

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 700 4814
7743

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-077165- -00008-0000

Fecha: 2012-04-24 11:20:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 179

Señor Director
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Trámite : 011
Evento : 378
Actuación : 329

Referencia : Expediente No. **06.077.165**
Asunto : Solicitud de patente para: **ANTICUERPOS CONTRA
MADCAM**
Solicitante : **PFIZER INC Y AMGEN FREMONT INC**
Fecha solicitud : 04 de agosto de 2006

1. Yo, Luz Clemencia DE PÁEZ, obrando como apoderada del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al memorial radicado ante ese Despacho el 07 de marzo de 2012, mediante el cual presenté respuesta al Oficio No. 19429 notificado por fijación en lista del 15 de diciembre de 2011.

2. Con el memorial antes mencionado atendí a las observaciones que sobre excepción a la patentabilidad, reivindicaciones relativas a un uso, claridad y novedad efectuó ese Despacho sobre la presente solicitud de patente.

3. Como consecuencia de las anteriores observaciones y con fundamento en el artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, en donde se establece que la modificación de una solicitud es posible en cualquier momento del trámite mientras no implique una ampliación de la solicitud inicial, me permito presentar un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 21 reivindicaciones. Así, con el ánimo de presentar la materia reivindicada de manera más clara y concisa, se ha restringido el alcance a la línea celular de hibridoma 7.16.6 y a los anticuerpos, vector, célula huésped, método de producción y composiciones asociadas.

4. Igualmente y con fundamento en el artículo 36 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, que faculta al solicitante para que en cualquier momento del trámite divida la solicitud en dos o más fraccionarias, presenté junto con este escrito una solicitud divisional que comprende la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 06.077.165.

Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de la fecha 04 de agosto de 2006.

De acuerdo con el artículo 36 de la Decisión 486, manifiesto a ese Despacho que la materia de la presente solicitud queda cubierta por la prioridad US No. 60/535,490 del 09 de enero de 2004 y por lo tanto ésta no implica una ampliación de la protección que corresponda a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

5. En consecuencia, solicito a ese Despacho tener en cuenta el pliego reivindicatorio modificado para la solicitud original y admitir a trámite la solicitud divisional mencionada.

6. Anexos

- Pliego reivindicatorio conformado por 21 reivindicaciones para la solicitud original
- Formulario de modificaciones en solicitud pendiente
- Recibo por concepto de modificaciones en solicitud pendiente por valor de \$120.000
- Formulario de división de una solicitud en trámite
- Memoria descriptiva de la solicitud divisional
- Pliego reivindicatorio de la solicitud divisional conformado por 53 reivindicaciones
- Formulario por concepto de presentación de solicitud por valor de \$ 590.000
- Formulario por concepto de presentación de 43 reivindicaciones adicionales a la décima por valor de \$1'290.000

Señor Director,


LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

T.P.A. No. 23.555

COLO-15413-841-005-0
✓ COLO-15413-841-001-9
JMS\JMS\ID-215676\WPC15413
No. M-2012-215676\JMS



Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

1	SOLICITUD DE:	
	☐ Corrección de Error Material ☒ Modificación a una solicitud	
2	SOLICITANTE AMGEN FREMONT, INC. y PFIZER INC. Sociedades constituidas y existentes bajo las leyes del Estado de California y Delaware, Estados Unidos de América, respectivamente Dirección: 6701 Kaiser Drive, Fremont, California 94555, Estados Unidos de América Y 235 E 42 nd Street, 20 th floor, New York, New York 10017-5755, Estados Unidos de América Domicilio: Fremont, California, Estados Unidos de América Y New York, New York, Estados Unidos de América Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50 E-mail: clientes@cavelier.com	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: _____
3	REPRESENTANTE O APODERADO Nombre: Luz Clemencia de PAEZ Dirección: Carrera 4ª No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11 E-mail: cavelier@cavelier.com	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: <u>35.456.344</u> TP <u>23.555</u>
4	Número de expediente: <u>06.077.165</u>	
5	Descripción de la corrección o modificación solicitada: <u>Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 21 reivindicaciones y pido respetuosamente</u> <u>que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas.</u>	
6	Comprobante de pago No. <u>12-0032492</u> Fecha: <u>02 de abril de 2012</u>	

7	Anexos ☒ Comprobante de pago de la tasa por \$120.000.00, por concepto de modificaciones. ☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por. ☐ Poderes, si fuere el caso ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas. ☐ Copia auténtica de la sustitución que del poder otorgado por la Sociedad Solicitante hizo el Doctor EMILIO FERRERO a mi favor, y para lo cual solicito me sea reconocida personería para continuar con el trámite del asunto de la referencia.
8	NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ FIRMA: <u><i>LUZ CLEMENCIA DE PAEZ</i></u> C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P.A. 23.555
JMS	

67

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA FORMULARIO ÚNICO DE CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES		Espacio reservado para el adhesivo de radicación	
1 ☐ Conversión. ☒ División ☐ Fusión			
☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Registro de Diseño Industrial ☐ Esquemas de Trazado para Circuitos Integrados			
2 SOLICITANTE (71)		AMGEN FREMONT, INC. y PFIZER INC. Sociedades constituidas y existentes bajo las leyes del Estado de California y Delaware, Estados Unidos de América, respectivamente Dirección:6701 Kaiser Drive, Fremont, California 94555, Estados Unidos de América Y 235 E 42nd Street, 20th floor, New York, New York 10017-5755, Estados Unidos de América Domicilio: Fremont, California, Estados Unidos de América Y New York, New York, Estados Unidos de América Teléfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70 E-mail: clientes@cavelier.com IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____	
3 REPRESENTANTE O APODERADO		Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11 E-mail: cavelier@cavelier.com IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ C.E. ☐ NIT ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>35.456.344</u> T.P <u>23.555</u>	

4 CONVERSIÓN Expediente No: De: A:	5 DIVISIÓN Expediente No: <u>06.077.165</u> No. de Divisionales: <u>1</u>	6 FUSIÓN Expediente No: Expediente No:
7 Comprobante de pago No.: <u>12-0032560</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0032517</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0032518</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0032519</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0032545</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0022767</u> Fecha: <u>02 de abril de 2012</u> Fecha: <u>02 de abril de 2012</u> Fecha: <u>02 de abril de 2012</u> Fecha: <u>02 de abril de 2012</u> Fecha: <u>02 de abril de 2012</u> Fecha: <u>05 de marzo de 2012</u>		
8 Anexos ☒ Comprobante de pago de la tasa por \$590.000.oo ☒ Comprobante de pago por 43 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$1.290.000.oo ☒ Poderes, si fuere el caso ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas. ☒ Copia de la Solicitud Divisional.		
9 NOMBRE: <u>LUZ CLEMENCIA DE PAEZ</u> FIRMA: <u><i>LUZ CLEMENCIA DE PAEZ</i></u> C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555		
JMS		

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No.06.077.165 . Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 04 de agosto de 2006 y la prioridad que allí se reivindica del 09 de enero de 2004.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 06.077.165.

REIVINDICACIONES

1. Línea celular de hibridoma 7.16.6 (Colección Europea de Cultivos Celulares ECACC por sus siglas en inglés, Acceso No. 03090909).
2. Un anticuerpo monoclonal que tiene las mismas secuencias de aminoácido que el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Un anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al MAdCAM, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde las secuencias de aminoácido CDR1, CDR2 y CDR3 son las secuencias de aminoácido de los residuos 50 a 54, 69 a 85 y 118 a 132, respectivamente, de la SEQ ID NO: 34 y los residuos 44 a 59, 75 a 81 y 114 a 122, respectivamente, de la SEQ ID NO: 36.
4. Un anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al MAdCAM, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde las secuencias de aminoácido CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas pesada y ligera son las secuencias de aminoácido CDR1, CDR2 Y CDR3 de las cadenas pesada y ligera, respectivamente, del anticuerpo monoclonal 7.16.6 (ECACC Acceso No. 03090909).
5. El anticuerpo monoclonal o la porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las secuencias de aminoácido desde el comienzo de CDR1 hasta el final de CDR3 de las cadenas pesada y ligera son las secuencias de aminoácido de los residuos 50 a 132 de la SEQ ID NO: 34 y los residuos 44 a 122 de la SEQ ID NO: 36, respectivamente.
6. El anticuerpo monoclonal o la porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 4, en donde las secuencias de aminoácido desde el comienzo de CDR1 hasta el final de CDR3 de las cadenas pesada y ligera son las secuencias de aminoácido desde el comienzo de CDR1 hasta el final de CDR3 de las cadenas pesada y ligera, respectivamente, del anticuerpo monoclonal 7.16.6 (ECACC Acceso No. 03090909).
7. El anticuerpo monoclonal o la porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las secuencias de aminoácido de los dominios variables de las

cadenas pesada y ligera son las secuencias de aminoácido de los residuos 20 a 144 de la SEQ ID NO: 34 y los residuos 21 a 133 de la SEQ ID NO: 36, respectivamente.

