno de las proteínas de unión a antígeno de la divulgación pueden producirse

mediante técnicas convencionales. Algunos ejemplos de tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab y F(ab')₂. También se contemplan los fragmentos de anticuerpos y derivados producidos por técnicas de ingeniería genética.

5 Algunas realizaciones adicionales incluyen anticuerpos quiméricos, por ejemplo, versiones humanizadas de anticuerpos monoclonales no humanos (*por ejemplo*, murinos). Tales anticuerpos humanizados pueden prepararse mediante técnicas conocidas, y ofrecen la ventaja de una inmunogenicidad reducida cuando los anticuerpos se administran a seres humanos. En una realización, un anticuerpo monoclonal humanizado comprende el dominio variable de un anticuerpo murino (o todo o parte de su sitio de unión al antígeno) y un dominio constante derivado de un anticuerpo humano. Como alternativa, un fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal murino y un fragmento de dominio variable (que carece del sitio de unión a antígeno) derivado de un anticuerpo humano. Los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales quiméricos y de ingeniería adicional incluyen aquellos descritos en Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332:323, Liu *et al.*, 1987, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:3439, Larrick *et al.*, 1989, Bio/Technology 7:934 y Winter *et al.*, 1993, TIPS 14:139. En una realización, el anticuerpo quimérico es un anticuerpo injertado con CDR. Las técnicas para humanizar anticuerpos se discuten en, por ejemplo, la Sol. de Pat. de EE.UU. N.º 10/194.975 (publicada el 27 de febrero de 2003), Pat. de EE.UU. N.º 5.869.619, 5.225.539, 5.821.337, 5.859.205, Padlan *et al.*, 1995, FASEB J. 9:133-39 Y Tamura *et al.*, 2000, J. Immunol. 164:1432-41.

20 Se han desarrollado procedimientos para generar anticuerpos humanos o parcialmente humanos en animales no humanos. Por ejemplo, se han preparado ratones en donde se han inactivado uno o más genes de inmunoglobulina endógenos por diversos medios. Se han introducido genes de inmunoglobulina humana en los ratones para reemplazar los genes de ratón inactivados. Los anticuerpos producidos en el animal incorporan cadenas polipeptídicas de inmunoglobulina humana codificadas por el material genético humano introducido en el animal. En una realización, un animal no humano, tal como un ratón transgénico, se inmuniza con un polipéptido alfa4beta7, de tal manera que los anticuerpos dirigidos contra el polipéptido alfa4beta7 se generan en el animal. Un ejemplo de un inmunógeno adecuado es un alfa4beta7 humano soluble, tales como un polipéptido que comprende una porción de alfa4beta7 u otro fragmento inmunogénico de alfa4beta7. Otro ejemplo de un inmunógeno adecuado son las células que expresan altos niveles de alfa4beta7, o preparaciones de membrana celular de las mismas.

30 Algunos ejemplos de técnicas para la producción y uso de animales transgénicos para la producción de anticuerpos humanos o parcialmente humanos se describen en las Patentes de EE.UU. 5.814.318, 5.569.825 y 5.545.806, Davis *et al.*, 2003, *Production of human antibodies from transgenic mice* en Lo, ed. Antibody Engineering: Methods and Protocols, Humana Press, NJ: 191-200, Kellermann *et al.*, 2002, Curr Opin Biotechnol. 13:593-97, Russel *et al.*, 2000, Infect Immun. 68:1820-26, Gallo *et al.*, 2000, Eur J Immun. 30:534-40, Davis *et al.*, 1999, Cancer Metastasis Rev. 18:421-25, Green, 1999, J Immunol Methods. 231:11-23, Jakobovits, 1998, Adv Drug Deliv Rev 31:33-42, Green *et al.*, 1998, J Exp Med. 188:483-95, Jakobovits A, 1998, Exp. Opin. Invest. Drugs. 7:607-14, Tsuda *et al.*, 1997, Genomics 42:413-21, Mendez *et al.*, 1997, Nat Genet. 15:146-56, Jakobovits, 1994, Curr Biol. 4:761- 63, Arbones *et al.*, 1994, Immunity. 1:247-60, Green *et al.*, 1994, Nat Genet. 7:13-21, Jakobovits *et al.*, 1993, Nature 362:255-58, Jakobovits *et al.*, 1993, Proc Natl Acad Sci USA. 90:2551-55. Chen, J. et al., 1993, Int Immunol 5: 647-656, Choi *et al.*, 1993, Nature Genetics 4: 117-23, Fishwild *et al.*, 1996, Nat Biotechnol 14: 845-51, Harding *et al.*, 1995, Ann NY Acad Sci, Lonberg *et al.*, 1994, Nature 368: 856-59, Lonberg, 1994, *Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies* in Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101, Lonberg *et al.*, 1995, Int Rev Immunol 13: 65-93, Neuberger, 1996, Nat Biotechnol 14: 826, Taylor *et al.*, 1992, Nucleic Acids Research 20: 6287-95, Taylor *et al.*, 1994, Int Immunol 6: 579-91, Tomizuka *et al.*, 1997, Nat Gen 16: 133-43, Tomizuka *et al.*, 2000, Proc Natl Acad Sci USA. 97: 722-27, Tuailleon *et al.*, 1993, Proc Natl Acad Sci USA. 90: 3720-24 y Tuailleon *et al.*, 1994, J Immunol 152: 2912-20. Estos y otros ejemplos también se discuten en la Publicación de la solicitud de patente de EE.UU. 2007-0098715, publicada el 3 de mayo de 2007.

50 En otro aspecto, La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen a alfa4beta7 como se define en las reivindicaciones. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo, inmortalizando células de bazo extraídas del animal transgénico después de completar el programa de inmunización. Las células del bazo pueden inmortalizarse utilizando cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo, fusionándolas con células de mieloma para producir hibridomas. Las células de mieloma para su uso en procedimientos de fusión que producen hibridomas son preferentemente no productoras de anticuerpos, tienen una alta eficiencia de fusión y deficiencias de enzimas que las hacen incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que soportan el crecimiento de solo las células fusionadas deseadas (hibridomas). Algunos ejemplos de líneas celulares adecuadas para su uso en fusiones de ratón incluyen Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XX0 Bul; algunos ejemplos de líneas celulares usadas en fusiones de rata incluyen R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210. Otras líneas celulares útiles para fusiones celulares son U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6.

65 En una realización, una línea celular de hibridoma se produce inmunizando un animal (por ejemplo, un animal transgénico que tiene secuencias de inmunoglobulina humana) con un inmunógeno de alfa4beta7; recogiendo células de bazo del animal inmunizado; fusionando las células de bazo recogidas con una línea celular de mieloma, generando de esta manera células de hibridoma; estableciendo líneas celulares de hibridoma a partir de las células

de hibridoma e identificando una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo que se une a un polipéptido alfa4beta7. Tales líneas celulares de hibridoma y anticuerpos monoclonales anti-alfa4beta7 producidos por ellas, están abarcados por la presente invención.

5 Los anticuerpos monoclonales secretados por una línea celular de hibridoma pueden purificarse usando cualquier técnica conocida en la técnica. Los hibridomas o mAb pueden analizarse adicionalmente para identificar mAb con propiedades particulares, tales como la capacidad de bloquear una actividad inducida por alfa4beta7. Algunos ejemplos de tales análisis se proporcionan en los ejemplos a continuación.

10 Los anticuerpos monoclonales también pueden producirse usando un proceso denominado inmunización genética. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica el antígeno de interés puede incorporarse en un vector vírico (tales como un vector adenovírico). El vector resultante se usa después para desarrollar una respuesta inmunitaria contra el antígeno de interés en un animal hospedador adecuado (por ejemplo, un ratón diabético no obeso o NOD). Estas técnicas se describen sustancialmente por Ritter et al., *Biodrugs*16(l): 3 - 10 (2002).

15 La evolución molecular de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en el centro del sitio de unión del anticuerpo también se ha usado para aislar anticuerpos con afinidad aumentada, por ejemplo, anticuerpos que tienen afinidad aumentada por c-erbB-2, como se describe por Schier *et al.*, 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551. En consecuencia, tales técnicas son útiles en la preparación de anticuerpos contra alfa4beta7.

20 Pueden usarse proteínas de unión a antígeno dirigidas contra un alfa4beta7, por ejemplo, en ensayos para detectar la presencia de polipéptidos alfa4beta7 o células que expresan alfa4beta7, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Las proteínas de unión a antígeno también pueden emplearse en la purificación de proteínas alfa4beta7 mediante cromatografía de inmunoafinidad. Esas proteínas de unión a antígeno que adicionalmente pueden bloquear la interacción de MAdCAM-1 y alfa4beta7 pueden usarse para inhibir una actividad biológica que resulta de dicha interacción. Las proteínas de unión al antígeno bloqueantes pueden usarse en los métodos de la presente invención. tales proteínas de unión a antígeno que funcionan como antagonistas de alfa4beta7 pueden emplearse en el tratamiento de cualquier afección inducida por alfa4beta7, incluyendo pero no limitado a afecciones inflamatorias. En una realización, se emplea un anticuerpo monoclonal anti-alfa4beta7 humano generado por procedimientos que implican la inmunización de ratones transgénicos para tratar tales afecciones.

30 Las proteínas de unión a antígeno pueden emplearse en un procedimiento *in vitro* o administrarse *in vivo* para inhibir una actividad biológica inducida por alfa4beta7. Los trastornos causados o exacerbados (directa o indirectamente) por alfa4beta7 y su interacción con MAdCAM-1, ejemplos de los cuales se proporcionan en el presente documento, pueden tratarse de esta manera. En una realización, la presente divulgación proporciona un método terapéutico que comprende la administración *in vivo* de una proteína de unión a antígeno bloqueante de alfa4beta7 a un mamífero que la necesite en una cantidad eficaz para reducir la actividad biológica inducida por alfa4beta7.

40 Las proteínas de unión a antígeno de la divulgación incluyen anticuerpos monoclonales parcialmente humanos y completamente humanos que inhiben una actividad biológica de alfa4beta7. Una realización se dirige a un anticuerpo monoclonal humano que bloquea al menos parcialmente la interacción de alfa4beta7 humano con MAdCAM-1. En una realización, los anticuerpos se generan al inmunizar un ratón transgénico con un inmunógeno alfa4beta7. En otra realización, el inmunógeno es un polipéptido alfa4beta7 humano (por ejemplo, una célula transformada o transfectada para expresar alfa4beta7, o una célula que expresa alfa4beta7 de forma natural). Las líneas celulares de hibridoma derivadas de tales ratones inmunizados, en donde el hibridoma secreta un anticuerpo monoclonal que se une a alfa4beta7, también se proporcionan en el presente documento.

50 Aunque los anticuerpos humanos, parcialmente humanos o humanizados serán adecuados para muchas aplicaciones, particularmente aquellas que implican la administración del anticuerpo a un sujeto humano, otros tipos de proteínas de unión a antígeno serán adecuados para ciertas aplicaciones. Los anticuerpos no humanos de la divulgación pueden estar, por ejemplo, derivados de cualquier animal productor de anticuerpos, tales como ratón, rata, conejo, cabra, burro o primate no humano (tales como mono (*por ejemplo*, macaco cangrejero o macaco de la India) o simio (por ejemplo, chimpancé)). Pueden usarse anticuerpos no humanos de la divulgación, por ejemplo, en aplicaciones *in vitro* y basadas en cultivos celulares, o cualquier otra aplicación en donde una respuesta inmune al anticuerpo de la invención no se produzca, sea insignificante, pueda prevenirse, no sea una preocupación o se desee. En una realización, un anticuerpo no humano de la divulgación se administra a un sujeto no humano. En otra realización, el anticuerpo no humano no provoca una respuesta inmune en el sujeto no humano. En otra realización, el anticuerpo no humano es de la misma especie que el sujeto no humano, por ejemplo, un anticuerpo de ratón de la invención se administra a un ratón. Un anticuerpo de una especie particular puede fabricarse, por ejemplo, inmunizando a un animal de esa especie con el inmunógeno deseado (por ejemplo, células que expresan alfa4beta7, o un polipéptido alfa4beta7 soluble) o usando un sistema artificial para generar anticuerpos de esa especie (por ejemplo, un sistema de visualización de fagos o bacterias para generar anticuerpos de una especie en particular) o convirtiendo un anticuerpo de una especie en un anticuerpo de otra especie reemplazando, por ejemplo, la región constante del anticuerpo con una región constante de las otras especies, o reemplazando uno o más restos de aminoácidos del anticuerpo para que se parezca más a la secuencia de las otras especies. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que comprende secuencias de aminoácidos derivadas de

anticuerpos de dos o más especies diferentes.

Las proteínas de unión a antígeno pueden prepararse por cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden purificarse a partir de células que los expresan de forma natural (por ejemplo, un anticuerpo puede purificarse a partir de un hibridoma que lo produce) o producirse en sistemas de expresión recombinante, usando cualquier técnica conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet *et al.* (eds.), Plenum Press, Nueva York (1980); y *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988).

Puede usarse cualquier sistema de expresión conocido en la técnica para fabricar los polipéptidos recombinantes de la invención. En general, las células hospedadoras se transforman con un vector de expresión recombinante que comprende ADN que codifica un polipéptido deseado. Entre las células hospedadoras que pueden emplearse se encuentran procariontes, levaduras o células eucariotas superiores. Los procariontes incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen células de insecto y líneas celulares establecidas de origen mamífero. Algunos ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamíferos adecuadas incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman *et al.*, 1981, Cell 23:175), células L, células 293, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, líneas celulares BHK (ATCC CRL 10) y la línea celular CV1/EBNA derivada de la línea celular de riñón de mono verde africano CV1 (ATCC CCL 70) como se describe por McMahan. *et al.*, 1991, EMBO J. 10: 2821. Algunos vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con hospedadores celulares bacterianos, fúngicos, de levaduras y de mamíferos se describen por Pouwels. *et al.* (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, Nueva York, 1985).

Las células transformadas pueden cultivarse en condiciones que promueven la expresión del polipéptido, y el polipéptido puede recuperarse mediante procedimientos convencionales de purificación de proteínas. Uno de tales procedimientos de purificación incluye el uso de cromatografía de afinidad, por ejemplo, sobre una matriz que tiene todo o una porción (por ejemplo, el dominio extracelular) de alfa4beta7 unido al mismo. Los polipéptidos contemplados para su uso en el presente documento incluyen polipéptidos de anticuerpo anti-alfa4beta7 de mamífero recombinante sustancialmente homogéneos sustancialmente libres de materiales endógenos contaminantes.

La secuencia de aminoácidos de los polipéptidos puede verificarse por cualquier medio conocido en la técnica y puede ser idéntica a las secuencias desveladas en el presente documento en el Listado de secuencias, o puede diferir de esas secuencias en uno o más restos de aminoácidos como resultado del procesamiento. Por ejemplo, en todos o en una parte de los polipéptidos sustancialmente homogéneos, puede retirarse un aminoácido C-terminal de la cadena ligera o de la cadena pesada (o molécula de cadena única relevante), por procesamiento proteolítico u otro procesamiento que se produce durante el cultivo, por ejemplo, procesamiento de restos Lys C-terminales. Como alternativa, se retira más de un resto de aminoácido C-terminal, por ejemplo, dos aminoácidos C-terminales, o tres, cuatro o cinco aminoácidos C-terminales. Por ejemplo, un C-terminal podría estar truncado a la prolina amidada de la cadena pesada de un anticuerpo como se desvela. De forma similar, los aminoácidos N-terminales pueden estar ausentes, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos N-terminales pueden estar ausentes.