8. El anticuerpo monoclonal o la porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 4, en donde las secuencias de aminoácido de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera se seleccionan son las secuencias de aminoácido de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal 7.16.6 (ECACC Acceso No. 03090909).

9. Un anticuerpo monoclonal cuya secuencia de aminoácidos de cadena ligera es SEQ ID NO: 36 sin la secuencia de señal y cuya secuencia de aminoácidos de cadena pesada es SEQ ID NO: 34 sin la secuencia de señal.

10. El anticuerpo monoclonal humano o la porción de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en donde dicho anticuerpo o porción posee al menos una de las siguientes propiedades:

- (a) se une a las células humanas;
- (b) tiene una selectividad para el MAdCAM humano sobre el VCAM o la fibronectina de al menos 100 veces;
- (c) se une al MAdCAM humano con un K_d de 3×10^{-10} M o menos;
- (d) inhibe la unión de las células que expresan $\alpha_4\beta_7$ al MAdCAM humano; o
- (e) inhibe el reclutamiento de linfocitos al tejido linfoide asociado con el tracto gastrointestinal.

11. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8 y 10 que es una molécula inmunoglobulina G (IgG), una IgM, una IgE, una IgA o una IgD, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo biespecífico.

12. La porción que de unión al antígeno de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8 y 10, que es un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$ un fragmento F_v o un anticuerpo de cadena simple.

13. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del anticuerpo monoclonal de la porción que se une a antígeno de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

14. Una línea celular aislada que produce el anticuerpo 7.16.6 (ECACC Acceso No. 03090909) o un anticuerpo que tiene las mismas secuencias CDR de pesada y ligera que el anticuerpo 7.16.6.

15. Una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleótida que codifica la cadena pesada, o una porción de unión al antígeno de la misma, o la cadena ligera, o una porción de unión al antígeno de la misma, o ambas cadenas pesada y ligera, o una porción de unión al antígeno de las mismas o un anticuerpo anti-MAdCAM, en donde la cadena pesada o ligera es codificada por una secuencia nucleótida seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NOs: 33 y 35, o dicha secuencia sin una secuencia de señal, si está presente.

16. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el vector comprende opcionalmente una secuencia de control de expresión operablemente unida a la molécula de ácido nucleico.

17. Una célula huésped que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 16 o la molécula de ácido nucleico de acuerdo a la reivindicación 15.

18. Una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada o una porción de unión al antígeno de la misma y una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera o una porción de unión al antígeno de la misma, del anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11.

19. Un método para producir un anticuerpo monoclonal anti-MAdCAM o una porción de unión al antígeno del mismo, que comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 17 o 18 o la línea celular de acuerdo con la reivindicación 14, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en la célula huésped o línea celular y recuperar el anticuerpo o la porción de unión al antígeno.

20. Un kit de diagnóstico que comprende el anticuerpo monoclonal o la porción de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, un agente de diagnóstico adicional e instrucciones de uso en un método de diagnóstico.

21. Una vacuna que comprende el anticuerpo o la porción de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

JMS\JMS\ID-215133\WPC15413

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

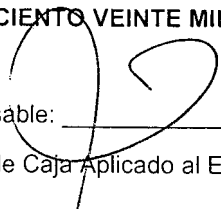
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0032492
		Bogotá D.C., Abril 02 de 2012 - 08:09:04

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	157713566	30/03/2012	42.925.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACION DE MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	120.000.00 120.000.00
			\$120.000.00
=====			

SON: **CIENTO VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 06-077165- -00008-0000

Fecha: 2012-04-24 11:20:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 179

Cdo: 15413-841-001-9.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		Espacio reservado para el adhesivo de radicación	
FORMULARIO ÚNICO DE CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES			
1		SOLICITUD DE: ☐ Conversión. ☒ División ☐ Fusión	
☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Registro de Diseño Industrial ☐ Esquemas de Trazado para Circuitos Integrados			
2 SOLICITANTE (71)		AMGEN FREMONT, INC. y PFIZER INC. Sociedades constituidas y existentes bajo las leyes del Estado de California y Delaware, Estados Unidos de América, respectivamente Dirección:6701 Kaiser Drive, Fremont, California 94555, Estados Unidos de América Y 235 E 42nd Street, 20th floor, New York, New York 10017-5755, Estados Unidos de América Domicilio: Fremont, California, Estados Unidos de América Y New York, New York, Estados Unidos de América Teléfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70 E-mail: clientes@cavelier.com	
3 REPRESENTANTE O APODERADO		Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11 E-mail: cavelier@cavelier.com. IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>35.456.344</u> T.P <u>23.555</u>	

4 CONVERSIÓN Expediente No: De: A:	5 DIVISIÓN Expediente No: <u>06.077.165</u> No. de Divisionales: <u>1</u>	6 FUSIÓN Expediente No: Expediente No:
7 Comprobante de pago No.: <u>12-0032560</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0032517</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0032518</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0032519</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0032545</u> Comprobante de pago No.: <u>12-0022767</u> Fecha: <u>02 de abril de 2012</u> Fecha: <u>02 de abril de 2012</u> Fecha: <u>02 de abril de 2012</u> Fecha: <u>02 de abril de 2012</u> Fecha: <u>02 de abril de 2012</u> Fecha: <u>05 de marzo de 2012</u>		
8 Anexos ☒ Comprobante de pago de la tasa por \$590.000.oo ☒ Comprobante de pago por 43 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$1.290.000.oo ☒ Poderees, si fuere el caso ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas. ☒ Copia de la Solicitud Divisional.		

JMS

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No.06.077.165 . Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 04 de agosto de 2006 y la prioridad que allí se reivindica del 09 de enero de 2004.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 06.077.165.

CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

181

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseññas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTATION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

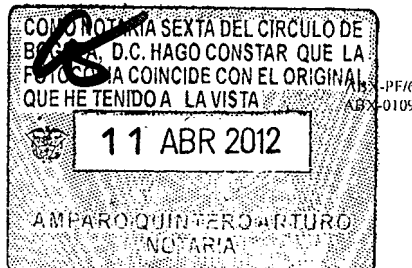
AMGEN FREMONT INC., a corporation organized and existing under the laws of the State of Delaware, U.S.A.
domiciliado (s) en/of 6701 Kaiser Drive, Fremont, California 94555, United States of America
National Phase of International Application No. PCT/US2005/000370

hereby ratify the Patent Application No. 06.077.165 filed by Emilio Ferrero on August 4, 2006.

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso. Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseññas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters

© CAVELIER ABOGADOS
WPP00E01-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)



CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 20 días del mes de OCTUBRE
de 2006 ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado
de California, EUA
Stuart L. Watt
a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo

Notario Público o Funcionario Autorizado -- Notary Public or Attesting Official

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this 20th day of October
2006 before me, a Notary Public or Attesting Official of
California, USA
personally appeared
Stuart L. Watt
to me known, and known to me to be the person(s) who
executed that foregoing document, and who has ~~(have)~~ legal
capacity to execute it.

Debra L. Merrill

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy 20 de OCTUBRE de 2006
Compareció(eron) ante mí
STUART WATT
quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este
documento en representación de la Sociedad/compañía
denominada AMGEN FREMONT INC.

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*
**CERTIFICADO DE FUSION & ACTAS DE
LA JUNTA DIRECTIVA DE AMGEN FREMONT INC.**

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:
2.1. Que AMGEN FREMONT INC.

es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente
de acuerdo con las leyes de
ESTADO DE DELAWARE

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
FREMONT, CALIFORNIA

2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente
poder están comprendidos dentro del objeto social de la
mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) STUART L. WATT
está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad THOUSANDS OAKS

Estado CALIFORNIA

Hoy 20 OCTUBRE de 2006

Notario Público o Funcionario Autorizado -- Notary Public or Attesting Official

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 20th day of October 2006
appeared before me
Stuart Watt
who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Corporation/Company named
AMGEN FREMONT INC.

I certify:

1. That I have seen the following documents:*
State of Delaware Certificate of Merger &
Minutes of Action of the Board of Directors of
Amgen Fremont Inc.
2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Amgen Fremont Inc.
is a Corporation/Company legally constituted and in existence
in accordance with the laws the State of Delaware

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is
State of California

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power
of Attorney is granted are comprised within the corporation
purposes set forth in the charter of the mentioned
Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) Stuart L. Watt
is ~~(are)~~ authorized to grant the present Power of Attorney.

City Thousand Oaks

State California

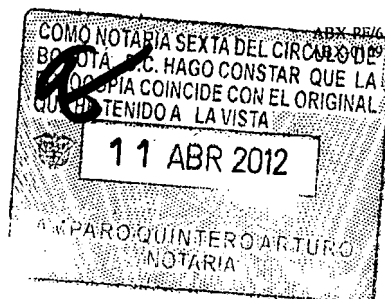
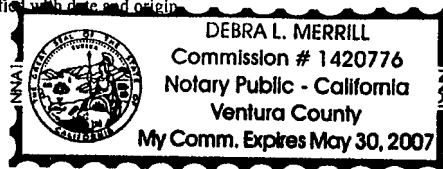
This 20th day of October 2006

Debra L. Merrill

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

© CAVELIER ABOGADOS
WPPODE01-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)

* Documents must be identified with date and origin



State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*
This public document
2. *has been signed by Debra L. Merrill*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Debra L. Merrill, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 9th day of November 2006*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 323785*
9. *Seal/Stamp:*



10. Signature



[Signature]

Secretary of State



BY *[Signature]*

promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

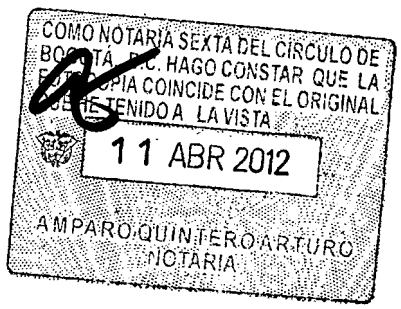
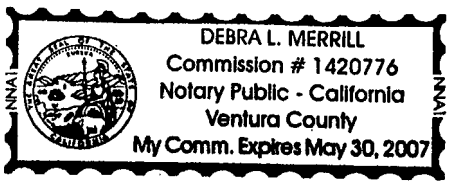
they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this October 20, 2006
en/in Thousand Oaks, California, U.S.A.
por/by Stuart Watt, Vice President, Law

Firma *Stuart L. Watt* Signature

Subscribed and sworn before me, *Debra L. Merrill*
a Notary Public, this 20th day of October, 2006

Debra L. Merrill
Notary Public



19 31/10

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 15/11.06 preparada por María Elvira Martelo, traductora oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante Resolución No. 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento escrito en inglés y español, por el cual **AMGEN FREMONT INC.**, una sociedad organizada y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, otorga poder a **EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y GERMÁN CAVELIER.**

Dado y firmado el 20 de octubre de 2006

Por: Stuart Watt, Vicepresidente Jurídico

Firma [Firmado] Stewart L. Watt.

Suscrito ante mí, Debra L. Merrill, Notario público, hoy 20 de octubre de 2006.

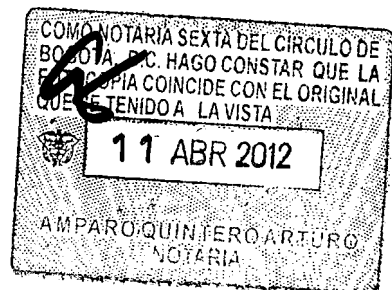
[Firmado] Debra L. Merrill

Notario público

DEBRA L MERRILL
Comisión # 1420776
Notario Público – California
Condado de Ventura
Mi comisión expira el 30 de mayo de 2007

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO) en inglés y español referente a la firma de **Stewart L. Watt.** Dado el 20 de octubre de 2006.

[Firmado] Debra L. Merrill, Notario Público.



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y español referente a la existencia legal de **Amgen Fremont Inc.** Dado en la Ciudad: Thousand Oaks
Estado: California
El 20 de octubre de 2006.

[Firmado] Debra L. Merrill, Notario Público.

 [Firmado] Debra L. Merrill
Notario público

DEBRA L MERRILL
Comisión # 1420776
Notario Público – California
Condado de Ventura
Mi comisión expira el 30 de mayo de 2007

ESTADO DE CALIFORNIA

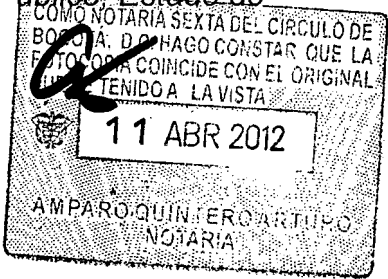
SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

- 1. País: *Estados Unidos de América*
Este documento público
- 2. *ha sido firmado por Debra L. Merrill*
- 3. *en su capacidad de Notario Público, Estado de California*
- 4. *lleva el sello/timbre de Debra L. Merrill, Notario Público, Estado de California*

CERTIFICADO



5. en Sacramento, California
6. el 9 de noviembre de 2006
7. por el Subsecretario de Estado, Estado de California
8. No. 323785
9. Sello/Timbre: EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA.
10. Firma (Firma ilegible), Secretario de Estado

Por: [Firma ilegible]

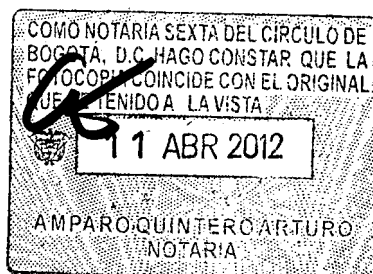
Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

COLO 10097-704-001-1

WPC 10097 - ID 10

OCT 23/06

Maria E. Martelo
 TRADUCCION No.: 15/1106
 MARIA ELVIRA MARTELO
 Traductora e Interprete Oficial
 Inglés - Español - Inglés
 Res. No. 2879 Min. Justicia



COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTA FE DE
 BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE
Walter Rivera
Walter Rivera
 COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
 EL(LOS) EN ESTA NOTARIA
 SANTA FE DE BOGOTA.
 21 NOV 2008
 CODE 4 JURS CIVIL



NO SE ASUME
 RESPONSABILIDAD POR EL TEXTO

2006 NOV 21 P 2:09

Ugo
 REGISTRO DE REALIZACIONES
 BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE
 RELACIONES EXTERIORES

527255
 Wang Balle
 OFICINA DE REGISTRO Y
 CONTROL DE DOCUMENTOS
 LAS FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
 BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA
 COPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
 TENIDO A LA VISTA
 11 ABR 2012
 AMPARO QUINTERO ARIZO
 NOTARIA

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

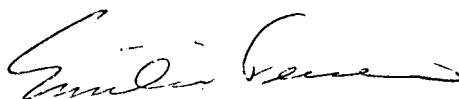
E. S. D.

Poderdante : AMGEN FREMONT INC

Poder conferido el : 20/10/2006

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

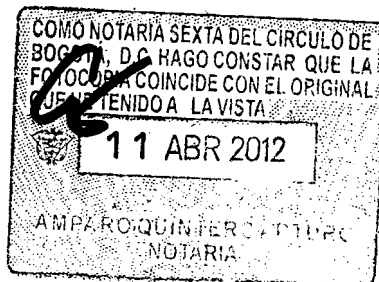
C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:


LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén



NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION
Bogotá, D.C. **03 NOV 2009**
Ante el
NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE
BOGOTÁ D.C.
Comparació (aron) *Enmilio F. Enríquez*
Luz Clementina de Paz.
Quien(es) exhibió(aron) la(s) C.C.
CC 438.019.747 31929
CC 35.456.344 10123.555
Y declaro(aron) que la(s) firma(s) que aparece(n)
en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
que el contenido del mismo es cierto.
En constancia se firma esta diligencia.

Enmilio F. Enríquez
Luz Clementina de Paz



Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTATION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

Pfizer Inc. a corporation organized and existing under the laws of the State of Delaware, United States of America

domiciliado (s) en/of 235 East 42nd Street, New York, New York 10017, United States of America

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation shall continue in their sequence, by the principal, the first or second alternate, depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law that they may obtain the protection of my (our) industrial property against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize in said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters

promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

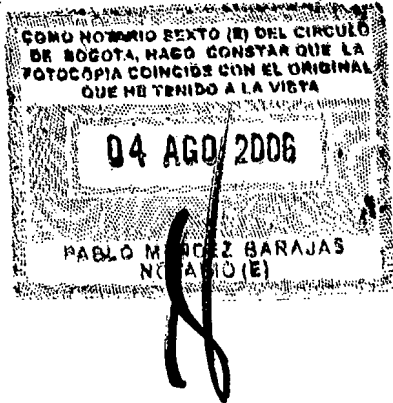
they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 24 day of June 2003
en/in New York, New York, U.S.A
por/by J. Trevor Lumb
Firma *J. Trevor Lumb* Signature

Subscribed and sworn before me, Rosalba Oliveri
a Notary Public, this 24th day of June, 2003.

Rosalba Oliveri
Notary Public

ROSALBA OLIVERI
Notary Public, State of New York
No. 0106085628
Qualified in Queens County
Certificate Filed In New York County
Commission Expires December 30, 2006



CLERK

Nº 344963 Form 1

State of New York
County of New York

I, NORMAN GOODMAN, County Clerk and Clerk of the Supreme Court of the State of New York, in and for the County of New York, a Court of Record, having by law a seal, DO HEREBY CERTIFY pursuant to the Executive Law of the State of New York, that

Rosaida Oliver

whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknowledgment or proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and for the State of New York duly commissioned, sworn and qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate of his official character, with his autograph signature has been filed in my office; that at the time of taking such proof, acknowledgment or oath, he was duly authorized to take the same; that I am well acquainted with the handwriting of such NOTARY PUBLIC or have compared the signature on the annexed instrument with his autograph signature deposited in my office, and I believe that such signature is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand affixed my official seal this

SEP 09 2003

FEE PAID \$3.00

Norman Goodman
County Clerk and Clerk of the Supreme Court, New York County

COMO NOTARIO BENTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
04 AGO 2006
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____
de 200__ ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado
de _____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo

Notario Público o Funcionario Autorizado -- Notary Public or Attesting Official _____

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy 24 de Junio de 200__ 3

Compareció(eron) ante mí

J. Trevor Lumb

quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este
documento en representación de la Sociedad/compañía
denominada Pfizer Inc.