Alternativa o adicionalmente, los restos de aminoácidos pueden someterse a modificaciones postraduccionales, por ejemplo, pero no limitado a, la glutamina (en particular, la glutamina en el N-terminal) puede ciclarse o convertirse en ácido piroglutámico; adicional o alternativamente, los aminoácidos pueden someterse a desamidación, isomerización, glicación y/u oxidación. Los polipéptidos de la divulgación y el anticuerpo monoclonal de la invención pueden someterse a modificaciones postraduccionales adicionales, incluyendo la glicosilación, por ejemplo, glicosilación ligada a N o ligada a O, en sitios que son bien conocidos en la técnica. Como se describe anteriormente, pueden realizarse cambios en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para impedir o minimizar tales alteraciones, o para facilitarlas en circunstancias en donde tal procesamiento es beneficioso.

Las preparaciones de polipéptidos sustancialmente homogéneos pueden comprender aproximadamente un 1 %, un 5 %, un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de polipéptidos que se han sometido a una forma (o formas) particular de procesamiento. Las preparaciones de polipéptidos sustancialmente homogéneos pueden comprender algo (menos del o igual al 50 %), la mayoría (más del 50 % pero menos del 90 %) o sustancialmente la totalidad (más del 90 %) de una forma o formas particulares de polipéptidos procesados. Además, tales preparaciones pueden comprender polipéptidos que tienen niveles variables de más de un tipo de modificación relacionada con el procesamiento, por ejemplo, un polipéptido puede tener algunas, la mayoría o sustancialmente la totalidad de una lisina C-terminal retiradas (por ejemplo, la lisina C-terminal en la SEQ ID NO: 72) y algunos, la mayoría o sustancialmente la totalidad de un aminoácido N-terminal convertido en ácido piroglutámico (por ejemplo, cualquier polipéptido mostrado en la Tabla 1 y/o 2 o en las secuencias consenso).

Las proteínas de unión a antígeno pueden prepararse y examinarse para las propiedades deseadas, por cualquiera de una serie de técnicas conocidas. Algunas de las técnicas implican aislar un ácido nucleico que codifica una cadena polipeptídica (o parte de la misma) de una proteína de unión a antígeno de interés (por ejemplo, un

anticuerpo anti-alfa4beta7) y manipular el ácido nucleico mediante tecnología de ADN recombinante. El ácido nucleico puede fusionarse con otro ácido nucleico de interés o alterarse (por ejemplo, mediante mutagénesis u otras técnicas convencionales) para añadir, eliminar o sustituir uno o más restos de aminoácidos, por ejemplo.

5 En un aspecto, La presente descripción proporciona fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo anti-alfa4beta7 de la invención. Tales fragmentos pueden consistir completamente en secuencias derivadas de anticuerpos o pueden comprender secuencias adicionales. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen Fab, F(ab')₂, anticuerpos de cadena única, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos de dominio. Otros ejemplos se proporcionan en Lunde *et al.*, 2002, Biochem. Soc. Trans. 30:500-06.

10 Los anticuerpos de cadena única pueden formarse al unir fragmentos de dominio variable de cadena pesada y ligera (región Fv) a través de un puente de aminoácidos (enlace peptídico corto), dando como resultado una única cadena polipeptídica. Dichos Fv de cadena única (scFv) se han preparado fusionando el ADN que codifica un enlazador peptídico entre los ADN que codifican los dos polipéptidos de dominio variable (V_L y V_H). Los polipéptidos resultantes pueden plegarse sobre sí mismos para formar monómeros de unión a antígeno, o pueden formar multímeros (por ejemplo, dímeros, trímeros, o tetrámeros), dependiendo de la longitud de un enlazador flexible entre los dos dominios variables (Kortt *et al.*, 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt *et al.*, 2001, Biomol. Eng. 18:95- 108). Combinando diferentes polipéptidos que comprenden V_L y V_H, uno puede formar scFv multiméricos que se unen a diferentes epítopos (Kriangkum *et al.*, 2001, Biomol. Eng. 18:31-40). Las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos de cadena única incluyen aquellas descritas en la Patente de EE.UU. N.º 4.946.778; Bird, 1988, Science 242:423; Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879; Ward *et al.*, 1989, Nature 334:544, de Graaf *et al.*, 2002, Methods Mol Biol. 178:379-87.

25 El anticuerpo monoclonal de la invención puede comprender cualquier región constante conocida en la técnica. La región constante de la cadena ligera puede ser, por ejemplo, una región constante de la cadena ligera de tipo kappa o lambda, por ejemplo, una región constante de la cadena ligera de tipo kappa o lambda humana. La región constante de la cadena pesada puede ser, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de tipos alfa, delta, épsilon, gamma o mu, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de tipos alfa, delta, épsilon, gamma o mu humana. En una realización, la región constante de la cadena ligera o pesada es un fragmento, derivado, variante o muteína de una región constante natural.

35 Se conocen técnicas para derivar un anticuerpo de una subclase o isotipo diferente de un anticuerpo de interés, es decir, cambio de subclase. Por lo tanto, los anticuerpos IgG pueden derivar de un anticuerpo IgM, por ejemplo, y *viceversa*. Tales técnicas permiten la preparación de nuevos anticuerpos que poseen las propiedades de unión a antígeno de un anticuerpo dado (el anticuerpo original), pero también exhiben propiedades biológicas asociadas a un isotipo o subclase de anticuerpo diferente de la del anticuerpo parental. Pueden emplearse técnicas de ADN recombinante. El ADN clonado que codifica polipéptidos de anticuerpos particulares puede emplearse en tales procedimientos, por ejemplo, el ADN que codifica el dominio constante de un anticuerpo del isotipo deseado. Véase también Lantto. *et al.*, 2002, Methods Mol. Biol.178:303-16. Además, si se desea una IgG4, también se puede desear introducir una mutación puntual (CPSCP -> CPPCP) en la región bisagra como se describe en Bloom *et al.*, 1997, Protein Science 6:407 para aliviar una tendencia a formar enlaces disulfuro de cadena intra-H que pueden conducir a la heterogeneidad en los anticuerpos IgG4.

45 Además, también se conocen técnicas para derivar proteínas de unión a antígeno que tienen diferentes propiedades. (es decir, afinidades variables para el antígeno al que se unen). Una de estas técnicas, denominada redistribución de cadenas, consiste en mostrar repertorios de genes de dominios variables de inmunoglobulinas en la superficie del bacteriófago filamentoso, a menudo denominada visualización de fagos. La redistribución de cadenas se ha usado para preparar anticuerpos de alta afinidad para el hapteno 2-feniloxazol-5-ona, como se describe por Marks. *et al.*, 1992, BioTechnology, 10:779.

50 En otra realización, La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal como se define en las reivindicaciones que tiene una baja constante de disociación de alfa4beta7. En una realización, la proteína de unión al antígeno tiene una K_d de 100 pM o inferior. En otra realización, la K_d es 10 pM o inferior; en otra realización, es 5 pM o inferior o es 1 pM o inferior. En otra realización, la K_d es sustancialmente la misma que un anticuerpo descrito en el presente documento en los Ejemplos. En otra realización, la proteína de unión al antígeno se une a alfa4beta7 con sustancialmente la misma K_d que un anticuerpo descrito en el presente documento en los Ejemplos.

60 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una proteína de unión a antígeno que inhibe una actividad de alfa4beta7, por ejemplo, la unión (o adhesión) a MAdCAM-1, la unión a células que expresan MAdCAM-1 o la adhesión entre células que expresan alfa4beta7 y células que expresan MAdCAM-1. En una realización, la proteína de unión al antígeno tiene una CI₅₀ de 1000 pM o inferior. En otra realización, la CI₅₀ es 500 pM o inferior; en otra realización, la CI₅₀ es 100 pM o inferior. En otra realización, la CI₅₀ es sustancialmente la misma que la de un anticuerpo descrito en el presente documento en los Ejemplos. En otra realización, la proteína de unión al antígeno inhibe una actividad de alfa4beta7 con sustancialmente la misma CI₅₀ que un anticuerpo descrito en el presente documento en los Ejemplos.

65

En una realización, el anticuerpo monoclonal de la presente invención tiene una afinidad aparente por alfa4beta7 (o células que expresan alfa4beta7) de 1000 pM o inferior. En otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal exhibe una afinidad aparente de 500 pM o inferior, 200 pM o inferior, 100 pM o inferior, 80 pM o inferior, 40 pM o inferior o 15 pM o inferior. En otra realización, el anticuerpo monoclonal muestra una afinidad aparente sustancialmente igual a la de un anticuerpo descrito en el presente documento en los Ejemplos. En otra realización, la proteína de unión al antígeno tiene una afinidad aparente sustancialmente igual que la de un anticuerpo descrito en el presente documento en los Ejemplos.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una proteína de unión a antígeno que se une a formas tanto activas como inactivas de alfa4beta7. En otra realización, una proteína de unión a antígeno se une solo a una forma, o preferentemente se une a una forma, de alfa4beta7. Por ejemplo, una proteína de unión a antígeno puede unirse a alfa4beta7 en presencia o ausencia de Mn²⁺ (es decir, se une a las formas tanto activas como inactivas). Como alternativa, una proteína de unión a antígeno puede unirse a alfa4beta7 solo en presencia de Mn²⁺ o solo en ausencia de Mn²⁺, o puede unirse con mayor afinidad bajo una condición tal que otra, que indica la unión preferencial a una forma particular de alfa4beta7.

En otra realización, la presente divulgación proporciona una proteína de unión a antígeno que compite por la unión a alfa4beta7 con un anticuerpo desvelado en el presente documento. Dicha capacidad competitiva puede determinarse mediante métodos que son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la competición en la unión a células que expresan alfa4beta7 como se observa usando técnicas de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) u otros ensayos similares, por competición en un ensayo tal como un ensayo de adhesión (es decir, entre células que expresan alfa4beta7 y células que expresan MAdCAM-1) o por competición en otro ensayo descrito en el presente documento. En un aspecto, una proteína de unión a antígeno que compite por la unión a alfa4beta7 con un anticuerpo desvelado en el presente documento se une al mismo epítipo o un epítipo superpuesto (o adyacente) que el anticuerpo. En otro aspecto, la proteína de unión a antígeno que compite por la unión a alfa4beta7 con un anticuerpo desvelado en el presente documento inhibe una actividad de alfa4beta7.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una proteína de unión a antígeno que se une a la alfa4beta7 humana expresada en la superficie de una célula y, cuando se une así, inhibe la interacción alfa4beta7 con MAdCAM-1 sin provocar una reducción significativa en la cantidad de alfa4beta7 en la superficie de la célula. Puede usarse cualquier método para determinar o estimar la cantidad de alfa4beta7 en la superficie y/o en el interior de la célula. En una realización, la presente divulgación proporciona una proteína de unión a antígeno que se une a la alfa4beta7 expresada en la superficie de una célula y, cuando se une así, inhibe la interacción de alfa4beta7 con MAdCAM-1 sin aumentar significativamente la velocidad de internalización de la alfa4beta7 desde la superficie de la célula. En otras realizaciones, la unión de la proteína de unión al antígeno a la célula que expresa alfa4beta7 provoca que se internalice menos de aproximadamente un 75 %, un 50 %, un 40 %, un 30 %, un 20 %, un 15 %, un 10 %, un 5 %, un 1 % o un 0,1 % de alfa4beta7 de la superficie celular.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal como se define en las reivindicaciones que tienen una vida media de al menos un día *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, cuando se administra a un sujeto humano). En una realización, el anticuerpo monoclonal tiene una vida media de al menos tres días. En otra realización, el anticuerpo monoclonal tiene una vida media de cuatro días o más. En otra realización, el anticuerpo monoclonal tiene una vida media de ocho días o más. En otra realización, el anticuerpo monoclonal se derivatiza o se modifica de tal manera que tiene una vida media más larga en comparación con la proteína de unión a antígeno no derivatizada o no modificada. En otra realización el anticuerpo monoclonal contiene una o más mutaciones puntuales para aumentar la vida media en suero, tal como se describe en el documento WO 00/09560, publicado el 24 de febrero de 2000.

La presente divulgación proporciona además proteínas de unión a antígeno multiespecíficas, por ejemplo, proteína de unión al antígeno biespecífica, por ejemplo, proteína de unión a antígeno que se une a dos epítopos diferentes de alfa4beta7, o a un epítipo de alfa4beta7 y un epítipo de otra molécula, a través de dos sitios o regiones de unión a antígeno diferentes. Además, la proteína de unión a antígeno biespecífica como se describe en el presente documento puede comprender un sitio de unión a alfa4beta7 de uno de los anticuerpos descritos en el presente documento y una segunda región de unión a alfa4beta7 de otro de los anticuerpos descritos en el presente documento, incluyendo aquellos descritos en el presente documento por referencia a otras publicaciones. Como alternativa, una proteína de unión a antígeno biespecífica puede comprender un sitio de unión a antígeno de uno de los anticuerpos descritos en el presente documento y un segundo sitio de unión a antígeno de otro anticuerpo alfa4beta7 que se conoce en la técnica, o de un anticuerpo que se prepara por métodos conocidos o los métodos descritos en el presente documento.

Numerosos métodos de preparación de anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica y se discuten en la Solicitud de Patente de EE.UU. 09/839.632, presentada el 20 de abril de 2001. Tales métodos incluyen el uso de hibridomas híbridos como lo describe Milstein *et al.*, 1983, Nature 305:537 y otros (Patente de EE.UU. 4.474.893, Patente de EE.UU. 6.106.833) y el acoplamiento químico de fragmentos de anticuerpos (Brennan *et al.*, 1985, Science 229:81; Glennie *et al.*, 1987, J. Immunol. 139:2367; patente de EE.UU. 6.010.902). Además, los anticuerpos biespecíficos pueden producirse por medios recombinantes, por ejemplo usando restos de cremallera de leucina (es

decir, de las proteínas Fos y Jun, que preferentemente forman heterodímeros; Kostelny *et al.*, 1992, J. Immunol. 148:1547) u otras estructuras de dominio interactivo de cierre y llave como se describe en la Patente de EE.UU. 5.582.996. Algunas técnicas adicionales útiles incluyen aquellas descritas en Kortt *et al.*, 1997, *supra*; Patente de EE.UU. 5.959.083; y Patente de EE.UU. 5.807.706.

5 En otro aspecto, la proteína de unión a antígeno comprende un derivado de un anticuerpo. El anticuerpo derivatizado tal como el anticuerpo monoclonal derivatizado de la invención puede comprender cualquier molécula o sustancia que imparta una propiedad deseada al anticuerpo, tal como el aumento de la vida media en un uso particular. El anticuerpo derivatizado puede comprender, por ejemplo, un resto detectable (o de marcaje) (por ejemplo, una molécula radiactiva, colorimétrica, antigénica o enzimática, una perla detectable (tales como una perla magnética o electrodensa (por ejemplo, oro) o una molécula que se une a otra molécula (por ejemplo, biotina o estreptavidina)), un resto terapéutico o diagnóstico (por ejemplo, un resto radiactivo, citotóxico o farmacéuticamente activo) o una molécula que aumenta la adecuabilidad del anticuerpo para un uso particular (por ejemplo, administración a un sujeto, tal como un sujeto humano u otros usos *in vivo* o *in vitro*). Algunos ejemplos de moléculas que pueden usarse para derivatizar un anticuerpo incluyen la albúmina (*por ejemplo.*, seroalbúmina humana) y polietilenglicol (PEG). Los derivados de anticuerpos unidos a albúmina y PEGilados pueden prepararse usando técnicas bien conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo está conjugado o unido a la transtiretina (TTR) o una variante de TTR. La TTR o variante de TTR puede modificarse químicamente con, por ejemplo, un producto químico seleccionado del grupo que consiste en dextrano, poli(n-vinil pirrolidona), polietilenglicoles, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxitilados y alcoholes polivinílicos. Sol. de Pat. de EE.UU. N.º 20030195154.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos de selección de una molécula que se une a alfa4beta7 usando las proteínas de unión a antígeno de la presente invención. Puede usarse cualquier técnica de detección adecuada. En una realización, una molécula de alfa4beta7 o un fragmento de la misma a la que se une una proteína de unión a antígeno de la presente invención, se pone en contacto con la proteína de unión a antígeno de la invención y con otra molécula, en donde la otra molécula se une a alfa4beta7 si reduce la unión de la proteína de unión a antígeno a alfa4beta7. La unión de la proteína de unión a antígeno puede detectarse usando cualquier método adecuado, por ejemplo, un ELISA. La detección de la unión de la proteína de unión a antígeno a alfa4beta7 puede simplificarse marcando de forma detectable la proteína de unión a antígeno, como se ha descrito anteriormente. En otra realización, la molécula de unión a alfa4beta7 se analiza más a fondo para determinar si inhibe la activación y/o señalización de alfa4beta7.