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos: *
Pfizer Inc.

Certificado de Secretario Asistente

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que Pfizer Inc.

es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente
de acuerdo con las leyes de Delaware

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
235 East 42nd Street, New York N.Y. 10017
EEUU

2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente
poder están comprendidos dentro del objeto social de la
funcionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) J. Trevor Lumb

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad Nueva York

Estado Nueva York

Hoy 24 Junio de 200__ 3

Notario Público o Funcionario Autorizado -- Notary Public or Attesting Official _____

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

© CAVELIER ABOGADOS
WPPODE01-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____
2003 before me, a Notary Public or Attesting Official of _____

personally appeared _____

to me known, and known to me to be the person(s) who
executed that foregoing document, and who has(have) legal
capacity to execute it.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 24th day of June 2003
appeared before me

J. Trevor Lumb

who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Corporation/Company named _____
Pfizer Inc.

I certify:

1. That I have seen the following documents: *

Pfizer Inc.

Assistant Secretary's Certificate

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Pfizer Inc.

is a Corporation/Company legally constituted and in existence
in accordance with the laws of the State of Delaware

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is
235 East 42nd Street, New York, New York 10017, U.S.A.

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power
of Attorney is granted are comprised within the corporation
purposes set forth in the charter of the corporation. **COMO NO HAYO SEXTO (6) DEL CIRCULO**
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

2.4. That Mr.(Messrs.) _____

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney

City New York

State New York

This 24th day of June 200__ 3

* Documents must be identified with date and origin

ROSALBA OLIVERI
Notary Public, State of New York
No. 0106085628
Qualified in Queens County
Certificate Filed in New York County
Commission Expires December 30, 2006

Rosalba Oliveri

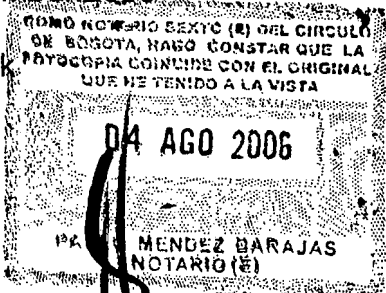
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

- 1. Country: **United States of America**
This public document
- 2. has been signed by **Norman Goodman**
- 3. acting in the capacity of **County Clerk**
- 4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

- 5. At New York, New York
- 6. the 09th day of September 2003
- 7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
- 8. No. NYC-10083598B
- 9. Seal/Stamp
- 10. Signature



James Bizzarri

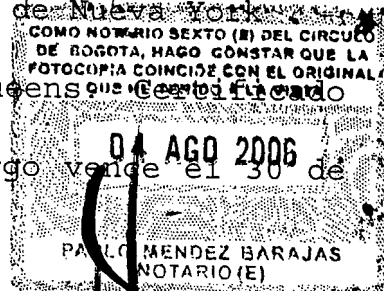
James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State

TRADUCCIÓN OFICIAL 136/2003 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL, REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL APROBADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA Y MEDIANTE EL CUAL **PFIZER INC.**, EMPRESA DOMICILIADA EN 235 EAST 42ND STREET, NEW YORK, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA OTORGA PODER A EMILIO FERRERO, TPA 31929, GONZALO PERDOMO, TPA 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ TPA 23555 Y A GERMÁN CAVELIER, TPA 832. EXPEDIDO Y FIRMADO HOY 24 DE JUNIO DE 2003 EN NUEVA YORK, NUEVA YORK, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. FIRMADO: J. TREVOR LUMB.

FIRMADO Y JURAMENTADO ANTE MI ROSALBA LIVERI, NOTARIO PÚBLICO, HOY 14 DE JUNIO DE 2003.

Firmado: Rosalba Oliveri, notario público

Sello: ROSALBA OLIVERI, notario público, estado de Nueva York, No. 010L6085628, Calificada en el condado Queens, presentado en el Condado de Nueva York. Mi cargo vence el 30 de diciembre de 2006.



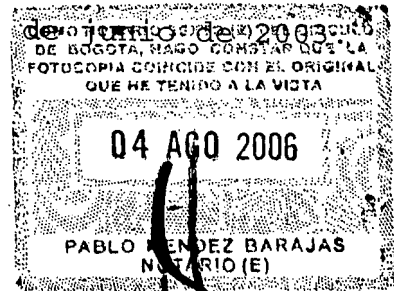
Estado de Nueva York, condado de Nueva York. Declaración juramentada. 182832

Yo, Norman Goodman, escribano del condado y de la corte suprema del estado de Nueva York, en y para el condado de Nueva York, un tribunal de registro que por ley posee un sello, por la presente certifico que de acuerdo con la Ley ejecutiva del estado de Nueva York, ROSALBA OLIVERI, cuyo nombre aparece firmado en la declaración jurada, certificado de reconocimiento o prueba

adjuntos, era al momento de tomar la misma un notario público para el estado de Nueva York, debidamente nombrado, juramentado y calificado para actuar como tal; que de acuerdo con la ley, un nombramiento o certificado de su carácter oficial, junto con su firma autógrafa se han radicado en mi oficina; que al momento de tomar dicha prueba, reconocimiento o juramento, el estaba debidamente autorizado para tomar la misma; que conozco bien la caligrafía de dicho notario público o que he comparado la firma en el documento adjunto con su firma autógrafa depositada en mi oficina, y que creo que dicha firma es genuina.

En testimonio de lo anterior, he firmado y fijado mi sello hoy 9 de septiembre de 2003. Firmado: Norman Goodman

CERTIFICADO NOTARIAL EN INGLES Y EN ESPAÑOL, DE FECHA 24 DE JUNIO DE 2003 POR EL CUAL SE CERTIFICA LA COMPARECENCIA DE J. TREVOR LUMB PARA FIRMAR EL PODER ARRIBA CITADO A NOMBRE DE PFIZER INC. Y PARA CERTIFICAR LA EXISTENCIA LEGAL, EL DOMICILIO DE DICHA EMPRESA Y LA CAPACIDAD DE J. TREVOR LUMB PARA COMPROMETER A DICHA FIRMA. Nueva York, estado de Nueva York, 24 de junio de 2003



APOSTILLA:

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por NORMAN GOODMAN

3. quien actúa en su calidad de SECRETARIO DEL CONDADO

4. lleva el sello del condado de NUEVA YORK

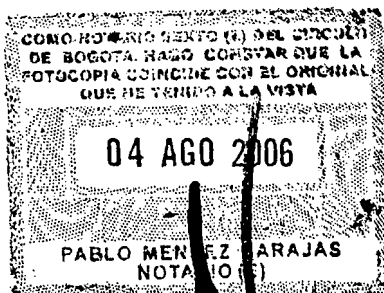
CERTIFICADO

5. en NUEVA YORK, NUEVA YORK
 6. el 9 DE SEPTIEMBRE DE 2003
 7. por el Secretario de estado especial suplente, estado de Nueva York
 8. Número NYC-10083598B
 9. Sello:

(DATO EN BLANCO)
 10. Firma: JAMES BIZZARRI, secretario de estado especial suplente.
- COLO-13857-841-001-9
- WPCL002G. ID 4869
- Bogotá, 24 de septiembre de 2003.

Eduardo Calado

Eduardo Calado Noguera
 TRADUCTOR OFICIAL
 INGLES - ESPAÑOL - INGLÉS
 Res. 541 Febrero de 1994



MINISTERIO DE RELACIONES
 EXTERIORES
 483701
 EDUARDO CALADO
 COPIA PARA APOYO DEL
 DOCUMENTO DE SENSITIVA
 LAS FUNCIONES INICIADAS

NO SE ASUME
 RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
 2003 SEP 25 A 11:56
 JEFE DE LEGALIZACIONES
 SECRETARÍA DE BOGOTÁ, D.C.

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : PFIZER INC

Poder conferido el : 24/06/2003

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.


EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:


LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

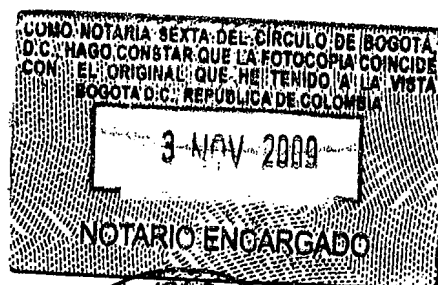
T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén



NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
 Bogotá, D.C.
 Ante el **03 NOV 2009**
NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C.
 Compareció (eron) *Quinto Ferrero*
María Clemencia de Paet
 Quien(es) exhibió(aron) la(s) C.C.
CC 438.019.143
CC 354.503.344 *3.555*
 Y declaró(aron) que la(s) firma(s) que aparece(n)
 en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
 que el contenido del mismo es cierto.
 En constancia se firma esta diligencia.