35 Ácidos nucleicos

En un aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas como se define en las reivindicaciones. Los ácidos nucleicos de la divulgación comprenden, por ejemplo, polinucleótidos que codifican todo o parte de una proteína de unión a antígeno, por ejemplo, una o ambas cadenas de un anticuerpo de la invención, o un fragmento, derivado, muteína, o variante de la misma, polinucleótidos suficientes para su uso como sondas de hibridación, cebadores de PCR o cebadores de secuenciación para identificar, analizar, mutar o amplificar un polinucleótido que codifica un polipéptido, ácidos nucleicos antisentido para inhibir la expresión de un polinucleótido, y secuencias complementarias de los anteriores. Los ácidos nucleicos pueden ser de cualquier longitud. Pueden tener, por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1.000, 1.500, 3.000, 5.000 o más nucleótidos de longitud y/o puede comprender una o más secuencias adicionales, por ejemplo, secuencias reguladoras, y/o ser parte de un ácido nucleico más grande, por ejemplo, un vector. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios y pueden comprender nucleótidos de ARN y/o ADN y variantes artificiales de los mismos (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos).

Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de anticuerpos (por ejemplo, cadena pesada o ligera, solo el dominio variable o de longitud completa) pueden aislarse de células B de ratones que se han inmunizado con alfa4beta7. El ácido nucleico puede aislarse mediante procedimientos convencionales tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La invención proporciona además ácidos nucleicos que se hibridan con otros ácidos nucleicos en condiciones de hibridación particulares. Los métodos para hibridar ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Como se define en el presente documento, una condición de hibridación moderadamente rigurosa usa una solución de prelavado que contiene cloruro sódico 5X/citrato sódico (SSC), 0,5 % de SDS, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), tampón de hibridación de aproximadamente 50 % de formamida, 6X SSC y una temperatura de hibridación de 55 °C (u otras soluciones de hibridación similares, tales como una que contiene aproximadamente un 50 % de formamida, con una temperatura de hibridación de 42 °C) y condiciones de lavado de 60 °C, en 0,5X SSC, un 0,1 % de SDS. Una condición de hibridación rigurosa hibrida en 6X SSC a 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,1X SSC, SDS al 0,2 % a 68 °C. Además, un experto en la materia puede manipular las condiciones de hibridación y/o lavado para aumentar o disminuir la rigurosidad de la hibridación de tal manera que los ácidos nucleicos comprendan secuencias de nucleótidos que sean al menos un 65, un 70, un 75, un 80, un 85, un 90, un 95, un 98 o un 99 % idénticas entre sí típicamente permanezcan hibridado entre sí. Los parámetros básicos que afectan la elección de las condiciones de

hibridación y la guía para diseñar condiciones adecuadas se establecen en, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., capítulos 9 y 11; y *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4) y puede determinarse fácilmente por los expertos en la materia basándose en, por ejemplo, la longitud y/o composición de bases del ADN.

Los cambios pueden introducirse por mutación en un ácido nucleico, conduciendo así a cambios en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido (por ejemplo, una proteína de unión a antígeno) que lo codifica. Pueden introducirse mutaciones usando cualquier técnica conocida en la técnica. En una realización, uno más restos de aminoácidos particulares se cambian usando, por ejemplo, un protocolo de mutagénesis dirigido al sitio. En otra realización, uno o más restos seleccionados al azar se cambian usando, por ejemplo, un protocolo de mutagénesis aleatoria. Como sea que se fabrique, un polipéptido mutante puede expresarse y detectarse para una propiedad deseada (por ejemplo, uniendo a alfa4beta7 o bloqueando la unión de alfa4beta7 a una adhesina tal como MAdCAM).

Las mutaciones pueden introducirse en un ácido nucleico sin alterar significativamente la actividad biológica de un polipéptido que codifica. Por ejemplo, uno puede realizar sustituciones de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en restos de aminoácidos no esenciales. En una realización, una secuencia de nucleótidos, o un fragmento deseado, variante, o derivado de la misma, está mutado de tal manera que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende una o más deleciones o sustituciones de restos de aminoácidos. En otra realización, la mutagénesis inserta un aminoácido adyacente a uno o más restos de aminoácidos. Como alternativa, pueden introducirse una o más mutaciones en un ácido nucleico que cambia selectivamente la actividad biológica (por ejemplo, uniendo a alfa4beta7, inhibiendo la unión de alfa4beta7 a una adhesina tal como MAdCAM, *etc.*) de un polipéptido que codifica. Por ejemplo, la mutación puede cambiar cuantitativa o cualitativamente la actividad biológica. Algunos ejemplos de cambios cuantitativos incluyen aumentar, reducir o eliminar la actividad. Algunos ejemplos de cambios cualitativos incluyen cambiar la especificidad de antígeno de una proteína de unión a antígeno.

En otro aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que son adecuadas para su uso como cebadores o sondas de hibridación para la detección de secuencias de ácido nucleico de la invención. Una molécula de ácido nucleico de la divulgación puede comprender solo una parte de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de longitud completa de la invención, por ejemplo, un fragmento que puede usarse como sonda o cebador o un fragmento que codifica una parte activa (por ejemplo, una porción de unión alfa4beta7) de un polipéptido de la invención.

Las sondas basadas en la secuencia de un ácido nucleico de la invención pueden usarse para detectar el ácido nucleico o ácidos nucleicos similares, por ejemplo, transcritos que codifican un polipéptido de la invención. La sonda puede comprender un grupo de marcaje, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Dichas sondas pueden usarse para identificar una célula que expresa el polipéptido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona vectores que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención o una porción del mismo. Algunos ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, vectores víricos, vectores de mamíferos no episómicos y vectores de expresión, por ejemplo, vectores de expresión recombinantes.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden comprender un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora. Los vectores de expresión recombinante incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas en base a las células hospedadoras que se van a usar para la expresión, que está unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico a expresar. Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células hospedadoras (por ejemplo, potenciador génico temprano de SV40, promotor del virus del sarcoma de Rous y promotor del citomegalovirus), aquellos que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en ciertas células hospedadoras (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido, véase Voss *et al.*, 1986, *Trends Biochem. Sci.* 11:287, Maniatis *et al.*, 1987, *Science* 236:1237 y aquellos que dirigen la expresión inducible de una secuencia de nucleótidos en respuesta a un tratamiento o condición particular (por ejemplo, el promotor de metalotionina en células de mamíferos y el promotor sensible a tet y/o estreptomycin tanto en sistemas procarióticos como eucarióticos (véase *id.*). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, *etc.* Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células hospedadoras para producir por proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por los ácidos nucleicos como describen en el presente documento.

En otro aspecto, la presente invención proporciona células hospedadoras en las cuales se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención. Una célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota (por ejemplo, *E. coli*) o célula eucariota (por ejemplo, levaduras, células de insectos o mamíferos (por ejemplo, células CHO)). Puede introducirse ADN de vector en células procariotas o eucariotas mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección usados, solo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN

extraño en su genoma. A fin de identificar y seleccionar estos integrantes, se introduce generalmente un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, para resistencia a antibióticos) en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Las células transfectadas establemente e con el ácido nucleico introducido pueden identificarse mediante selección de fármacos (por ejemplo, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán), entre otros métodos.

Indicaciones

En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para tratar a un sujeto. El método puede, por ejemplo, tener un efecto generalmente saludable en el sujeto, por ejemplo, puede aumentar la longevidad esperada del sujeto. Como alternativa, el método puede, por ejemplo, tratar, prevenir, curar, aliviar o mejorar ("tratar") una enfermedad, un trastorno, una afección o una enfermedad ("una afección"). Entre las afecciones a tratar de acuerdo con la presente invención están las afecciones caracterizadas por la expresión o actividad inapropiada de alfa4beta7. Tales afecciones incluyen aquellas que están asociadas al tráfico inapropiado de células, por ejemplo, el tráfico de leucocitos (tales como linfocitos o monocitos) al tracto gastrointestinal u otros tejidos que comprenden células que expresan MAdCAM-1 (como resultado de la unión de los leucocitos a las células que expresan MAdCAM-1). Las enfermedades que pueden tratarse en consecuencia incluyen la enfermedad inflamatoria intestinal, tales como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca (esprue no tropical), enteropatía asociada a artropatías seronegativas, colitis microscópica o colagenosa, gastroenteritis eosinofílica o reservoiritis resultante de proctocolectomía y anastomosis ileoanal. Las afecciones adicionales que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen pancreatitis, mastitis, colecistitis, colangitis, pericolangitis, bronquitis crónica, sinusitis crónica y asma.

Métodos terapéuticos y administración de proteínas de unión a antígeno

Ciertos métodos proporcionados en el presente documento comprenden la administración de una proteína de unión a antígeno específica del heterodímero alfa4beta7 a un sujeto, reduciendo de esta manera una respuesta biológica inducida por alfa4beta7 que desempeña un papel en una afección particular. En realizaciones particulares, los métodos de la divulgación implican poner en contacto alfa4beta7 endógeno con una proteína de unión al antígeno alfa4beta7, por ejemplo, a través de la administración a un sujeto o en un procedimiento *ex vivo*.

El término "tratamiento" abarca el alivio o la prevención de al menos un síntoma u otro aspecto de un trastorno o la reducción de la gravedad de la enfermedad y similares. Una proteína de unión a antígeno no necesita efectuar una cura completa, o erradicar cada síntoma o manifestación de una enfermedad, para constituir un agente terapéutico viable. Como se reconoce en el campo pertinente, los fármacos empleados como agentes terapéuticos pueden reducir la gravedad de un estado de enfermedad determinado, pero no es necesario eliminar todas las manifestaciones de la enfermedad para que se consideren agentes terapéuticos útiles. De forma similar, un tratamiento administrado profilácticamente no necesita ser completamente eficaz para prevenir la aparición de una afección con el fin de constituir un agente profiláctico viable. Simplemente reduciendo el impacto de una enfermedad (por ejemplo, reduciendo el número o la gravedad de sus síntomas, o aumentando la eficacia de otro tratamiento, o produciendo otro efecto beneficioso) o reduciendo la probabilidad de que la enfermedad se produzca o empeore en un sujeto, es suficiente. Una realización de la divulgación se dirige a un método que comprende administrar a un paciente un antagonista de alfa4beta7 en una cantidad y durante un tiempo suficiente para inducir una mejora sostenida sobre la línea de base de un indicador que refleja la gravedad del trastorno particular.

Como se entiende en el campo pertinente, las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de la invención se administran a un sujeto de una manera apropiada para la indicación. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por cualquier técnica adecuada, incluyendo pero no limitado a vía parenteral, por vía tópica o por inhalación. Si se inyecta, la composición farmacéutica puede administrarse, por ejemplo, por vía intraarticular, intravenosa, intramuscular, intralesional, intraperitoneal o subcutánea, mediante inyección en bolo o infusión continua. La administración localizada, por ejemplo en un sitio de enfermedad o lesión se contempla, como lo son la administración transdérmica y la liberación sostenida de los implantes. La administración por inhalación incluye, por ejemplo, inhalación nasal u oral, uso de un nebulizador, inhalación del antagonista en forma de aerosol, y similares. Otras alternativas incluyen gotas para los ojos; preparaciones orales incluyendo píldoras, jarabes, pastillas o chicles; y preparaciones tópicas tales como lociones, geles, pulverizadores y pomadas.

El uso de proteínas de unión a antígeno en procedimientos *ex vivo* también se contempla. Por ejemplo, la sangre de un paciente u otro fluido corporal puede ponerse en contacto con una proteína de unión a antígeno que se une a alfa4beta7 *ex vivo*. La proteína de unión a antígeno puede unirse a una matriz insoluble adecuada o material de soporte sólido.

Ventajosamente, las proteínas de unión a antígeno se administran en forma de una composición que comprende uno o más componentes adicionales, tales como un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la composición comprende adicionalmente uno o más agentes fisiológicamente activos, por ejemplo,

una segunda sustancia inhibidora de la inflamación o inmune, una sustancia antiangiogénica, una sustancia analgésica, etc., ejemplos no exclusivos de los cuales se proporcionan en el presente documento. En diversas realizaciones particulares, la composición comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis agentes fisiológicamente activos además de una proteína de unión a antígeno de unión a alfa4beta7.

5 En una realización, la composición farmacéutica comprende una proteína de unión a antígeno de la invención junto con una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en un tampón, un antioxidante tales como el ácido ascórbico, un polipéptido de bajo peso molecular (tales como aquellos que tienen menos de 10 aminoácidos), una proteína, un aminoácido, un carbohidrato tales como la glucosa, sacarosa o dextrinas, un agente quelante tales como el EDTA, glutatión, un estabilizante y un excipiente. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con seroalbúmina específica son ejemplos de diluyentes apropiados. De acuerdo con las normativas apropiadas de la industria, también pueden añadirse conservantes tales como alcohol bencílico. La composición puede formularse como un liofilizado usando soluciones de excipientes apropiadas (*por ejemplo*, sacarosa) como diluyentes. Los componentes adecuados no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas. Otros ejemplos de componentes que pueden emplearse en formulaciones farmacéuticas se presentan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Ed. (1980) y 20ª Ed. (2000), Mack Publishing Company, Easton, PA.

20 Los kits para uso de los médicos practicantes incluyen una sustancia inhibidora de alfa4beta7 de la invención y una etiqueta u otras instrucciones para su uso en el tratamiento de cualquiera de las afecciones discutidas en el presente documento. En una realización, el kit incluye una preparación estéril de una o más proteínas de unión a antígeno de unión a alfa4beta7, que puede estar en forma de una composición como se describe anteriormente y puede estar en uno o más viales.

25 Las dosificaciones y la frecuencia de administración pueden variar de acuerdo con factores tales como la vía de administración, las proteínas de unión a antígeno particulares empleadas, la naturaleza y la gravedad de la enfermedad a tratar, si la afección es aguda o crónica y el tamaño y la condición general del sujeto. Las dosis apropiadas pueden determinarse por procedimientos conocidos en la técnica pertinente, por ejemplo en ensayos clínicos que pueden implicar estudios de aumento de dosis.

30 Puede administrarse una sustancia inhibidora de alfa4beta7 de la invención, por ejemplo, una vez o más de una vez, por ejemplo, a intervalos regulares durante un período de tiempo. En realizaciones particulares, una proteína de unión a antígeno se administra durante un período de al menos un mes o más, por ejemplo, durante uno, dos, o tres meses o incluso indefinidamente. Para el tratamiento de enfermedades crónicas, el tratamiento a largo plazo es generalmente el más eficaz. Sin embargo, para el tratamiento de afecciones agudas, la administración durante períodos más cortos, por ejemplo de una a seis semanas, puede ser suficiente. En general, la proteína de unión al antígeno se administra hasta que el paciente manifiesta un grado de mejora médicamente relevante sobre la línea de base para el indicador o indicadores elegidos.

40 Las realizaciones particulares de la presente invención implican administrar un anticuerpo monoclonal de la invención a una dosis de aproximadamente 1 ng de proteína de unión a antígeno por kg de peso del sujeto por día ("1 ng/kg/día") a aproximadamente 10 mg/kg/día, más preferentemente de aproximadamente 500 ng/kg/día a aproximadamente 5 mg/kg/día y lo más preferentemente de aproximadamente 5 µg/kg/día a aproximadamente 2 mg/kg/día, a un sujeto. En realizaciones adicionales, una proteína de unión a antígeno se administra a adultos una vez por semana, dos veces por semana o tres o más veces por semana, para tratar una enfermedad mediada por alfa4beta7, afección o trastorno, por ejemplo, un trastorno médico desvelado en el presente documento. Si se inyecta, la cantidad eficaz de proteína de unión a antígeno por dosis para adultos puede variar de 1-20 mg/m² y preferentemente es de aproximadamente 5-12 mg/m². Como alternativa, puede administrarse una dosis plana; la cantidad puede variar de 5-100 mg/dosis. Un intervalo para una dosis plana es de aproximadamente 20-30 mg por dosis. En una realización de la invención, una dosis plana de 25 mg/dosis se administra repetidamente mediante inyección. Si se usa una vía de administración distinta de la inyección, la dosis se ajusta adecuadamente de acuerdo con las prácticas médicas convencionales. Un ejemplo de un régimen terapéutico consiste en inyectar una dosis de aproximadamente 20-30 mg de proteína de unión a antígeno de una a tres veces por semana durante un período de al menos tres semanas, aunque el tratamiento durante períodos más largos puede ser necesario para inducir el grado deseado de mejoría. Para sujetos pediátricos (edad 4-17), un régimen adecuado ejemplar implica la inyección subcutánea de 0,4 mg/kg, hasta una dosis máxima de 25 mg de proteína de unión a antígeno administrada dos o tres veces por semana.

60 Las realizaciones particulares de los métodos proporcionados en el presente documento implican la inyección subcutánea de 0,5 mg a 10 mg, preferentemente de 3 a 5 mg, de una proteína de unión a antígeno, una o dos veces por semana. Otra realización se dirige a la administración pulmonar (por ejemplo, por nebulizador) de 3 o más mg de proteína de unión a antígeno una vez a la semana.

65 Los ejemplos de regímenes terapéuticos proporcionados en el presente documento comprenden la inyección subcutánea de una proteína de unión a antígeno una vez a la semana, a una dosis de 1,5 a 3 mg, para tratar una afección en donde alfa4beta7 desempeña un papel. Algunos ejemplos de tales afecciones se proporcionan en el presente documento e incluyen, por ejemplo, las afecciones reumáticas como se describió anteriormente, y otras

afecciones en donde el tráfico excesivo o inadecuado de las células que expresan alfa4beta7 juega un papel (descrito en el presente documento; por ejemplo, enfermedad inflamatoria del intestino, pancreatitis, etc.). La administración semanal de la proteína de unión al antígeno continúa hasta que se logra el resultado deseado, por ejemplo, los síntomas del sujeto disminuyen. El tratamiento puede reanudarse según sea necesario, o, como alternativa, pueden administrarse dosis de mantenimiento.

Otros ejemplos de regímenes terapéuticos proporcionados en el presente documento comprenden la administración subcutánea o intravenosa de una dosis de 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 o 20 miligramos de un inhibidor de alfa4beta7 de la presente invención por kilogramo de masa corporal del sujeto (mg/kg). La dosis puede administrarse una vez al sujeto, o más de una vez en un cierto intervalo, por ejemplo, una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, tres veces al mes, dos veces al mes, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada seis meses o una vez al año. La duración del tratamiento y cualquier cambio en la dosis y/o frecuencia del tratamiento, puede alterarse o variarse durante el curso del tratamiento para satisfacer las necesidades particulares del sujeto.

En otra realización, se administra al sujeto en una cantidad y durante un tiempo suficiente para inducir una mejora, preferentemente una mejora sostenida, en al menos un indicador que refleja la gravedad del trastorno que se está tratando. Diversos indicadores que reflejan la extensión de la enfermedad del sujeto, la enfermedad o la afección pueden evaluarse para determinar si la cantidad y el tiempo del tratamiento son suficientes. Tales indicadores incluyen, por ejemplo, indicadores clínicamente reconocidos de gravedad de la enfermedad, síntomas o manifestaciones del trastorno en cuestión. En una realización, se considera que una mejora se mantiene si el sujeto muestra la mejora en al menos dos ocasiones separadas por dos a cuatro semanas. El grado de mejora generalmente se determina por un médico, quién puede hacer esta determinación basándose en signos, síntomas, biopsias u otros resultados de pruebas, y que también pueden emplear cuestionarios que se administran al sujeto, tales como cuestionarios de calidad de vida desarrollados para una enfermedad dada.

La alteración de la expresión de alfa4beta7 y/o la activación de alfa4beta7 y o su compañero de unión MAdCAM-1, se asocian a una serie de trastornos, que incluyen, por ejemplo, afecciones inflamatorias del sistema gastrointestinal. Los sujetos con un trastorno dado pueden examinarse, para identificar a aquellos individuos que tienen alterada la expresión y/o la activación de alfa4beta7 o MAdCAM-1, identificando de esta manera a los sujetos que pueden beneficiarse más del tratamiento con una proteína de unión a antígeno de unión alfa4beta7. Por lo tanto, los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento comprenden opcionalmente una primera etapa para medir los niveles de activación o expresión de alfa4beta7 o MAdCAM-1 de un sujeto. Un anticuerpo monoclonal de la invención puede administrarse a un sujeto en el cual la expresión y/o la activación de alfa4beta7 y/o MAdCAM-1 se eleva por encima de lo normal.

Los niveles de actividad de alfa4beta7 o MAdCAM-1 en un sujeto pueden monitorizarse antes, durante y/o después del tratamiento con un anticuerpo monoclonal de la invención para detectar cambios, si los hay, en la actividad de alfa4beta7 o de MAdCAM-1. Para algunos trastornos, la incidencia de actividad alfa4beta7 y/o MAdCAM-1 elevada puede variar de acuerdo con factores tales como la fase de la enfermedad o la forma particular de la enfermedad. Pueden emplearse técnicas conocidas para medir dicha actividad, por ejemplo, en muestras de sangre o tejido de un sujeto. La actividad de alfa4beta7 o MAdCAM1 puede medirse usando cualquier técnica adecuada.

Las realizaciones particulares de los métodos y composiciones de la invención implican el uso de un anticuerpo monoclonal de la invención y uno o más antagonistas de alfa4beta7 adicionales, por ejemplo, dos o más proteínas de unión a antígeno de la invención, o una proteína de unión a antígeno de la invención y uno o más antagonistas de alfa4beta7. En realizaciones adicionales, un anticuerpo monoclonal de la invención se administra solo o en combinación con otros agentes útiles para tratar la afección con la que se ve afectado el paciente. Los ejemplos de tales agentes incluyen fármacos tanto proteicos como no proteicos. Cuando se co-administran múltiples productos terapéuticos, las dosis se pueden ajustar en consecuencia. Como se reconoce en la técnica pertinente. La "co-administración" y la terapia combinada no se limitan a la administración simultánea, sino que también incluyen regímenes de tratamiento en donde se administra una proteína de unión a antígeno al menos una vez durante un curso de tratamiento que implica administrar al paciente al menos otro agente terapéutico.

Los ejemplos de otros agentes que pueden administrarse junto con una proteína de unión a antígeno son otras proteínas de unión a antígeno o polipéptidos terapéuticos que se eligen de acuerdo con la afección particular a tratar. Como alternativa, los fármacos no proteicos que son útiles para tratar una de las afecciones particulares discutidas anteriormente pueden administrarse conjuntamente con un antagonista de alfa4beta7.

60 Terapia de combinación

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto con un anticuerpo monoclonal de la invención y uno o más tratamientos distintos. En una realización, tal terapia de combinación logra una sinergia o un efecto aditivo, por ejemplo, atacando múltiples sitios o dianas moleculares en un tumor. Los tipos de terapias de combinación que pueden usarse en relación con la presente invención incluyen inhibir o activar (según sea apropiado) múltiples nodos en una única ruta relacionada con la enfermedad, múltiples rutas en una

célula diana y múltiples tipos de células dentro de un tejido diana.

En otra realización, un método de terapia de combinación comprende administrar al sujeto dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de los agonistas o antagonistas de alfa4beta7 descritos en el presente documento. En otra realización, el método comprende administrar al sujeto dos o más tratamientos que juntos inhiben o activan (directa o indirectamente) la transducción de señales mediada por alfa4beta7. Algunos ejemplos de tales métodos incluyen el uso de combinaciones de dos o más proteínas de unión a antígeno que inhiben a alfa4beta7, de una proteína de unión al antígeno alfa4beta7 y uno o más de los otros restos terapéuticos que tienen propiedades antiinflamatorias (por ejemplo, agentes antiinflamatorios no esteroideos, esteroides y/o inmunomoduladores) o de una proteína de unión a antígeno inhibidora de alfa4beta7 y uno o más tratamientos (por ejemplo, cirugía, ultrasonidos o tratamiento eficaz para reducir la inflamación). Los agentes útiles que pueden combinarse con los inhibidores de alfa4beta7 incluyen aquellos utilizados para tratar, por ejemplo, la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, tales como el aminosalicilato (por ejemplo, mesalamina), corticosteroides (incluyendo predisona), antibióticos tales como metronidazol o ciprofloxacina (u otros antibióticos útiles para tratar, por ejemplo, pacientes afligidos por fístulas) e inmunosupresores tales como azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato, tacrolimo y ciclosporina. También se contemplan combinaciones de tales agentes para su uso con los inhibidores de alfa4beta7 de la invención. Tales agente o agentes pueden administrarse por vía oral o por otra vía, por ejemplo a través de supositorio o enema.

Además, pueden usarse uno o más anticuerpos anti-alfa4beta7 o derivados de anticuerpos en combinación con una o más moléculas u otros tratamientos, en donde la otra molécula o moléculas y/o tratamiento o tratamientos no se unen directamente o afectan a alfa4beta7, pero cuya combinación es eficaz para tratar o prevenir la afección que se está tratando. Por ejemplo, puede usarse un inhibidor de alfa4beta7 en combinación con la terapia con probióticos u otra terapia para restaurar o mantener la flora intestinal normal. En una realización, una o más de la molécula o moléculas y/o tratamiento o tratamientos trata o previene una afección que está causada por una o más de la otra molécula o moléculas o tratamiento o tratamientos en el transcurso de la terapia, *por ejemplo*, náuseas, fatiga, alopecia, caquexia, insomnio, *etc.* En todos los casos en donde se use una combinación de moléculas y/u otros tratamientos, la molécula o moléculas y/o tratamiento o tratamientos individuales pueden administrarse en cualquier orden, durante cualquier período de tiempo, que sea eficaz, por ejemplo, simultánea, consecutiva o alternativamente. En una realización, el método de tratamiento comprende completar un primer transcurso de tratamiento con una molécula u otro tratamiento antes de comenzar un segundo transcurso de tratamiento. La longitud de tiempo entre el final del primer transcurso de tratamiento y el comienzo del segundo transcurso de tratamiento puede ser cualquier longitud de tiempo que permita que el transcurso total de la terapia sea eficaz, por ejemplo, segundos, minutos, horas, días, semanas, meses o incluso años.

En otra realización, el método comprende administrar uno o más de los antagonistas alfa4beta7 descritos en el presente documento y uno o más tratamientos (por ejemplo, un tratamiento terapéutico o paliativo). Cuando un método comprende administrar más de un tratamiento a un sujeto, debe entenderse que el orden, el tiempo, el número, la concentración y el volumen de las administraciones están limitados únicamente por los requisitos médicos y las limitaciones del tratamiento, es decir, pueden administrarse dos tratamientos al sujeto, por ejemplo, simultánea, consecutiva, alternativamente, o de acuerdo con cualquier otro régimen.

Los siguientes ejemplos, tanto reales como proféticos, se proporcionan con el propósito de ilustrar realizaciones o características específicas de la presente invención y no limitan su alcance.

45 **Ejemplo 1: preparación de anticuerpos**

Los anticuerpos monoclonales contra alfa4beta7 humano se desarrollaron inmunizando Xenomouse™ XG2kappalambda (kl) y ratones XG4kl (ratones transgénicos que expresan IgG2 o IgG4 humanas, y cadenas ligeras kappa y lambda humanas, respectivamente; Abgenix Inc., Fremont CA) con células que expresan alfa4beta7 humana, células 293 de riñón embrionario humano (HEK) transfectadas transitoriamente (293-a4b7) o células de ovario de hámster chino (CHO) establemente transfectadas (CHO-a4b7). El título del suero se controló mediante un análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) que comparaba las células transfectadas con alfa4beta7 con las respectivas células de control parental. Los animales hiperinmunes de cualquiera de las campañas de inmunización se sacrificaron y los tejidos del bazo y los nodos linfáticos se sometieron a fusión de hibridoma.

Los anticuerpos específicos para el heterodímero alfa4beta7 se identificaron mediante una serie de ensayos. Los sobrenadantes de hibridoma se examinaron por primera vez mediante la tecnología de ensayo de microvolúmenes fluorométricos (FMAT™ Applera Corporation, Foster City CA; un sistema de detección celular de detección de alto rendimiento) para unirse a las células transfectadas con alfa4beta7 en comparación con las células transfectadas de forma simulada. Los sobrenadantes identificados como positivos para la unión a alfa4beta7 (1001 sobrenadantes de unión positiva de la campaña de inmunización de células CHO-a4b7 y 1143 sobrenadantes de unión positiva de la campaña de inmunización de células 293-a4b7) se evaluaron para la capacidad de inhibir la adhesión de células HUT78 a MAdCAM-1 Fc de manera similar a la descrita (Erle, J. Immunol, (1994) 153:517). En este ensayo, 60 sobrenadantes de la campaña CHO-a4b7 y 174 sobrenadantes de la campaña 293-a4b7 mostraron más del 90 % de inhibición (n = 2) y se sometieron a una mayor especificidad y análisis de potencia.

Las células 293 transfectadas con alfa4beta7, transfectadas con alfa4beta1 y transfectadas con alfaEbeta7 se prepararon y se usaron en el análisis FACS con los sobrenadantes de hibridoma que se identificaron en el ensayo de inhibición. Los sobrenadantes que demostraron unión a las células transfectadas con alfa4beta7 se clasificaron como heterodímeros específicos, ya que los anticuerpos contra la subunidad alfa4 de esta integrina también se unirían a las células transfectadas con alfa4beta1, y los anticuerpos que se unen a la cadena beta7 se unirían a las células transfectadas con alfaEbeta7. Los sobrenadantes de hibridoma también se analizaron para determinar la actividad de unión a células 293 transfectadas con alfa4beta7 de macaco cangrejero mediante análisis FACS. Se seleccionaron siete líneas de la campaña CHO-a4b7 y 25 líneas de la campaña 293-a4b7 para la subclonación y el análisis adicional.

Ejemplo 2: análisis de anticuerpos

Las células secretoras de anticuerpos obtenidas se clonaron y los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos se aislaron y se secuenciaron. Se usó mutagénesis dirigida al sitio para preparar variantes que diferían de las secuencias aisladas en uno o más restos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos y variantes se muestra en las Tablas 1 y 2 a continuación. Se reconoce que los límites de las regiones CDR y FR pueden variar de los que se muestran a continuación, como se discutió anteriormente en este documento.