Emili Ferrero
María Clemencia de Paet



ABX-PF6

ANTICUERPOS CONTRA MAdCAM

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] La molécula de adhesión celular de adresina mucosal (MAdCAM) es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas de receptores de adhesión celular. La selectividad de linfocitos que se dirigen a un tejido linfoide especializado y a sitios mucosales del tracto gastrointestinal está determinada por la expresión endotelial de MAdCAM (Berlin, C. et al., *Cell*, 80:413-422 (1994); Berlin, C., et al., *Cell*, 74:185-195 (1993); y Erle, D.J., et al., *J. Immunol.*, 153: 517-528 (1994)). MAdCAM es expresado exclusivamente sobre la superficie celular de vénulas endoteliales altas de tejido linfoide intestinal organizado, tales como los parches de Peyer y nodos linfáticos mesentéricos (Streeter *et al*, *Nature*. 331:41-6 (1988); Nakache et al., *Nature*, 337:179-81 (1989); Briskin et al. , *Am. J. Pathol.* 151-97-110 (1997)), pero también en otros órganos linfoides, tales como páncreas, vesícula biliar y vénulas esplénicas y el seno marginal de la pulpa blanca del bazo (Briskin et al. (1997), *supra*; Kraal et al. , *Am. J. Path.*, 147: 763-771 (1995)).

[0002] Mientras que MAdCAM juega un rol fisiológico en la vigilancia de la inmunidad del intestino, parece facilitar una extravasación excesiva de linfocitos en la enfermedad inflamatoria del intestino bajo condiciones de inflamación crónica del tracto intestinal. TNF α y otras citoquinas pro-inflamatorias aumentan la expresión de MAdCAM endotelial y, en muestras de biopsia sacadas de pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, hay un aumento focal de aproximadamente 2-3 veces de la expresión de MAdCAM en los sitios de inflamación (Briskin et al. (1997), Souza et al., *Gut*, 45:856-63 (1999); Arihiro et al., *Pathol Int.*, 52:367-74 (2002)). En modelos experimentales de colitis se observaron pautas similares de expresión elevada (Hesterberg et al. , *Gastroenterology*, 111:1373-1380 (1997); Picarella et al., *J. Immunol.*, 158: 2099-2106 (1997); Connor et al., *J Leukoc Biol.*, 65:349-55 (1999); Kato et al. , *J Pharmacol Exp Ther.*, 295:183-9 (2000); Hokari et al. , *Clin Exp Immunol.*, 26:259-65 (2001); Shigematsu et al., *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 281:G1309-15 (2001)). En otros modelos preclínicos de condiciones inflamatorias, tales como diabetes insulina-dependiente (Yang et al. *Diabetes*, 46:1542-7 (1997); Hänninen et al., *J Immunol.*, 160:6018-25 (1998)), enfermedad de injerto versus hospedante (Fujisaki et al., *Scand J Gastroenterol.*, 38:437-42 (2003), Murai et al. , *Nat Immunol.*, 4:154-60 (2003)), enfermedad hepática crónica (Hillan et al., *Liver*, 19:509-18 (1999); Grant et al., *Hepatology*, 33:1065-72 (2001)), encefalopatía inflamatoria (Stalder et al., *Am J Pathol.*, 153:767-83 (1998); Kanawar

et al. , *Immunol Cell Biol.*, 78:641-5 (2000)), y gastritis (Barrett et al. , *J Leukoc Biol.*, 67:169-73 (2000); Hatanaka et al., *Clin Exp Immunol.*, 130:183-9 (2002)), también hay un despertar de la expresión de MAdCAM fetal y una participación de linfocitos $\alpha_4\beta_7^+$ activados en la patogénesis de la enfermedad. En estos modelos de inflamación, tanto como los modelos de colitis de ratón mediada por hapteno (por ejemplo, TNBS, DSS, etc.) o por transferencia adoptiva ($CD4^+CD45Rb^{altas}$), el anticuerpo monoclonal (mAb) MAdCAM anti-ratón de rata, MECA-367, que bloquea la ligadura de los linfocitos $\alpha_4\beta_7^+$ a MAdCAM, reduce el reclutamiento de linfocitos, la extravasación al tejido, la inflamación y la severidad de la enfermedad. También se ha informado sobre anticuerpos monoclonales (mAbs) de ratón contra MAdCAM humano (vea, *por ejemplo*, WO 96/24673 y WO 99/58573).

[0003] Dado el rol de MAdCAM en la enfermedad inflamatoria del intestino (inflammatory bowel disease = IBD) y otras enfermedades inflamatorias asociadas con el tracto gastrointestinal u otros tejidos, es deseable proveer un medio para inhibir la ligadura de $\alpha_4\beta_7$ y el reclutamiento de leucocitos mediado por MAdCAM. Sería además deseable que tales medios terapéuticos tengan propiedades ventajosas incluyendo, pero no estando limitadas a, la ausencia de interacciones no deseadas con otras medicaciones en pacientes y propiedades físico-químicas favorables tales como valores pK/pD en humanos, solubilidad, estabilidad, vida de estante y vida media *in vivo*. Una proteína terapéutica, tal como un anticuerpo, estaría ventajosamente libre de modificaciones no deseadas después de la traducción o formación de agregados. Por lo tanto, existe una necesidad crítica por anticuerpos terapéuticos anti-MAdCAM.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0004] La presente invención provee un anticuerpo aislado que liga específicamente MAdCAM, donde al menos las secuencias CDR (secuencias de la región determinante complementaria) de dicho anticuerpo son secuencias CDR humanas, o a una porción que liga antígeno de dicho anticuerpo. En algunas realizaciones el anticuerpo es un anticuerpo humano, preferentemente un anticuerpo que actúa como un antagonista de MAdCAM. También se proveen composiciones que comprenden dichos anticuerpos o porciones.

[0005] La invención también provee una composición que comprende la cadena pesada y/o liviana de dicho anticuerpo antagonista anti-MAdCAM o la región variable u otra porción que liga antígeno del mismo o moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las precedentes y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones de la invención pueden comprender además otro componente, tal

como un agente terapéutico o un agente diagnóstico. La invención también provee métodos diagnósticos y terapéuticos.

[0006] La invención provee además una línea celular aislada, que produce dicho anticuerpo anti-MAdCAM o una porción que liga antígeno del mismo.

[0007] La invención también provee moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada y/o liviana de dicho anticuerpo anti-MAdCAM o la región variable del mismo o la porción que liga antígeno del mismo.

[0008] La invención provee vectores y células hospedantes que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico, como así también métodos para producir recombinantemente los polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico.

[0009] También se proveen animales o plantas transgénicos no humanos que expresan la cadena pesada y/o liviana de dicho anticuerpo anti-MAdCAM, o la porción que liga antígeno del mismo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0010] La Figura 1 es una alineación de las secuencias de aminoácidos previstas de las regiones variables de la cadena pesada y liviana kappa de doce anticuerpos monoclonales anti-MAdCAM con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal de los genes humanos correspondientes.

[0011] La Figura 1A muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada para los anticuerpos 1.7.2 y 1.8.2 (residuos 20-138 de SEQ ID NOS: 2 y 6, respectivamente) con el producto génico VH 3-15 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 113).

[0012] La Figura 1B muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada para el anticuerpo 6.14.2 (residuos 20-141 de SEQ ID NO: 10) con el producto génico VH 3-23 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 114).

[0013] La Figura 1C muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada para el anticuerpo 6.22.2 (residuos 20-139 de SEQ ID NO: 14) con el producto génico VH 3-33 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 115).

[0014] La Figura 1D muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada para el anticuerpo 6.34.2 (residuos 20-143 de SEQ ID NO: 18) con el producto génico VH 3-30 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 116).

[0015] La Figura 1E muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada para el anticuerpo 6.67.1 (residuos 20-144 de SEQ ID NO: 22) con el producto génico VH 4-4 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 117).

[0016] La Figura 1F muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada para el anticuerpo 6.73.2 (residuos 20-145 de SEQ ID NO: 26) con el producto génico VH 3-23 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 118).

[0017] La Figura 1G muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada para el anticuerpo 6.77.1 (residuos 20-146 de SEQ ID NO: 30) con el producto génico VH 3-21 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 119).

[0018] La Figura 1H muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada para los anticuerpos 7.16.6 y 7.26.4 (residuos 20-144 de SEQ ID NOS: 34 y 42, respectivamente) con el producto génico VH 1-18 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 120).

[0019] La Figura 1I muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada para el anticuerpo 7.20.5 (residuos 20-146 de SEQ ID NO: 38) con el producto génico VH 4-4 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 121).

[0020] La Figura 1J muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada para el anticuerpo 9.8.2 (residuos 20-136 de SEQ ID NO: 46) con el producto génico VH 3-33 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 122).

[0021] La Figura 1K muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena liviana kappa para los anticuerpos 1.7.2 y 1.8.2 (residuos 21-132 de SEQ ID NOS: 4 y 8, respectivamente) con el producto génico A3 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 123).

[0022] La Figura 1L muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena liviana kappa para el anticuerpo 6.14.2 (residuos 23-130 de SEQ ID NO: 12) con el producto génico O12 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 124).

[0023] La Figura 1M muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena liviana kappa para el anticuerpo 6.22.2 (residuos 20-127 de SEQ ID NO: 16) con el producto génico A26 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 125).

[0024] La Figura 1N muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena liviana kappa para el anticuerpo 6.34.2 (residuos 23-130 de SEQ ID NO: 20) con el producto génico O12 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 126).

[0025] La Figura 1O muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena liviana kappa para el anticuerpo 6.67.1 (residuos 21-135 de SEQ ID NO: 24) con el producto génico B3 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 127).

[0026] La Figura 1P muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena liviana kappa para el anticuerpo 6.73.2 (residuos 23-132 de SEQ ID NO: 28) con el producto génico O12 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 128).

[0027] La Figura 1Q muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena liviana kappa para el anticuerpo 6.77.1 (residuos 21-133 de SEQ ID NO: 32) con el producto génico A2 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 129).

[0028] La Figura 1R muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena liviana kappa para los anticuerpos 7.16.6 y 7.26.4 (residuos 21-133 de SEQ ID NOS: 36 y 44, respectivamente) con el producto génico A2 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 130).

[0029] La Figura 1S muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena liviana kappa para el anticuerpo 7.20.5 (residuos 21-132 de SEQ ID NO: 40) con el producto génico A3 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 131).

[0030] La Figura 1T muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena liviana kappa para el anticuerpo 9.8.2 (residuos 25-132 de SEQ ID NO: 48) con el producto génico O18 humano de la línea germinal (SEQ ID NO: 132).

[0031] La Figura 2 muestra alineaciones CLUSTAL de las secuencias de aminoácidos previstas de la cadena pesada y liviana kappa de anticuerpos anti-MAdCAM humanos.

[0032] La Figura 2A muestra una alineación CLUSTAL (residuos 1-132 de SEQ ID NOS: 4, 8 y 40, residuos 1-133 de SEQ ID NOS: 36, 44 y 32, residuos 1-135 de SEQ ID NO: 24, residuos 1-130 de SEQ ID NO: 20, residuos 1-132 de SEQ ID NO: 28, residuos 1-130 de SEQ ID NO: 12, residuos 1-132 de SEQ ID NO: 48 y residuos 1-127 de SEQ ID NO: 16, todos respectivamente en orden de aparición) y el árbol de ramificaciones de las secuencias de aminoácidos previstas de las cadenas livianas kappa, mostrando el grado de similitud entre las cadenas livianas kappa de los anticuerpos anti-MAdCAM.

[0033] La Figura 2B muestra una alineación CLUSTAL (residuos 20-144 de SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 133, residuos 20-138 de SEQ ID NOS: 4 y 6, residuos 20-122 de SEQ ID NO: 10, residuos 20-145 de SEQ ID NO: 26, residuos 20-146 de SEQ ID NO: 30, residuos 20-139 de SEQ ID NO: 14, residuos 20-143 de SEQ ID NO: 18, residuos 20-136 de SEQ ID NO: 46, residuos 20-146 de SEQ ID NO: 38 y residuos 20-144 de SEQ ID NO: 22) y el árbol de ramificaciones de las secuencias de aminoácidos pesadas previstas, mostrando el grado de similitud entre las cadenas pesadas de los anticuerpos anti-MAdCAM.

[0034]

[0035] La Figura 3 es una alineación CLUSTAL de secuencias de aminoácidos de los dominios terminales 2 N de MAdCAM cynomolgus (SEQ ID NO: 50) y humano (residuos 1-225 de SEQ ID NO: 107) que forman el dominio que liga $\alpha_4\beta_7$. Las cadenas β están alineadas de acuerdo con Tan et al., Structure (1998) 6, 793-801.

[0036] La Figura 4 es un gráfico que representa los efectos de varias dosis de 1.7.2 y 7.16.6 biotinilados purificados sobre la adhesión de linfocitos de sangre periférica humana a secciones congeladas del endotelio del hígado humano que expresa MAdCAM.

[0037] La Figura 5 muestra una representación gráfica bidimensional, basada en los datos de la Tabla 7, de la diversidad de los epítopes MAdCAM a los cuales se ligan los anticuerpos MAdCAM 1.7.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2. Los anticuerpos anti-MAdCAM dentro del mismo círculo muestran el mismo modelo de reactividad, pertenecen al mismo grupo de epítopes y reconocen probablemente el mismo epítipo sobre MAdCAM. Clones de anticuerpos anti-MAdCAM con círculos superpuestos son incapaces de ligarse simultáneamente y, por lo tanto, probablemente reconocen un epítipo solapado sobre MAdCAM. Círculos separados representan clones de anticuerpos anti-MAdCAM con una separación espacial nítida de los epítopes.

[0038] La Figura 6 muestra datos del análisis sandwich ELISA con los anticuerpos anti-MAdCAM 1.7.2 y 7.16.6 marcado con Alexa 488, mostrando que los dos anticuerpos que son capaces de detectar diferentes epítopes sobre MAdCAM pueden usarse para detectar MAdCAM soluble con fines diagnósticos.

[0039] La Figura 7 muestra el efecto de un anticuerpo anti-MAdCAM inhibitorio (1 mg/kg) sobre el número de linfocitos $\alpha_4\beta_7^+$ periféricos circulantes, expresado como el aumento (las veces que aumentó el número de linfocitos) con respecto al efecto de un anticuerpo monoclonal (mAb) IgG2a o un vehículo de control, usando mAb anti-MAdCAM 7.16.6 en un modelo de mono cynomolgus.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones y técnicas generales

[0040] Salvo que se indique lo contrario, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención tendrán los significados entendidos comúnmente por los entendidos en el arte. Además, siempre que el contexto no requiera lo contrario, los términos en singular deben incluir el plural y los términos en plural deben incluir el singular. Generalmente, las nomenclaturas usadas en conexión con, y las técnicas de, cultivos celulares y de tejido, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en ésta son aquellas bien conocidas y usadas comúnmente en el arte. Los métodos y las técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en el arte y según lo descrito en varias referencias generales y más específicas que son citadas y discutidas en la presente

memoria descriptiva, siempre que no sea indicado de otro modo. Vea, *por ejemplo*, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd 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), que son incorporados en ésta por referencia. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, según lo realizado comúnmente en el arte o de acuerdo con lo descrito en ésta. Se usan técnicas estándar para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes.

[0041] Los términos siguientes, salvo indicación en contrario, deben entenderse con los significados siguientes:

[0042] El término “polipéptido” comprende proteínas naturales o artificiales, fragmentos proteicos y análogos polipeptídicos de una secuencia proteica. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

[0043] El término “proteína aislada” o “polipéptido aislado” significa una proteína o polipéptido que en virtud de su origen o fuente de derivación (1) no está asociado con componentes naturalmente asociados que lo acompañan en su estado natural, (2) está libre de otras proteínas de la misma especie, (3) es expresado por una célula de una especie diferente o (4) no se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que es sintetizado químicamente o sintetizado en un sistema celular diferente de la célula en la cual se origina naturalmente estará “aislado” de los componentes con los que está asociado naturalmente. Una proteína también puede convertirse en una proteína substancialmente libre de componentes con los cuales está asociada naturalmente mediante una aislación, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en el arte.

[0044] Una proteína o polipéptido es “substancialmente puro”, “substancialmente homogéneo” o “substancialmente purificado” cuando al menos aproximadamente 60 a 75% de una muestra exhibe una sola especie de polipéptido. El polipéptido o proteína puede ser monomérico o multimérico. Un polipéptido o proteína substancialmente puro comprenderá típicamente aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80% o 90% p/p de una muestra proteica, más usualmente aproximadamente 95%, y preferentemente tendrá una pureza mayor de 99%. La pureza u homogeneidad de la proteína puede ser indicada por un número de medios bien conocidos en el arte, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguida por la visualización de una sola banda polipeptídica al colorear el gel con un colorante bien conocido en el

arte. Para ciertos propósitos, puede proveerse una resolución mayor usando HPLC u otros medios de purificación bien conocidos en el arte.

[0045] El término “fragmento polipeptídico”, según lo usado en ésta, se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino-terminal y/o carboxi-terminal, pero cuya secuencia de aminoácidos remanente es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia de ocurrencia natural. En algunas realizaciones, los fragmentos tienen una longitud de al menos 5, 6, 8 ó 10 aminoácidos. En otras realizaciones, los fragmentos tienen una longitud de al menos 14 aminoácidos, más preferentemente de al menos 20 aminoácidos, usualmente de al menos 50 aminoácidos, aún más preferentemente de al menos 70, 80, 90, 100, 150 ó 200 aminoácidos.