Tabla 1: Análisis de secuencias de cadenas ligeras

Cadena ligera	FR1	CDR1	FR2
1A10K	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC	RASQGVSSWLA	WYQQKPGMAPKLLIY
11E7K1	EIVMTQSPATLSVSPGETATLSC	RASQTVSSNLA	WYQQKPGQAPRLLIY
11E7K2	DIQMTQSPSSLSASIGDRTITC	RASQGIRNYLA	WYQRKPGKVPKLLIY
2F12K	DIQMTQSPSSVFASVGDRTITC	RASQGISSWLA	WYQQKPGKAPNLLIY
14E4L	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY
3A5K	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC	RASQGVISWLA	WYQQKPGMAPKLLIY
10D7K	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC	RASQGVNNWLA	WYQQKPGKAPKLLIF
27D8K	EIVMMQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSTNLA	WYQQKPGQAPRLLIY
18A11K	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC	RASQGISSWLA	WYQQKPGKAPKLLIY
20D7K	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RASQSVSSSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY
23H6K	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVNSNLA	WYQQKPGQAPRLLIY
27G8L	QSVLTQPPSVSEAPRQRVTISC	SGSNSNIGNNPVN	WYQLFPGRAPKLLIY
26C7K	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSDNLA	WYQQKPGQAPRLLIY
26H3K	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	QASQDISNYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
19G6K	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	QASQDINTYLN	WYQQKPGKVPKLLIY
22B2K	DVQMTQSPSSLSASVGDRTITC	QASQDITDYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
24A2K	EVMMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSSNLA	WYQQKPGQAPRLLIF
26E9K	ELVMTQSPATLSVSPGERATVSC	RASQSVSDLA	WYQQKPGQAPRLLIY
22F5K	EIVMTQSPATLSVFPGEATLSC	RASQSVSDLA	WYQQKPGQAPRLLIY
26C10K	EIVLTQSPGTLSLSPGEATLSC	RASQTVTSSYLA	WYQQSPSQSPRLLIY
17C8K	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSSNLV	WYQQKPGQAPRLLIY
25C9k	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC	RASQDISSWLA	WYQRKPGKAPKLLIY
19E6L	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC	SGDKLGDKYAC	WYQQKPGQSPVLVIY
26G2k	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC	RASQDISSWLA	WYQQKPGTAPKLLIY
27G8L (a)	QSVLTQPPSVSGAPRQRVTISC	SGSNSNIGNNPVN	WYQLFPGRAPKLLIY
27G8L (b)	QSVLTQPRSVSGAPRQRVTISC	SGSNSNIGNNPVN	WYQLFPGRAPKLLIY
26H3K (c)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	QASQDISNYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
1A10K (d)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC	RASQGVSSWLA	WYQQKPGKAPKLLIY

Tabla 1 (cont.)

Cadena ligera	CDR2	FR3
1A10K	AASILQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
11E7K1	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
11E7K2	AASTLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC
2F12K	GASSLQN	GVPLRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
14E4L	DNNKRPS	GIPDRFSGSKSQTSAILDITGLQTGDEADYYC
3A5K	AASILQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC

ES 2 751 946 T3

Cadena ligera	CDR2	FR3
10D7K	ATSSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYC
27D8K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYFC
18A11K	GASNLES	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFANYYC
20D7K	GASSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFVYYC
23H6K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
27G8L	HDDLPS	GVSDRFSGSRSGTSASLAISGLQSEDETDYYC
26C7K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
26H3K	DASNLET	GVPSRFSGSGSGTDFFTINSLQPEDIATYFC
19G6K	DASNLET	GVPSRFSGSGSGTDFFTISGLQPEDIATYYC
22B2K	DTSNLEA	GVPSRFSGSGSGTDFFTISLQPEDIATYYC
24A2K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYCC
26E9K	GASSRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
22F5K	GASARAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
26C10K	GASTRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFVYYC
17C8K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTDFTLTISLQSEDFAVYYC
25C9k	SASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
19E6L	QDSKRPS	GIPERFSGSNGNTATLTISGTQAMDEADYYC
26G2k	SASSLQN	GVPSRFSGRSGSGTDFALTISLQPEDFATYYC
27G8L (a)	HDDLPS	GVSDRFSGSRSGTSASLAISGLQSADETDYYC
27G8L (b)	HDDLPS	GVSDRFSGSRSGTSASLAISGLRSADETDYYC
26H3K (c)	DASNLET	GVPSRFSGSGSGTDFFTINSLQPEDIATYFC
1A10K (d)	AASILQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC

Tabla 1 (cont.)

Cadena ligera	CDR3	FR4
1A10K	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK
11E7K1	QQYDYWPPLT	FGGGTRVEIK
11E7K2	QKYDSAPFT	FGPGTKVDIK
2F12K	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK
14E4L	GTWDDSSLSAGRV	FGGGTKLTVL
3A5K	QQANSFPWT	FGQGTNVEIK
10D7K	QQVNSFPGT	FGQGTKVEIK
27D8K	QQYNDWPT	FGGGTKVEIK
18A11K	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK
20D7K	QQYDSSPPT	FGGGTKVAIK
23H6K	QQYDDWPPVT	FGQGTRLEIK
27G8L	TAWDDSLNGWV	FGGGTKLTVL
26C7K	QQYDDWPT	FGGGTRVEIK
26H3K	QQYDNLPCS	FGQGTKLEIK
19G6K	QQFDNLPIT	FGQGTRLEIK
22B2K	QQYDILPYS	FGQGDLEIK
24A2K	QQYDDWPT	FGGGTKVEIK
26E9K	QQYNNWPPLT	FGGGTKVEIK
22F5K	QQYHDWPPLS	FGGGTKVEIK
26C10K	QQYDSSPPT	FGGGTKVEIK
17C8K	QQYDDWPPLT	FGGGTVEIK
25C9k	QQADSFPT	FGQGTKVEIK
19E6L	QAWDSSTVV	FGGGTKLTVL
26G2k	QQADSFPT	FGRGTKVEIK
27G8L (a)	TAWDDSLNGWV	FGGGTKLTVL
27G8L (b)	TAWDDSLNGWV	FGGGTKLTVL
26H3K (c)	QQYDNLPS	FGQGTKLEIK
1A10K (d)	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK

Tabla 2: Análisis de secuencia de cadenas pesadas

Cadena pesada	FR1	CDR1	FR2
1A10H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTLN	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
11E7H1	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
11E7H2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
2F12H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTVT	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
14E4H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
3A5H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTLN	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
10D7H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
27D8H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DNYMS	WIRQAPGKGLEWVS
18A11H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTLS	DLSIH	WVRQAPGKGLEWMG
20D7H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCTASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
23H6H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26G2H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
27G8H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYWMS	WVRQASGKGLEWVA
26C7H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26H3H	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	GYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
19G6H	QVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWIS
22B2H	EVQLVQSGAEVKEPGESLKISCKGSGYIFT	SYWIA	WVRQLPGKGLEWMG
24A2H	QVQLVESGGDLVEPGGSLRLSCAASGFTFR	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26E9H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFR	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
19E6H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS
22F5H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
25C9H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFN	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26C10H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTFS	DYYMS	WIRQTPGKGLEWVS
17C8H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWLS
1A10H(a)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTLN	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
27G8H(b)	EVQLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFS	SYWMS	WVRQASGKGLEWVA

Tabla 2 (cont.)

Cadena pesada	CDR2	FR3
1A10H	GFDPAEGKIISAQKFQD	RVTMTDDTSTD TAYMELSSLRSEDSAVYYCAT
11E7H1	YISSSGSAIYYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQNLRAEDTAVYYCAR
11E7H2	VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNKNTLHLQMNSLRAEDTAVYYCAR
2F12H	GFDPDGETIYAQKFQG	RVTMTEDTSTD TAYMELRSLRSEDTAVYYCTT
14E4H	YISNSGSVVYYADSVKG	RFTISRHNKNSLYLQMNLRADDTAVYYCAR
3A5H	GFDPAEGKIISAQKFQD	RVTMTDDTSTD TAYMELSSLRSEDSAVYYCAT
10D7H	YISSTGSAMYDADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR
27D8H	YISSSGSATYYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQMSLRAEDTAVYYCAR
18A11H	GFDPDGETIYAQKFQG	RVTMTEDTSTD TAYMELSSLKSEDTAVYYCAT
20D7H	YISSSGSAIYYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQMDSLRAEDTAVFYCAR
23H6H	YISSSGSAMYSADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR
26G2H	YISSIGSAIHYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR
27G8H	NIKQDGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR
26C7H	YISRVGSTYYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR
26H3H	I IYPYDSDTRYSPSFQG	QVTISADKSI NTAYLQWSSLKASDTAMFYCAS
19G6H	YISSSGSTMYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR
22B2H	I IDPNDS DTRYSPSFQG	QVTISADKSI HTAYLQWSSLKASDTAMYYCAT
24A2H	YISSSGSAIYYADSVKG	RFTISRDNPKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR
26E9H	YISSSGSTSYCADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR
19E6H	AISGSGSTYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAK
22F5H	YISSTGSTLYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQMDSLRADDAVYYCTR
25C9H	YISSSGSAIHYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR
26C10H	YISSSGSAIHYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQMDSLRAEDTAVFYCAR
17C8H	YISNSGSAMYADSVKG	RFTISRDNARNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR
1A10H (a)	GFDPAEGKIISAQKFQD	RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAR

Cadena pesada	CDR2	FR3
27G8H (b)	NIKQDGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNLSLRAGDTAVYYCAR

Tabla 2 (cont.)

Pesada	CDR3	FR4
1A10H	LDSSWFDP	WGQGTTLVTVSS
11E7H1	DYSSGWYFDY	WGRGTLVTVSS
11E7H2	EHWNYAFDI	WGQGTMTVTVSS
2F12H	ESSSAWFDP	WGQGTTLVTVSS
14E4H	DRSSAWDEAFDI	WGQGTMTVTVSS
3A5H	LDSSWFDP	WGQGTTLVTVSS
10D7H	EFSSGWSYFDY	WGQGTTLVTVSS
27D8H	DYSSGWYFDY	WGQGTTLVTVSS
18A11H	GSSSSWFDP	WGQGTTLVTVSS
20D7H	EHSSGYWYFDL	WGRGALVTVSS
23H6H	EYSSGWYFDY	WGRGTLVTVSS
26G2H	EYSSGWAYFDY	WGQGTTLVTVSS
27G8H	EGGYDWNADYYGMDV	WGQGTTVTVSS
26C7H	DYSSGWYFDY	WGQGTTLVTVSS
26H3H	HRLWLGEFPGPLNI	WGQGTMTVTVSS
19G6H	DRSSGLVSFDY	WGQGTTLVTVSS
22B2H	HRLWLGTLPGGFYI	WGQGTMTVTVSS
24A2H	DFSSGYFFDY	WGHGTLVTVSS
26E9H	DYSSGWYFDY	WGQGTTLVTVSS
19E6H	APYSSSWALGLGMDV	WGQGTTVTVSS
22F5H	EYSSGWFFFDY	WGQGTTLVTVSS
25C9H	EYSSGWAYFDY	WGQGTTLVTVSS
26C10H	DHSSGYWYFDL	WGRGTLVTVSS
17C8H	EYSSGWFFFES	WGQGTTLVTVSS
1A10H (a)	LDSSWFDP	WGQGTTLVTVSS
27G8H (b)	EGGYDWNADYYGMDV	WGQGTTVTVSS

5 Las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos se analizaron adicionalmente para similitudes. Las cadenas ligeras kappa se agruparon en tres grupos y se desarrolló una secuencia de consenso para cada grupo. Hubo tres anticuerpos con cadenas ligeras lambda, ninguno de los cuales tenía suficiente similitud entre sí para formar un grupo de secuencias relacionadas a partir de las cuales se podría desarrollar una secuencia consenso. Dos de las variantes desarrolladas variaron en la cadena ligera lambda. Las cadenas pesadas se agruparon en cuatro grupos con una única cadena pesada categorizada en un quinto grupo y se desarrolló una secuencia de consenso para los grupos 1 a 4. Estos resultados se muestran en la Tabla 3(a) y 3(b) a continuación; las secuencias consenso se muestran en el Listado de Secuencias. Los números entre paréntesis indican la SEQ ID NO en el Listado de Secuencias.

Tabla 3(a): Agrupación de anticuerpos por cadena ligera kappa, con la correspondiente cadena pesada

Grupo Kappa 1 (10 miembros)	Grupo de cadena pesada (H1 - H5)	Grupo Kappa 2 (9 miembros)	Grupo de cadena pesada (H1 - H5)	Grupo Kappa 3 (4 miembros)	Grupo de cadena pesada (H1 - H5)
20D7K (10)	H1 (38)	11E7K2 (3)	H1 (31)	22B2K (16)	H4 (45)
11E7K1 (2)	H1 (30)	10D7K (7)	H1 (35)	19G6K (15)	H1 (44)
26C10K (20)	H1 (51)	3A5K (6)	H2 (34)	26H3K (14)	H4 (43)
23H6K (11)	H1 (39)	1A10K (1)	H2 (29)	26H3K(c) (27)	H4 (43)
26C7K (13)	H1 (42)	25C9K (22)	H1 (50)		
24A2K (17)	H1 (46)	26G2K (24)	H1 (40)		
27D8K (8)	H1 (36)	18A11K (9)	H2 (37)		
22F5 (19)	H1 (49)	2F12K (4)	H2 (32)		
26E9K (18)	H1 (47)	1A10K(d) (28)	H2 (53)		
17C8K (21)	H1 (52)				

15

Tabla 3(b): Agrupación de anticuerpos por la cadena ligera lambda, con la correspondiente cadena pesada

Cadenas lambda (3 anticuerpos, no hay consenso)	Grupo de cadena pesada (H1 - H5)
14E4 (5)	H1 (33)
27G8 (12)	H3 (41)
27G8(a) (25)	H3 (54)
27G8(b) (26)	H3 (54)
19E6 (23)	H5 (48)

Los límites de las CDR dentro de las secuencias consenso (que pueden variar, como se discutió anteriormente) fueron los siguientes: Grupo 1 Kappa CDR1 24-35, CDR2 51-57, CDR3 90-99; Grupo 2 Kappa CDR1 24-34, CDR2 51-56, CDR3 89-97; Grupo 3 Kappa CDR1 24-34, CDR2 50-56, CDR3 89-97; Cadena pesada del grupo 1 CDR1 31-35, CDR2 50-66, CDR3 99-110; Cadena pesada del grupo 2 CDR1 31-35, CDR2 50-66, CDR3 99-107; Cadena pesada del grupo 3 CDR1 31-35, CDR2 50-66, CDR3 99-114; y cadena pesada grupo 4 CDR1 31-35, CDR2 50-66, CDR3 99-114.

Ejemplo 3: ensayos funcionales

Este ejemplo describe varios ensayos que se utilizaron para caracterizar los anticuerpos.

Ensayo de adherencia HUT78.

Se prepararon placas recubiertas (por ejemplo, placas de 96 pocillos Costar® 3368; Coming Incorporated Life Sciences, Lowell MA) mediante el recubrimiento de placas de 96 pocillos durante la noche a 4 °C con 20 microg/ml de MAdCAM-1 (o una concentración similar de IgG1 humana como control de recubrimiento) diluida en tampón fosfato pH 9,0. Se retira el recubrimiento y se bloquean las placas con 100 microl de 3 % BSA /PBS, se incubó durante 1 h o más a temperatura ambiente. Las placas se lavan tres veces con solución salina equilibrada de Hank (HBSS).

Las células HUT78 (una línea celular de linfoma de células T humanas que muestra las características de una línea de células T maduras con fenotipo inductor/auxiliar; ATCC TIB 161), crecieron hasta la confluencia, se granulan y se lavan 3X en HBSS, después se resuspenden en HBSS a la concentración apropiada para producir ~30.000 células en 50 microl.

Los anticuerpos a probar se diluyen hasta el doble de la concentración final y después se titulan 1:4 en HBSS libre de calcio, libre de magnesio que contiene BSA al 1 % con Mn²⁺ 1 mM. Se añaden cincuenta microl de titulación o control de anticuerpos a cada pocillo de una placa de fondo VEE, seguido de 50 microl de células HUT78. Las células y los anticuerpos se incuban a 4 °C durante 30 minutos, después se añade a las placas recubiertas y se incuban a 37 °C durante 40 minutos. Las células en las placas recubiertas se lavan tres veces en HBSS a temperatura ambiente, dando un golpecito al HBSS entre lavados. Las células adherentes se congelan y se descongelan a -20 °C, seguido de la adición de 100 microl de tampón de tinte/lisis CyQuant® (un tampón usado en un análisis de cuantificación de células basado en fluorescencia útil en la detección de alto rendimiento Molecular Probes®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA. La señal fluorescente de cada pocillo se cuantifica a 485 nm de excitación y 530 nm de emisión, por ejemplo usando un Tecan GENiosPro, un lector de microplacas multi-marcador (Tecan Group Ltd. Männedorf, Suiza).

Ensayo de adhesión de células CD4+ humanas

Las placas se recubren con MAdCAM-1-Fc humana o IgG humana (3 microg/ml en tampón fosfato 20 mM, pH 9,0, NaCl 130 mM), 100 microl/pocillo, a 4 °C durante la noche, después se bloqueó con 200 microl/reactivo de bloqueo de pocillo (3 % de seroalbúmina bovina en PBS) a temperatura ambiente durante al menos dos horas. Las placas se lavan tres veces con tampón de adhesión (HEPES 30 mM, pH 7,4, NaCl 120 mM), MnCl₂ 1 mM, 10 g/ml de IgG humana).

Se preparan diluciones en serie de los anticuerpos que se analizarán y se añaden a la placa (35 microl/pocillo); se agregan células T CD4⁺ (250.000 células/35microl/pocillo) y las placas se incuban a 4 °C durante 2 horas. Después de lavar tres veces con tampón de adhesión, Las placas se congelan a -20 °C durante la noche. Se añade reactivo de detección (100 microl. pocillo de reactivo CyQUANT®; Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) y las placas se incuban a 37 °C durante 45 minutos. Los resultados se determinan leyendo la fluorescencia a 485 nm de excitación y 530 nm de emisión.

CE50 en la unión de células T de memoria CD4+CD45RA- humanas

Células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC; frescas o congeladas y descongeladas, por ejemplo, en solución salina tamponada con fosfato con FBS al 2 %) se lavan y se resuspenden en tampón HEPES (HEPES 30 mM + NaCl 140 nM) con BSA al 1 %, con o sin MnCl₂ 1 mM (dependiendo del experimento; es necesario Mn²⁺ para la unión de MAdCAM-1) y se coloca en placas de 96 pocillos (10⁶ células/pocillo). Las células se incuban con 10 microg/ml de IgG humana durante 30 minutos en hielo para bloquear la unión no específica. Las células se incuban después con diluciones en serie de anticuerpos anti-alfa4beta7 biotinilados en placas de 96 pocillos durante una hora en hielo, seguido de la adición de una dilución 1:100 de estreptavidina-ficoeritrina (PE; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA), 4 microl CD3-Pacific Blue, CD4-PerCP-Cy5.5 y CD45RA-isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Biosciences, San José CA) para un volumen final de 100 microl y se incubaron durante otra hora en hielo. Las células se lavaron dos veces con tampón HEPES (con o sin MnCl₂, correspondientemente) y luego se fijaron en 200microl de tampón HEPES más el 0,5 % de paraformaldehído (de nuevo, con o sin MnCl₂, correspondientemente). El porcentaje de células T de memoria CD4+CD45RA- de unión positiva al anticuerpo alfa4beta7 se determina utilizando un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS), por ejemplo, un citómetro de flujo de sobremesa BD™ LSR II (BD Biosciences, San Jose CA). La CE50 se define como la concentración de anticuerpo alfa4beta7 a la cual el 50 % de los sitios alfa4beta7 en las células de memoria CD4CD45RA- están unidos por el anticuerpo alfa4beta7.

CI50 en el bloqueo de la unión de MAdCAM-I-Fc a células T de memoria CD4+CD45RA- humanas.

Las PBMC (frescas o congeladas como se describió anteriormente) se lavan y se resuspenden en tampón HEPES (HEPES 30 mM + NaCl 140 nM) con BSA al 1 % y MnCl 1 mM a una concentración final de 10⁷ células/ml. Las células se bloquean como se describió anteriormente; después de bloquear, las células se incuban con una dilución en serie de anticuerpo anti-alfa4beta7 (o control apropiado) en placas de 96 pocillos durante 30 minutos en hielo y después con 0,3 microg/ml de proteína MAdCAM-I-Fc biotinilada durante otra hora.

Después de dos lavados en tampón HEPES con MnCl 1 mM, las células se tratan con dilución 1:100 de estreptavidina-PE, 4 microl CD3-Pacific Blue, CD4-PerCP-Cy5.5 y CD45RA-FITC como se describió anteriormente, en un volumen final de 100 microl. Después de una hora de incubación en hielo, las células se lavan dos veces con tampón HEPES con MnCl 1 mM y después se fijan en 200 microl de tampón más 0,5 % de paraformaldehído. El porcentaje de células T de memoria CD4+CD45RA de unión positiva a MAdCAM-1-Fc se determina mediante análisis de clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS), como se describe anteriormente. La CI50 se define como la concentración de anticuerpo alfa4beta7 a la que se inhibe en un 50 % la unión de MAdCAM-1-Fc a alfa4beta7 en células de memoria CD4CD45RA-.

35 Inducción de alfa4beta7 por ácido retinoico en células T activadas

Las PBMC humanas aisladas se activan mediante anti CD3 (unido a la placa, 5 microg/ml), IL-2 humana (20 ng/ml) en presencia o ausencia de ácido retinoico (1000 nM) durante 7 días. Las células activadas se lavan dos veces con tampón de tinción (PBS más BSA al 0,5 % y MnCl 1 mM) y se incuban con 100 microg/ml de Ig humana durante 30 minutos para bloquear la unión no específica. Las células se incuban primero en una dilución en serie de anticuerpos anti-alfa4beta7 durante 30 minutos en hielo, y luego se tiñen con 1 microg/ml de MAdCAM-1-Fc biotinilado durante otros 30 minutos. Después de lavar dos veces con tampón de tinción, las células se tiñen con estreptavidina-PE (1:1000) durante 30 minutos. Las células se analizan por clasificación de células activadas por fluorescencia, por ejemplo, con un FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose CA). Las células preparadas de esta manera pueden usarse para experimentos adicionales, como los ensayos de competición.

Ensayos de competición

Los anticuerpos alfa4beta7 también se examinaron por su capacidad para competir con otros anticuerpos anti-alfa4beta7 y/o beta7 en la unión a las células que expresan alfa4beta7 mediante tecnología de ensayo de microvolúmenes fluorométricos o FMAT, sustancialmente como se describe por Fiscella, et al., *Nature Biotechnology* 21:302-307; 2003. En resumen, se preparan células que expresan altos niveles de alfa4beta7, por ejemplo, mediante cotransfección transitoria de células con ácidos nucleicos que codifican alfa4 y ácidos nucleicos que expresan beta7. Las líneas celulares estables se preparan de manera similar, usando células y protocolos adecuados para la transfección estable. Las células transfectadas se exploran, por ejemplo, por FACS, utilizando anticuerpos para alfa4, anticuerpos contra beta7 y/o ligando (es decir, MAdCAM-1, por ejemplo, una proteína de fusión MAdCAM-1-Fc). Las células pueden someterse a varios ciclos de clasificación y selección para producir líneas celulares clonales con niveles elevados reproducibles de expresión de alfa4beta7.

60 Unión al mutante S250N

Los anticuerpos también se evaluaron para su capacidad de reconocer el mutante puntual S250N en la cadena beta7, que se sabe que es crítico para la unión de ACT-1 (J Immunol. 159:1497, 1997). 293 células que coexpresan transitoriamente alfa4beta7 que tiene la mutación S250N en la cadena beta (ref) se preparan de una manera similar a la descrita anteriormente para la preparación de células que expresan niveles altos de alfa4beta7.

Brevemente un total de 1×10^6 células transfectadas para el perfil se recogen utilizando una solución de disociación celular y se centrifugan a 1000 rpm durante 5 min. Las células se bloquean después con 0,5 ml de tampón de bloqueo (suero de cabra al 1 %/PBS) durante 30 minutos a 1 hora a 4 °C con agitación. Para la tinción MAdCAM-I-Fc, las células se incuban durante 1 hora a 4 °C con agitación en Tampón Mn^{2+} ($MnCl_2$ 1 mM en HEPES 30 mM + 1 % de suero de cabra). Después, las células se centrifugan a 1000 rpm/5 min y se añaden 0,5 ml de tampón de bloqueo nuevo junto con 10 microg/ml de anticuerpo primario, seguido de incubación durante 30 minutos a 1 hora a 4 °C con agitación. Después de dos lavados con 4 ml de PBS frío (cada lavado), se añade anticuerpo secundario (es decir, anticuerpo conjugado con ficoeritrina anti-IgG de cabra; Southern Biotech, diluido 1:250 o 0,1 microg/10⁶ células) en 0,5 ml de tampón de bloqueo y las células se incuban durante 20-30 minutos a 4 °C. Las células se lavan una vez final con 4 ml de PBS frío, después se resuspenden en 0,5 ml de tampón FACS para el perfil.

Unión a polimorfismos de nucleótido único (SNP)

Para el análisis SNP de la subunidad $\alpha 4$, los exones 1-28 del gen $\alpha 4$ de 90 individuos (180 genomas haploides) que representan diferentes grupos étnicos se amplificaron por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriormente se secuenciaron. Se identificaron tres SNP candidatos en la región de codificación del gen $\alpha 4$, y uno de los tres dio lugar a un cambio de aminoácido (Arg878Gln). Del mismo modo para el análisis SNP de la subunidad $\beta 7$, la región codificante de los exones 2-15 del gen $\beta 7$ de 90 individuos (180 genomas haploides) que representan diferentes grupos étnicos se amplificó por PCR y posteriormente se secuenció. Se identificaron tres SNP y dos de ellos dieron como resultado cambios de aminoácidos. Los datos del análisis SNP interno se compararon con la información en la base de datos NCBI (NCBI: National Center for Biotechnology Information a division of the National Library of Medicine (NLM) en el National Institutes of Health (NIH)). Solo la mutación A/G que resulta en Gln878Arg en la subunidad $\alpha 4$ se produce a alta frecuencia: un 20 % o un 30 % tanto en el SNP interno como en la base de datos pública, respectivamente. Los otros SNP se producen a baja frecuencia. Esta información se resume en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4: Frecuencia de SNP en beta7 y alfa4 humanos

	SNP	Frecuencia alélica alternativa - base de datos NCBI	Frecuencia alélica alternativa - análisis interno	Ubicación
beta7	E97V	NA	A(0,989)/T(0,019)	extracelular
	R213S	C(0,975)/A(0,25)	Sin observación	extracelular
	G611E	NA	Sin observación	extracelular
	G629S	NA	A(0,989)/T(0,019)	extracelular
	H672Y	NA	Sin observación	extracelular
alfa4	V824A	T(0,972)/C(0,028)	Sin observación	extracelular
	Q878R	A(0,648)/G(0,352)	A(0,783)/G(0,217)	extracelular
	R1007S	NA	Sin observación	intracelular

Se generaron construcciones de mutantes puntuales que representan SNP que alteran los aminoácidos (a4b7(E97V); a4b7(R213S); a4b7(G629S); a4(V824A)b7; a4(Q878R)b7) en los dominios extracelulares de alfa4 y beta7. Cada construcción mutante puntual se transfectó a 293 células junto con la construcción de expresión asociada de tipo silvestre. Las células 293 transfectadas se tiñeron primero con 1 microg/ml de anticuerpo IgG humano o anti-alfa4beta7, se lavaron con PBS y se tiñeron con anticuerpo de cabra anti-IgG humana secundario conjugado con ficoeritrina. Tras el lavado con PBS, las células se analizaron por clasificación de células activadas por fluorescencia, por ejemplo, con un FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose CA). La intensidad de la tinción de fluorescencia (media geométrica) para cada tinción de anticuerpos se indica en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5: Unión a SNP

	% en peso	E97V	R213S	G629S	V824A	Q878R
IgG	8	7	7	7	7	7
1A10	122	135	31	80	102	70
3A5	124	135	31	80	110	71
2F12	129	134	37	80	112	73
18A11	92	105	30	63	82	56
22B2	97	108	58	65	85	58
26H3	93	106	49	62	82	55
27G8	102	116	59	68	88	58
26G2	99	113	38	64	86	58
17C8	93	96	49	58	74	51
19G6	94	108	46	59	67	46
25C9	96	106	33	59	77	51

Estos resultados indicaron que todos los anticuerpos probados se unieron a los SNP conocidos de alfa4beta7.

5 Las actividades de diversos anticuerpos específicos del heterodímero alfa4beta7 en varios ensayos diferentes se comparan en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6: Caracterización de anticuerpos contra alfa4beta7

Anticuerpo	CI50 Adhesión HUT78 (ng/ml)	CI50 Competición MAdCAM-1 (ng/ml)	CE50 Unión celular CD4+CD45RA- (ng/ml)	a4b7(S250N) Unión
1A10	6,1	6,2	4,9	-
3A5	7,5	6,2	5,6	-
2F12	11,4	4,6	3,3	-
18A11	7,4	7,3	4,7	-
22B2	3,7	23,2	5,1	-
26H3	8,9	14,1	9,3	-
27G8	14,9	8,7	6,3	-
26G2	6,9	99,6	32,6	+
17C8	6,8	31,1	22,9	+
19G6	12,2	103,3	32,9	+
25C9	13,7	77,6	NA	+

10 Soler et al. informaron de la especificidad de unión de un anticuerpo anti-alfa4beta7 humanizado conocido como vedolizumab (J Pharmacol Exp Ther 330:864; 2009). Se informó que este anticuerpo tenía una CE50 en linfocitos T CD4+ de memoria de 0,042 microg/ml (42 ng/ml). Vedolizumab también inhibió la unión de MAdCAM-1 soluble a las células T de memoria alfa4beta7hi con una CI50 de 0,034 microg/ml (34 ng/ml). En cambio, muchos de los anticuerpos mostrados en la Tabla 6 tienen una CE50 en las células T de memoria (es decir, células CD4+CD45RA-) de menos de 10 ng/ml, y todos ellos tienen una CE50 de menos de 35 ng/ml (todos tienen también una CE50 de más de 0,1 ng/ml en este ensayo). Adicionalmente, varios de los anticuerpos mostrados en la Tabla 6 demostraron una CI50 en un ensayo de competición MAdCAM de menos de 10 ng/ml, y muchos demostraron una CI50 de menos de 30 ng/ml (todos mostraron también una CI50 de más de 0,1 ng/ml en este ensayo). Aunque Soler et al. no mencionó la capacidad de vedolizumab para unirse a un mutante S250N de alfa4beta7, se sabe que el anticuerpo murino ACT-1 del que deriva vedolizumab es incapaz de unirse a un mutante S250N (Tidswell et al., J Immunol 159:1497; 1997) y según Soler et al., vedolizumab y ACT-1 exhiben la misma especificidad de antígeno. Por lo tanto, vedolizumab tampoco se une al mutante S250N, en contraste con varios de los anticuerpos mostrados en la Tabla 6.