[0046] El término “análogo polipeptídico”, según lo usado en ésta, se refiere a un polipéptido que comprende un segmento de al menos 25 aminoácidos que es substancialmente idéntico a una porción de una secuencia de aminoácidos y que tiene al menos una de las propiedades siguientes: (1) ligadura específica a MAdCAM bajo condiciones de ligadura adecuadas, (2) capacidad para inhibir la ligadura de la integrina $\alpha_4\beta_7$ y/o la selectina L a MAdCAM, o (3) la capacidad de reducir *in vitro* o *in vivo* la expresión de MAdCAM en la superficie celular. Típicamente, los análogos polipeptídicos comprenden una sustitución (o inserción o delección) de aminoácidos conservativos con respecto a la secuencia que ocurre naturalmente. Análogos tienen típicamente una longitud de al menos 20 aminoácidos, preferentemente al menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 ó 200 aminoácidos o mayor, y muchas veces pueden tener la longitud del polipéptido de longitud completa que ocurre naturalmente.

[0047] Substituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a oxidación, (3) modifican la afinidad de ligadura para formar complejos proteicos, (4) modifican afinidades de ligadura, o (5) confieren o modifican otras propiedades físicoquímicas o funcionales de tales análogos. Los análogos pueden incluir varias mutaciones de una secuencia diferente a la secuencia peptídica que ocurre normalmente. Por ejemplo, en la secuencia que ocurre normalmente pueden realizarse substituciones simples o múltiples de aminoácidos, preferentemente substituciones con aminoácidos conservativos, preferentemente en la porción del polipéptido fuera del dominio (de los dominios) que forma(n) contactos intermoleculares. Una substitución con un aminoácido conservativo no debería modificar substancialmente las características estructurales de la secuencia parental (*por ejemplo*, un aminoácido de reemplazo no debería tender a romper una hélice que existe en la secuencia parental, o romper otros tipos de estructura secundaria que caracteriza la secuencia parental). Ejemplos de estructuras polipeptídicas secundarias y terciarias reconocidas por el arte se describen

en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman y Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); y Thornton et al., *Nature* 354:105 (1991), que son incorporados cada uno en ésta por referencia.

[0048] Análogos no peptídicos son usados comúnmente en la industria farmacéutica como drogas con propiedades análogas a aquellas del péptido molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se llaman “miméticos peptídicos” o “peptidomiméticos”. 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), que son incorporados en ésta por referencia. Tales compuestos son desarrollados muchas veces con la ayuda de un modelaje molecular computarizado. Los peptidomiméticos estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica deseada), tal como un anticuerpo humano, pero tiene uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace tal como: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, y $-\text{CH}_2\text{SO}-$, por métodos bien conocidos en el arte. También puede usarse la substitución 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), para generar péptidos más estables. Además, péptidos minimizados (constrained peptides) que comprenden una secuencia de consenso o una variación de secuencia de consenso sustancialmente idéntica pueden ser generados por métodos conocidos en el arte (Rizo y Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992), incorporado en ésta por referencia); por ejemplo, agregando residuos internos de cisteína capaces de formar puentes intramoleculares de disulfuro que ciclizan el péptido.

[0049] Una “inmunoglobulina” es una molécula tetramérica. En una inmunoglobulina que ocurre naturalmente, cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena “liviana” (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena “pesada” (de aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, primariamente responsable por el reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante, primariamente responsable por la función efectora. Las cadenas livianas humanas son clasificadas como cadenas livianas κ y λ . Las cadenas pesadas son clasificadas como μ , δ , γ , α , o ϵ , y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas livianas y pesadas, las

regiones variables y constantes están unidas por una región “J” de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región “D” de aproximadamente 10 o más aminoácidos. Vea en general, *Fundamental Immunology*, Capítulo 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (incorporado por referencia en su totalidad para todos los propósitos). Las regiones variables de cada par de cadenas liviana/pesada forman el sitio de ligadura del anticuerpo, de modo que una inmunoglobulina intacta tiene dos sitios de ligadura.

[0050] Las cadenas de inmunoglobulina exhiben la misma estructura general de regiones framework (FR) relativamente conservativas unidas mediante tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes complementarias o CDRs. Las CDRs de las dos cadenas de cada par están alineadas mediante las regiones framework para formar un sitio de ligadura epítipo-específico. Desde el terminal N hasta el terminal C, tanto las cadenas livianas 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, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989), cada uno de los cuales es incorporado en ésta por referencia en su totalidad.

[0051] Un “anticuerpo” se refiere a una inmunoglobulina intacta o una porción que liga antígeno de la misma que compete con el anticuerpo intacto por ligadura específica. En algunas realizaciones, un anticuerpo es una porción que liga antígeno de la misma. Pueden producirse porciones que ligan antígeno mediante técnicas de DNA recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Las porciones que ligan antígeno incluyen, *inter alia*, fragmentos Fab, Fab, F(ab)₂, Fv, dAb y fragmentos de regiones determinantes complementarias (CDR), anticuerpos de cadena simple (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir al polipéptido ligadura a un antígeno específico. Un fragmento Fab es un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab)₂ es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados mediante un puente de disulfuro a la región bisagra; un fragmento Fd consiste de los dominios VH y CH1; un fragmento Fv consiste de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; y un fragmento dAb (Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989) consiste de un dominio VH.

[0052] Según lo usado en ésta, un anticuerpo al cual se hace referencia como, por ejemplo, 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.2, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 ó 9.8.2, es un

anticuerpo monoclonal que se produce mediante el hibridoma del mismo nombre. Por ejemplo, el anticuerpo 1.7.2 se produce mediante el hibridoma 1.7.2. Un anticuerpo al cual se hace referencia como 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod es un anticuerpo monoclonal cuya secuencia se modificó a partir de su anticuerpo parental correspondiente mediante mutagénesis dirigida a un sitio.

[0053] Un anticuerpo de una sola cadena (scFv) es un anticuerpo en el cual las regiones VL y VH están emparejadas para formar una molécula monovalente vía un engarce sintético que posibilita que las regiones formen una sola cadena proteica (Bird et al., *Science* 242:423-426, (1988) y Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883, (1988)). Diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los cuales los dominios VH y VL se expresan sobre una sola cadena polipeptídica, pero usando un engarce demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena, forzando de este modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de ligadura de antígeno (vea, por ejemplo, Holliger, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) y Poljak, R. J., et al., *Structure*, 2:1121-1123 (1994)). Una o más CDRs de un anticuerpo de la invención pueden ser incorporadas en una molécula, ya sea covalentemente o no covalentemente, para trasformarla en una inmunoadhesina que se liga específicamente a MAdCAM. Una inmunoadhesina puede incorporar la(s) CDR(s) como parte de una cadena polipeptídica más larga, puede ligar la(s) CDR(s) covalentemente a otra cadena polipeptídica o puede incorporar la(s) CDR(s) no covalentemente. Las CDRs permiten que la inmunoadhesina se ligue específicamente a un antígeno particular de interés.

[0054] Un anticuerpo puede tener uno o más sitios de ligadura. Si existen más de un sitio de ligadura, los sitios de ligadura pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina que ocurre naturalmente tiene dos sitios de ligadura idénticos, un anticuerpo de cadena simple o fragmento Fab tiene un sitio de ligadura, mientras que un anticuerpo “biespecífico” o “bifuncional” (diacuerpo) tiene dos sitios de ligadura diferentes.

[0055] Un “anticuerpo aislado” es un anticuerpo que (1) no está asociado con componentes naturalmente asociados, incluyendo otros anticuerpos naturalmente asociados, que lo acompañan en su estado natural, (2) está libre de otras proteínas de la misma especie, (3) es expresado por una célula de una especie diferente, o (4) no ocurre en la naturaleza. Ejemplos de anticuerpos aislados incluyen un anticuerpo anti-MAdCAM que ha sido purificado por afinidad usando MAdCAM, un anticuerpo anti-MAdCAM que ha sido producido *in vitro* mediante un hibridoma u otra línea celular y un anticuerpo anti-MAdCAM humano derivado de un mamífero o planta transgénico.

[0056] Según lo usado en ésta, el término “anticuerpo humano” significa un anticuerpo en el cual las secuencias de la región variable y constante son secuencias humanas. El término comprende anticuerpos con secuencias derivadas de genes humanos, pero que han sido cambiadas, por ejemplo, para disminuir inmunogenicidad posible, aumentar afinidad, eliminar cisteínas o sitios de glicosilación que podrían causar un plegado indeseable, etc. El término comprende tales anticuerpos producidos recombinantemente en células no humanas, que podrían impartir glicosilación no típica de células humanas. El término también comprende anticuerpos que han sido cultivados en un ratón transgénico que comprende algunos o todos los loci de las cadenas pesadas y livianas de la inmunoglobulina humana.