Ejemplo 4: análisis adicional

25 Se eligieron varios anticuerpos representativos con diferentes propiedades en los ensayos funcionales mencionados anteriormente para un análisis adicional como se describe a continuación.

Afinidad de unión a a4b7 humano

30 Para medir la afinidad de unión a la célula de anticuerpos anti-alfa4beta7, puede usarse un ensayo de exclusión cinética que mide los eventos de unión en la fase de solución para calcular la constante de disociación en equilibrio, K_d . Se usó tecnología KinExA® (Sapidyne Instruments, Boise, ID), sustancialmente como se describe anteriormente por Xie et al. *J. Imm, Methods* 304:1 (2005) y Rathanaswami et al. *Anal. Biochem.* 373:52 (2008). En resumen, las células HUT78 que expresan alfa4beta7 humano se titularon 1 en 3 de $\sim 50^6$ células/ml a ~ 400 células/ml y después se equilibraron con una concentración final de 2 o 30 pM de mAb 2F12 o 18A11 y 30 o 500 pM para 17C8 durante 18 horas a 4 °C. El anticuerpo libre que quedaba en el sobrenadante en equilibrio se midió mediante la tecnología KinExA® pasando el sobrenadante sobre perlas de PMMA previamente recubiertas con Fc de cabra anti-humano y se detectaron con Cy5 anti-humano de cabra (H+L) (sustancialmente como se describe por Rathanaswami et al. *Biochem Biophys Research Commun*:1004 (2005). La constante de disociación de equilibrio (K_d) se obtiene utilizando el software KinExA® mediante el "análisis de curva n" que ajusta todas las curvas dadas a un solo valor simultáneamente (Rathanaswami et al. 2005 y Xie et al., *supra*): los resultados se muestran a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7: Afinidad de unión de los anticuerpos

Anticuerpo	Kd (pM)	Relación (bajo Ab)	% de error	Kd baja	Kd alta
2F12	4,56	0,44	3,80	1,94	11,12
18A11	0,90	2,22	4,40	0,23	2,29
17C8	29,36	1,02	3,58	12,09	74,53

45

Estos anticuerpos demostraron una Kd en un ensayo KinExA® superior a 0,05 pM, pero menos de 80 pM, menos de 15 pM, o menos de 5 pM.

Características PK/PD

5 Se realizó un estudio farmacocinético (PK) y farmacodinámico (PD) de dosis única de tres anticuerpos anti-alfa4beta7 completamente humanos en macacos cangrejeros machos después de la administración intravenosa (IV; 5 mg/kg) o subcutánea (SC; 0,5 o 5 mg/kg). Se observó una exposición inicial similar a PK (C_0 ; concentración a tiempo cero) y la distribución dentro de la circulación central después de 5 mg/kg IV. Después de la administración
10 SC, tanto $C_{m\acute{a}x}$ (la concentración máxima en heces) y el AUC (área bajo la curva de concentración-tiempo) mostraron una proporción de dosis dentro del intervalo de dosis de 0,5-5 mg/kg SC para los tres anticuerpos. La biodisponibilidad absoluta después de SC para los tres anticuerpos probados varió del 44 al 68 %.

15 El alfa4beta7 libre en las células T antes y después del tratamiento con anticuerpos se cuantificó mediante el anticuerpo 27G8 anti-alfa4beta7 conjugado con PE. El nivel de fondo se controló mediante tinción con el anticuerpo anti-alfa4beta7 conjugado con PE 27G8 en presencia de 10 mg/ml de anticuerpo que se probó antes y después del tratamiento con el anticuerpo. La saturación fraccional se determinó por el porcentaje de sitios alfa4beta7 libres en comparación con el tratamiento previo para cada anticuerpo. CD4-PerCP, CD99-APC y CD28-FITC se usaron para distinguir células vírgenes, de memoria central y de memoria efectoras. Se mostró saturación fraccional de
20 alfa4beta7 en células T vírgenes debido a la variabilidad y sensibilidad limitada del ensayo en la población de células con memoria de macaco cangrejero. Para el tratamiento 18A11, los tres grupos de dosificación permanecieron saturados desde el día 1 hasta el día 14. El día 29, los tres grupos perdieron cobertura. En ambos tratamientos 2F12 y 17C8, la pérdida de cobertura del objetivo se observó el día 14 en el grupo de dosis baja (0,5 mg/kg).

25 Además de la detección gratuita de alfa4beta7, la saturación diana también se determinó mediante tinción con anticuerpo anti-humano A35 conjugado con PE en ausencia o presencia de 10 mg/ml de anticuerpo. Se estimaron los sitios alfa4beta7 totales con preincubación de muestras con 10 mg/ml de anticuerpo anti-alfa4beta7 seguido de tinción con anticuerpo antihumano. La saturación diana se determinó por el porcentaje de los sitios alfa4beta7 totales ocupados por los anticuerpos anti-alfa4beta7 para cada muestra. Los tres anticuerpos anti-alfa4beta7
30 completamente humanos demostraron una saturación de alfa4beta7 que se mantuvo en un promedio del 81 al 100 % en 14 días después de 5 mg/kg IV.

Se llevó a cabo un modelo PK/PD sobre las concentraciones séricas de anticuerpos anti-alfa4beta7 y los correspondientes datos de saturación del receptor alfa4beta7 utilizando un modelo $E_{m\acute{a}x}$ directo. Los parámetros de
35 PD estimados del modelo son $E_{m\acute{a}x}$ (saturación máxima del receptor alfa4beta7) del 92 %, CE_{50} (concentración de anticuerpos anti-alfa4beta7 a la cual el 50 % de la $E_{m\acute{a}x}$ se alcanzó) de 52 ng/ml, y E_0 (saturación inicial del receptor alfa4beta7) del 18 %. Los tres anticuerpos exhibieron potentes efectos *in vivo* de PD en la saturación de los receptores alfa4beta7 con $t_{1/2}$ promedio de ~3-5 días en macacos cangrejeros.

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AMGEN INC.

HSU, Hailing

FOLTZ, Ian

45 ARORA, Taruna

JACOBSEN, Frederick W.

<120> ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DEL HETERODÍMERO ALFA4BETA7

50 <130> A-1459-WO-PCT

<140> --a asignar--

<141> 16-03-2010

55 <150> 61/306.829

<151> 25-02-2010

<150> 61/162.154

<151> 03-20-2009

60

<160> 72

<170> PatentIn versión 3.5

65

<210> 1

<211> 107

ES 2 751 946 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

5

```

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ile 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp
          85           90           95

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

<210> 2
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 2

```

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Tyr Trp Pro Pro
          85           90           95

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

15

ES 2 751 946 T3

5 <210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

10 <210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 4

ES 2 751 946 T3

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Leu 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp
85 90 95

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

<210> 5
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 5

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

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

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

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

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

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

10

Ser Ala Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 6
<211> 107

ES 2 751 946 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ile Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Met Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ile 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 7

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

15

ES 2 751 946 T3

<210> 8
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 8

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

10 <210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

ES 2 751 946 T3

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 Phe Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp
85 90 95

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

<210> 10
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 10

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

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Ala Ile Lys
100 105

10

<210> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15

<400> 11

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

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

ES 2 751 946 T3

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Trp Pro Pro
 85 90 95

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

5 <210> 12
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 12

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

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

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Leu Phe Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr His Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

15 <210> 13
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

ES 2 751 946 T3

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

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

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

5
 <210> 14
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10
 <400> 14

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 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Cys
 85 90 95

Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

ES 2 751 946 T3

<210> 15
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 15

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 Ser Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asn Thr Tyr
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Asn Leu Pro Ile
 85 90 95

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

10 <210> 16
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 16

ES 2 751 946 T3

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

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

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

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

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

Ser Phe Gly Gln Gly Thr Asp Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 17
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 17

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

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

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

Phe Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

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

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

10

<210> 18
 <211> 108
 <212> PRT

ES 2 751 946 T3

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

Glu Arg Ala Thr Val Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asp
 20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

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

5

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

<210> 19

<211> 108

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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

Glu Gly Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asp
 20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Ala Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Asp Trp Pro Pro
 85 90 95

Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

15

ES 2 751 946 T3

<210> 20
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 20

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

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Ser Gln Ser Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

10

<210> 21
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15

<400> 21

ES 2 751 946 T3

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Trp Pro Pro
 85 90 95

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

<210> 22
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22

5

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

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

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

10

Tyr Ser 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asp Ser Phe Pro Trp
 85 90 95

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

ES 2 751 946 T3

5 <210> 23
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23

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

10 <210> 24
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 24

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

ES 2 751 946 T3

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

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

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

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

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

<210> 25
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 25

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

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

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Leu Phe Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr His Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

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

Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

10

<210> 26
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 26

ES 2 751 946 T3

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

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

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Leu Phe Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr His Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

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

Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

5 <210> 27
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 27

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 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

15 <210> 28
 <211> 107

ES 2 751 946 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

5

```

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ile 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp
           85           90           95

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

<210> 29
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

10

```

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 Val Ser Gly Tyr Thr Leu Asn Asp Leu
           20           25           30

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

Gly Gly Phe Asp Pro Ala Glu Gly Lys Ile Ile Ser Ala Gln Lys Phe
50           55           60

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

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

Ala Thr Leu Asp Phe Ser Ser Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
           100          105          110
    
```

15

ES 2 751 946 T3

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

5
<210> 30
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

15
<210> 31
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

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

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

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

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

ES 2 751 946 T3

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

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

Ala Arg Glu His Trp Asn Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 32
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 32

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 Val Ser Gly Tyr Thr Val Thr Asp Leu
20 25 30

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

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

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

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

Thr Thr Glu Ser Ser Ser Ala Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 33
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

ES 2 751 946 T3

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 Val Ser Gly Tyr Thr Leu Asn Asp Leu
 20 25 30

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

Gly Gly Phe Asp Pro Ala Glu Gly Lys Ile Ile Ser Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Thr Leu Asp Phe Ser Ser Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

- 5 <210> 35
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 10 <400> 35

ES 2 751 946 T3

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Thr Gly Ser Ala Met Tyr Asp Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Phe Ser Ser Gly Trp Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 36
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 36

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30

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

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

10

ES 2 751 946 T3

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

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

Ala Arg Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 37
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 37

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 Val Ser Gly Tyr Thr Leu Ser Asp Leu
20 25 30

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

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

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

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

Ala Thr Gly Ser Ser Ser Ser Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

10

<210> 38
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15

<400> 38

ES 2 751 946 T3

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ile Gly Ser Ala Ile His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Tyr Ser Ser Gly Trp Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 41
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 41

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

10

ES 2 751 946 T3

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Asp Trp Asn Tyr Ala Asp Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

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

5 <210> 42
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Arg Val Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

10 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 43
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

ES 2 751 946 T3

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 45
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 45

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr His Arg Leu Trp Leu Gly Thr Leu Pro Gly Gly Phe Tyr Ile
 100 105 110

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

15 <210> 46
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46

ES 2 751 946 T3

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Cys Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 48
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48

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

5

10

ES 2 751 946 T3

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

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

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

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

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

Ala Lys Ala Pro Tyr Ser Ser Ser Trp Ala Leu Gly Leu Gly Met Asp
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 49
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 49

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Thr Gly Ser Thr Leu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Thr Arg Glu Tyr Ser Ser Gly Trp Phe Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

10

ES 2 751 946 T3

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 50
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 50

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

15 <210> 51
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Ile His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

20

ES 2 751 946 T3

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

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

Ala Arg Asp His Ser Ser Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 52
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 52

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Ala Met Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Tyr Ser Ser Gly Trp Phe Phe Phe Glu Ser Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 53
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

ES 2 751 946 T3

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 Val Ser Gly Tyr Thr Leu Asn Asp Leu
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Ala Glu Gly Lys Ile Ile Ser Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Asp 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 Asp Phe Ser Ser Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 54
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 54

ES 2 751 946 T3

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

- 5 <210> 55
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial
- 10 <220>
<223> Cadena ligera consenso

<220>
<221> MISC_FEATURE
- 15 <222> (2)..(2)
<223> X puede ser Val, Leu o Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
- 20 <222> (3)..(3)
<223> X puede ser Met o Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
- 25 <222> (4)..(4)
<223> X puede ser Met o Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
- 30 <222> (5)..(5)
<223> X puede ser Met o Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE

- <222> (9)..(9)
<223> X puede ser Ala o Gly
- 5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X puede ser Leu o Val
- 10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X puede ser Phe o Ser
- 15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> X puede ser Gly, Arg o Thr
- 20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> X puede ser Val o Leu
- 25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> X puede ser Thr o Ser
- 30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> X puede ser thr, Asn o Ser
- 35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> X puede ser Thr, Asn o Ser
- 40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> X puede ser Thr, Asp o Ser
- 45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> X puede ser Asn, Asp o Ser
- 50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (33)..(33)
<223> X puede ser Tyr o ninguno
- 55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (35)..(35)
<223> X puede ser Val o Ala
- 60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (40)..(40)
<223> X puede ser Ser o Lys
- 65 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (42)..(42)

<223> X puede ser Ser o Gly
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (44)..(44)
 <223> X puede ser Ser, Pro o Ala
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (50)..(50)
 <223> X puede ser Phe o Tyr
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (54)..(54)
 <223> X puede ser Thr, Ala o Ser
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (61)..(61)
 <223> X puede ser Ala o Asp
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (71)..(71)
 <223> X puede ser Glu o Asp
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (78)..(78)
 <223> X puede ser Ser o Arg
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 35 <222> (80)..(80)
 <223> X puede ser Gln o Glu
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <222> (81)..(81)
 <223> X puede ser Pro o Ser
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 45 <222> (88)..(88)
 <223> X puede ser Phe, Cys o Tyr
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 50 <222> (93)..(93)
 <223> X puede ser His, Asn o Asp
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 55 <222> (94)..(94)
 <223> X puede ser Asp, Asn, Tyr o Ser
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 60 <222> (95)..(95)
 <223> X puede ser Trp o Ser
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 65 <222> (97)..(97)
 <223> X puede ser Pro o ninguno

ES 2 751 946 T3

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (98)..(98)
 <223> X puede ser Val, Leu o ninguno

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99)..(99)
 <223> X puede ser Thr o Ser

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (102)..(102)
 <223> X puede ser Gln o Glu

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (105)..(105)
 <223> X puede ser Arg, Thr o Lys

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (106)..(106)
 <223> X puede ser Leu o Val

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (107)..(107)
 <223> X puede ser Glu o Ala

<400> 55

Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Ser Pro Xaa Thr Leu Ser Xaa Xaa Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Xaa Ala Thr Xaa Ser Cys Arg Ala Ser Gln Xaa Val Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Leu Xaa Trp Tyr Gln Gln Xaa Pro Xaa Gln Xaa Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Xaa Gly Ala Ser Xaa Arg Ala Thr Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Xaa Phe Thr Leu Thr Ile Ser Xaa Leu Xaa
 65 70 75 80

Xaa Glu Asp Phe Ala Val Tyr Xaa Cys Gln Gln Tyr Xaa Xaa Xaa Pro
 85 90 95

Xaa Xaa Xaa Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Xaa Ile Lys
 100 105

35 <210> 56
 <211> 107
 <212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> Cadena ligera consenso
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> X puede ser Val o Leu
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> X puede ser Ser o Phe
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> X puede ser Val o Ile
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> X puede ser Asp o Gly
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> X puede ser Ile o Val
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> X puede ser Ser, Ile, Asn o Arg
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> X puede ser Ser o Asn
 40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> X puede ser Trp o Tyr
 45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (38)..(38)
 <223> X puede ser Arg o Gln
 50
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (42)..(42)
 <223> X puede ser Lys, Met o Thr
 55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (43)..(43)
 <223> X puede ser Ala o Val
 60
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (45)..(45)
 <223> X puede ser Lys o Asn
 65
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (46)..(46)
 <223> X puede ser Val o Leu

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (49)..(49)
 <223> X puede ser Tyr o Phe

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(50)
 <223> X puede ser Ser, Ala o Gly

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(51)
 <223> X puede ser Ala o Thr

20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (53)..(53)
 <223> X puede ser Ser, Ile, Asn o Thr

25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> X puede ser Gln o Glu

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (56)..(56)
 <223> X puede ser Ser o Asn

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (60)..(60)
 <223> X puede ser Ser o Leu

40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (65)..(65)
 <223> X puede ser Ser o Arg

45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (72)..(72)
 <223> X puede ser Ala o Thr

50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (76)..(76)
 <223> X puede ser Ser o Asn

55

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (83)..(83)
 <223> X puede ser Phe o Val

60

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (85)..(85)
 <223> X puede ser Thr o Asn

65

<220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (87)..(87)
 <223> X puede ser Tyr o Cys

 <220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (90)..(90)
 <223> X puede ser Gln o Lys

 <220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (91)..(91)
 <223> X puede ser Ala, Val o Tyr

 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (92)..(92)
 <223> X puede ser Asp o Asn

 <220>
 20 <221> MISC_FEATURE
 <222> (94)..(94)
 <223> X puede ser Phe o Ala

 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <222> (96)..(96)
 <223> X puede ser Trp, Gly o Phe

 <220>
 30 <221> MISC_FEATURE
 <222> (100)..(100)
 <223> X puede ser Gln, Arg o Pro

 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (103)..(103)
 <223> X puede ser Lys o Asn

 <220>
 40 <221> MISC_FEATURE
 <222> (105)..(105)
 <223> X puede ser Glu o Asp

 <400> 56
 45

ES 2 751 946 T3

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

5 <210> 57
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cadena ligera consenso

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X puede ser Ile o Val

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> X puede ser Ser o Thr

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> X puede ser Ser, Asn o Thr

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> X puede ser Asn, Thr o Asp

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (43)..(43)
 <223> X puede ser Ala o Val

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(51)
 <223> X puede ser Ala o Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (56)..(56)
 5 <223> X puede ser Thr o Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (76)..(76)
 10 <223> X puede ser Asn o Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (77)..(77)
 15 <223> X puede ser Gly o Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (87)..(87)
 20 <223> X puede ser Phe o Tyr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (91)..(91)
 25 <223> X puede ser Phe o Tyr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (93)..(93)
 30 <223> X puede ser Asn o Ile

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (96)..(96)
 35 <223> X puede ser Cys, Ser, Ile o Tyr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (97)..(97)
 40 <223> X puede ser Ser o Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (103)..(103)
 45 <223> X puede ser Lys, Arg o Asp

<400> 57

ES 2 751 946 T3

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

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

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

Tyr Asp Xaa Ser Asn Leu Glu Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Xaa Cys Gln Gln Xaa Asp Xaa Leu Pro Xaa
 85 90 95

Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Xaa Leu Glu Ile Lys
 100 105

- 5 <210> 58
- <211> 121
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> Cadena pesada consenso
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (10)..(10)
- <223> X puede ser Gly o Asp
- 15 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (13)..(13)
- <223> X puede ser Lys o Glu
- 20 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (23)..(23)
- <223> X puede ser Thr, Val o Ala
- 25 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (30)..(30)
- <223> X puede ser Ser, Arg o Asn
- 30 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (32)..(32)
- <223> X puede ser Tyr o Asn
- 35 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (40)..(40)
- <223> X puede ser Ala o Thr

- 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (48)..(48)
 <223> X puede ser Val, Ile o Leu
- 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (53)..(53)
 <223> X puede ser Ser, Arg o Asn
- 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (54)..(54)
 <223> X puede ser Ser, Thr, Val o Ile
- 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (57)..(57)
 <223> X puede ser Ala, Thr o Val
- 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (58)..(58)
 <223> X puede ser thr, Val, Met, Ile, Leu o Ser
- 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (59)..(59)
 <223> X puede ser Tyr o His
- 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (60)..(60)
 <223> X puede ser Tyr, Ser, Asp o Cys
- 40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (73)..(73)
 <223> X puede ser Asp, Val o His
- 45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (75)..(75)
 <223> X puede ser Ala o Pro
- 50
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (76)..(76)
 <223> X puede ser Lys o Arg
- 55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (83)..(83)
 <223> X puede ser Met o Leu
- 60
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (84)..(84)
 <223> X puede ser Asp, Asn o Ser
- 65
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (89)..(89)
 <223> X puede ser Glu o Asp

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (91)..(91)
 <223> X puede ser Thr o Ala
 5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (94)..(94)
 <223> X puede ser Phe o Tyr
 10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (97)..(97)
 <223> X puede ser Ala o Thr
 15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99)..(99)
 <223> X puede ser Glu o Asp
 20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (100)..(100)
 <223> X puede ser His, Tyr, Phe o Arg
 25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (103)..(103)
 <223> X puede ser Gly o Ala
 30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (104)..(104)
 <223> X puede ser Tyr, Trp o Leu
 35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (105)..(105)
 <223> X puede ser Asp o ninguno
 40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (106)..(106)
 <223> X puede ser Trp, Ala, Phe, Tyr, Ser, Val o Glu
 45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (107)..(107)
 <223> X puede ser Tyr, Phe, Ser o Ala
 50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (109)..(109)
 <223> X puede ser Asp o Glu
 55

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (110)..(110)
 <223> X puede ser Leu, Tyr, Ser o Ile
 60

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (113)..(113)
 <223> X puede ser Arg, Gln o His
 65

<220>

ES 2 751 946 T3

<221> MISC_FEATURE
 <222> (115)..(115)
 <223> X puede ser Ala o Thr

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (116)..(116)
 <223> X puede ser Leu o Met

10 <400> 58

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

15 <210> 59
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cadena pesada consenso

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> X puede ser Leu o Val

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> X puede ser Asn, Thr o Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (34)..(34)

<223> X puede ser Met o Ile
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (54)..(54)
 <223> X puede ser Ala o Gln
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (55)..(55)
 <223> X puede ser Glu o Asp
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (57)..(57)
 <223> X puede ser Lys o Glu
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (58)..(58)
 <223> X puede ser Ile o Thr
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (60)..(60)
 <223> X puede ser Ser o Tyr
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (66)..(66)
 <223> X puede ser Asp o Gly
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 35 <222> (72)..(72)
 <223> X puede ser Asp, Arg o Glu
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <222> (77)..(77)
 <223> X puede ser Asp o Ser
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 45 <222> (79)..(79)
 <223> X puede ser Ala o Val
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 50 <222> (84)..(84)
 <223> X puede ser Ser o Arg
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 55 <222> (87)..(87)
 <223> X puede ser Arg o Lys
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 60 <222> (91)..(91)
 <223> X puede ser Ser o Thr
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 65 <222> (97)..(97)
 <223> X puede ser Ala o Thr

ES 2 751 946 T3

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (98)..(98)
 <223> X puede ser Thr o Arg

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99)..(99)
 <223> X puede ser Leu, Glu o Gly

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (100)..(100)
 <223> X puede ser Asp o Ser

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (101)..(101)
 <223> X puede ser Phe o Ser

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (103)..(103)
 <223> X puede ser Ser o Ala

<400> 59

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 Val Ser Gly Tyr Thr Xaa Xaa Asp Leu
 20 25 30

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

Gly Gly Phe Asp Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Ile Xaa Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

30 <210> 60
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena pesada consenso

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> X puede ser Gln o Lys

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> X puede ser Gly o Arg

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (89)..(89)
 <223> X puede ser Glu o Asp

20 <400> 60

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

25 <210> 61
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cadena pesada consenso

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> X puede ser Lys o Glu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 5 <223> X puede ser Ser o Ile

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 10 <223> X puede ser Gly o Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (35)..(35)
 15 <223> X puede ser Gly o Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (40)..(40)
 20 <223> X puede ser Met o Leu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (52)..(52)
 25 <223> X puede ser Tyr o Asp

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (54)..(54)
 30 <223> X puede ser Tyr o Asn

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (77)..(77)
 35 <223> X puede ser Asn o His

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (94)..(94)
 40 <223> X puede ser Phe o Tyr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (98)..(98)
 45 <223> X puede ser Ser o Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (105)..(105)
 50 <223> X puede ser Glu o Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (106)..(106)
 55 <223> X puede ser Phe o Leu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (109)..(109)
 60 <223> X puede ser Pro o Gly

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (110)..(110)
 65 <223> X puede ser Leu o Phe

ES 2 751 946 T3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (111)..(111)
 <223> X puede ser Asn o Tyr

5

<400> 61

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Xaa Phe Thr Xaa Tyr
 20 25 30

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

Gly Ile Ile Xaa Pro Xaa Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Xaa Tyr Cys
 85 90 95

Ala Xaa His Arg Leu Trp Leu Gly Xaa Xaa Pro Gly Xaa Xaa Xaa Ile
 100 105 110

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

10 <210> 62
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Péptido FLAG (marca registrada)

<400> 62

20 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 63
 <211> 321
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens

<400> 63

ES 2 751 946 T3

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca gggattagc agctggtag cctgggatca acagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccaatt tggaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caaattacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgtggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

5 <210> 64
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 64

caggtccagc tggtagagtc tgggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg tttccggata caccctcagt gatttatcca tccactgggt gcgacaggt 120
 cctggaaaag ggcttgagt gatgggaggt tttgatcctc aagatggtga aacaatctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgaa atctgaggac acggccgtgt attactgcgc aacggggagc 300
 agctcgtcct ggttcgaccc ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc tagt 354

10
 15 <210> 65
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 65

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctcccgggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagt agcaacttag tctgggatca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggtcct catttatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcaa tatgatgact ggccctccgct cactttcggc 300
 ggagggacca cggtgagat caaa 324

20
 25 <210> 66
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 66

ES 2 751 946 T3

	caggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc	60
	tctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct	120
	ccagggaaagg ggctggagtg gctttcatac attagtaata gtggtagtgc catgtactac	180
	gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaggaa ctcaactgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt actactgtgc gagagagtat	300
	agcagtggct gggtctctct tgagtcctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctctagt	360
5	<210> 67 <211> 321 <212> ADN <213> Homo sapiens	
10	<400> 67	
	gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtttgcac ctgtaggaga cagagtcacc	60
	atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctggtag cctggatca gcagaaacca	120
	gggaaagccc ctaatctcct gatctatggt gcatccagtt tacaaaatgg ggtccatta	180
	aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
	gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgtggac gttcggccaa	300
	gggaccaagg tggaaatcaa a	321
15	<210> 68 <211> 354 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20	<400> 68	
	caggtccagc tggtagagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
	tcttgcagg tttccggata caccgtcact gatttatcca tgcactgggt gcgacaggct	120
	cctggaaaag ggcttgagtg gatgggagg tttgatcctc aagatggatga aacaatctac	180
	gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac	240
	atggagctga gaagcctgag atctgaggac acggccgtat attactgtac aacagaaagc	300
	agctcggcct gggttcgacc ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc tagt	354
25	<210> 69 <211> 324 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 69	

ES 2 751 946 T3

cgtagcgggtg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagagggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg ttga 324

5 <210> 70
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 70

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

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

15 <210> 71
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 71

ES 2 751 946 T3

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
 agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 120
 tggaaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg cacccagacc 240
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
 aaatgttggtg tcgagtgccc accgtgcccga gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360
 ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 480
 gtggagggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
 gtggtcagcg tcctcacctg tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600
 aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctcaa aaccaaaggg 660
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720

 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 840
 ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 960
 tccctgtctc cgggtaaatg a 981

5 <210> 72
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 72

ES 2 751 946 T3

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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

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

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

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

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

ES 2 751 946 T3

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

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

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

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

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

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal específico del heterodímero alfa4beta7 aislado que tiene una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 37.
- 10 2. El anticuerpo monoclonal específico del heterodímero alfa4beta7 aislado de la reivindicación 1, que además comprende una región constante de cadena ligera y una región constante de cadena pesada.
- 15 3. El anticuerpo monoclonal específico del heterodímero alfa4beta7 aislado de la reivindicación 2 en donde la región constante de la cadena ligera se selecciona del grupo que consiste en:
 a) una región constante de cadena ligera de tipo kappa; y
 b) una región constante de cadena ligera de tipo lambda;
 y la región constante de la cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en:
 a') una región constante de un anticuerpo IgD;
 b') una región constante de un anticuerpo IgE;
 c') una región constante de un anticuerpo IgM;
 d') una región constante de un anticuerpo IgG1;
 e') una región constante de un anticuerpo IgG2;
 f') una región constante de un anticuerpo IgG3;
 g') una región constante de un anticuerpo IgG4; y
 h') una región constante de un anticuerpo IgG4 que tiene al menos una mutación en una región bisagra que alivia la tendencia a formar un enlace disulfuro intra-catenario H.
- 25 4. El anticuerpo monoclonal específico del heterodímero alfa4beta7 aislado de la reivindicación 3 en donde la región constante de la cadena ligera se selecciona del grupo que consiste en:
 a) un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 70;
 b) un polipéptido al menos un 90 % idéntico a la SEQ ID NO: 70;
 30 c) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 70, de la cual se han retirado uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos N-terminales y/o C-terminales; y
 d) un polipéptido de a), b) o c) que incorpora una o más modificaciones postraduccionales;
 y la región constante de la cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en:
 a') un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 72;
 b') un polipéptido al menos un 90 % idéntico a la SEQ ID NO: 72;
 35 c') un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 72, de la cual se han retirado uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos N-terminales y/o C-terminales; y
 d') un polipéptido de a'), b') o c') que incorpora una o más modificaciones postraduccionales.
- 40 5. El anticuerpo monoclonal específico del heterodímero alfa4beta7 aislado de la reivindicación 1 en donde la región variable de la cadena ligera consiste en la SEQ ID NO: 9 y la región variable de la cadena pesada consiste en la SEQ ID NO: 37.
- 45 6. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 6.
8. Una célula hospedadora aislada transfectada o transformada con el vector de la reivindicación 7.
- 50 9. Un método para la producción de un anticuerpo monoclonal que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 8 en condiciones que promueven la expresión y la recuperación de la proteína del medio de cultivo.
10. Una composición que comprende el anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un diluyente, excipiente o vehículo fisiológicamente aceptable.
- 55 11. Un método *in vitro* para inhibir parcial o totalmente la adhesión de una célula que expresa alfa4beta7 a MAdCAM-I, que comprende poner en contacto la célula que expresa alfa4beta7 con un anticuerpo monoclonal específico del heterodímero alfa4beta7 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 60 12. La composición de la reivindicación 10 o el anticuerpo específico del heterodímero alfa4beta7 aislado de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino.
- 65 13. La composición o el anticuerpo específico del heterodímero alfa4beta7 aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 12 en donde la enfermedad inflamatoria del intestino se selecciona del grupo que consiste en colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca (esprue no tropical), enteropatía asociada a artropatías seronegativas, colitis microscópica o colagenosa, gastroenteritis eosinofílica y reservoritis resultante de

proctocolectomía y anastomosis ileoanal.

14. La composición de la reivindicación 10 o el anticuerpo específico del heterodímero alfa4beta7 aislado de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento de pancreatitis, mastitis, colecistitis, colangitis, pericolangitis, bronquitis crónica, sinusitis crónica o asma.
- 5