[0057] En un aspecto, la invención provee un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo que se deriva de una especie no humana, en la cual ciertos aminoácidos en el framework y los dominios constantes de las cadenas pesadas y livianas han sido mutados de modo de evitar o anular la respuesta inmune en humanos. En algunas realizaciones, puede producirse un anticuerpo humanizado fusionando los dominios constantes de un anticuerpo humano con los dominios variables de una especie no humana. Ejemplos de como producir anticuerpos humanizados pueden encontrarse en las patentes U.S. Nos. 6.054.297, 5.886.152 y 5.877.293. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-MAdCAM humanizado de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de una o más regiones framework de uno o más anticuerpos anti-MAdCAM humanos de la invención.

[0058] En otro aspecto, la invención incluye un “anticuerpo quimérico”. En algunas realizaciones, el 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 diferentes. En una realización preferida, una o más de las CDRs se derivan de un anticuerpo anti-MAdCAM humano de la invención. En una realización más preferida, todas las CDRs se derivan de un anticuerpo anti-MAdCAM humano de la invención. En otra realización preferida, las CDRs de más de un anticuerpo anti-MAdCAM humano de la invención se mezclan y unen para formar un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender una CDR1 de la cadena liviana de un primer anticuerpo anti-MAdCAM humano que puede combinarse con la CDR2 y CDR3 de la cadena liviana de un segundo anticuerpo anti-MAdCAM humano, y las CDRs de la cadena pesada pueden estar derivadas de un tercer anticuerpo anti-MAdCAM. Además, las regiones framework pueden derivarse de uno de los mismos anticuerpos anti-MAdCAM, de uno o más anticuerpos diferentes, tal como un anticuerpo humano, o de un anticuerpo humanizado.

[0059] Un “anticuerpo neutralizante”, “un anticuerpo inhibitorio” o anticuerpo antagonista es un anticuerpo que inhibe la ligadura de $\alpha_4\beta_7$ o células que expresan $\alpha_4\beta_7$, o cualquier otro ligando análogo o células que expresan un ligando análogo, a MAdCAM en al menos aproximadamente 20%. En una realización preferida, el anticuerpo reduce la inhibición de la ligadura de integrina $\alpha_4\beta_7$ o células que expresan $\alpha_4\beta_7$ a MAdCAM en al menos 40%, más preferentemente en 60%, aún más preferentemente en 80%, 85%, 90%, 95% ó 100%. La reducción de la ligadura puede medirse mediante cualquier medio conocido por un entendido en el arte, por ejemplo, mediante un ensayo de ligadura competitiva *in vitro*. Un ejemplo de la medición de la reducción de la ligadura de células que expresan $\alpha_4\beta_7$ a MAdCAM se presenta en el Ejemplo I.

[0060] Los fragmentos o análogos de anticuerpos pueden prepararse fácilmente por los entendidos en el arte siguiendo las enseñanzas de esta memoria descriptiva. Los terminales amino y carboxi preferidos de fragmentos o análogos se encuentran cerca de los límites de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales pueden identificarse mediante la comparación de los datos de las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos con los datos de bases de datos de secuencias públicas o privadas. Preferentemente, se usan métodos de comparación computarizados para identificar motivos secuenciales o dominios previstos de conformación proteica que se encuentran en otras proteínas de estructura y/o función conocida. Se conocen métodos para identificar secuencias proteicas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida (Bowie et al., *Science*, 253:164 (1991)).

[0061] El término “resonancia en la superficie de un plasmon” (surface plasmon resonance), según lo usado en ésta, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones de concentraciones proteicas dentro de una matriz biosensora, por ejemplo, usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.). Para descripciones adicionales, vea Jonsson, U., et al., *Ann. Biol. Clin.*, 51:19-26 (1993); Jonsson, U., et al., *Biotechniques* 11:620-627 (1991); Jonsson, B., et al., *J. Mol. Recognit.*, 8:125-131 (1995); y Johnsson, B., et al., *Anal. Biochem.*, 198:268-277 (1991).

[0062] El término “ k_{off} ” se refiere a la constante de velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

[0063] El término “ K_d ” se refiere a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Se dice que un anticuerpo se liga con un antígeno si la constante de disociación es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferentemente $\leq 100 \text{ nM}$ y lo más preferentemente $\leq 10 \text{ nM}$.

[0064] El término “epítope” incluye cualquier determinante proteico capaz de ligarse específicamente a un receptor de inmunoglobulina o célula T o de interactuar de otro modo con una molécula. Los determinantes epitópicos consisten usualmente de grupos superficiales químicamente activos de moléculas tales como cadenas laterales de aminoácidos o hidratos de carbono y usualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, como así también características de carga específicas. Un epítope puede ser “lineal” o “conformacional”. En un epítope lineal, todos los puntos de interacción entre la proteína y la molécula interactuante (tal como un anticuerpo) se encuentran linealmente a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína. En un epítope conformacional, los puntos de interacción se encuentran a través de residuos de aminoácidos sobre la proteína que están separados entre sí.

[0065] Según lo usado en ésta, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Vea *Immunology - A Synthesis* (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), que es incorporado en ésta por referencia. Estereoisómeros (*por ejemplo*, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α -, α -disubstituídos, aminoácidos N-alquilados, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados de los polipéptidos de la presente invención. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfofoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, s-N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (*por ejemplo*, 4-hidroxiprolina). En la forma usada en ésta para representar un polipéptido, la dirección izquierda es la dirección amino-terminal y la dirección derecha es la dirección carboxi-terminal, de acuerdo con el uso convencional estándar.

[0066] El término “polinucleótido” según lo referido en ésta, significa una forma polimérica de nucleótidos de una longitud de al menos 10 bases, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de hebra simple y de hebra doble del DNA.

[0067] El término “polinucleótido aislado”, según lo usado en ésta, significa un polinucleótido de origen genómico, cDNA, o sintético o alguna combinación de los mismos, que debido a su origen de “polinucleótido aislado” (1) no está asociado con todo el polinucleótido o una porción del mismo con el cual se encuentra el “polinucleótido aislado” en la naturaleza, (2) está ligado operativamente a un polinucleótido al cual no está ligado en la naturaleza, o (3) no se encuentra en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

[0068] El término “oligonucleótido”, al cual se hace referencia en ésta, incluye nucleótidos que se encuentran naturalmente, y nucleótidos modificados ligados entre sí mediante enlaces oligonucleotídicos que se encuentran naturalmente, y enlaces oligonucleotídicos que no se encuentran naturalmente. Los oligonucleótidos son un subconjunto polinucleotídico que comprende generalmente una longitud de 200 bases o menor. Preferentemente los oligonucleótidos tienen una longitud de 10 a 60 bases y más preferentemente una longitud de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 a 40 bases. Los oligonucleótidos usualmente tienen una sola hebra, *por ejemplo*, para sondas; si bien oligonucleótidos pueden ser de doble hebra, *por ejemplo*, para el uso en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos de la invención pueden ser oligonucleótidos de sentido o antisentido.

[0069] El término “nucleótidos que se encuentran naturalmente”, referido en ésta, incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término “nucleótidos modificados”, referido en ésta, incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o substituídos y similares. El término “enlaces oligonucleotídicos” referido en ésta incluye enlaces oligonucleotídicos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforoamidato y similares. Vea, *por ejemplo*, LaPlanche et al., *Nucl. Acids Res.* 14:9081 (1986); Stec et al., *J. Am. Chem. Soc.* 106:6077 (1984); Stein et al., *Nucl. Acids Res.*, 16:3209 (1988); Zon et al., *Anti-Cancer Drug Design* 6:539 (1991); Zon et al., *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al., U.S. Patente No. 5.151.510; Uhlmann y Peyman, *Chemical Reviews* 90:543 (1990), cuyas revelaciones están incorporadas en ésta por referencia. Si deseado, un oligonucleótido puede incluir un marcador para la detección.

[0070] Secuencias “enlazadas operativamente” incluyen ambas, secuencias de control de expresión que se encuentran en posición contigua con el gen de interés y secuencias de control de expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés. El término “secuencia de control de expresión”, según lo usado en ésta, se refiere a secuencias polinucleotídicas que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificadoras a las cuales están ligadas. Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias de iniciación de la transcripción, terminación, promotoras e intensificadoras adecuadas; señales de procesamiento de RNA eficientes, tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan el mRNA citoplasmático; secuencias que aumentan la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia de consenso de Kozak); secuencias que aumentan la estabilidad de la proteína; y, si deseado, secuencias que

aumentan la secreción de la proteína. La naturaleza de tales secuencias de control difiere en dependencia del organismo hospedante; en procariotas, tales secuencias de control incluyen generalmente el promotor, el sitio de ligadura ribosomal y la secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y la secuencia de terminación de la transcripción. El término “secuencias de control” tiene la intención de incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y puede incluir también componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias conductoras y secuencias de compañero de fusión.

[0071] El término “vector”, según lo usado en ésta, tiene la intención de referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido ligada. Un tipo de vector es un “plásmido”, término que hace referencia a un bucle circular de DNA de doble hebra al cual pueden ligarse segmentos adicionales de DNA. Otro tipo de vector es un vector viral, al cual pueden ligarse segmentos de DNA adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedante en la cual son introducidos (*por ejemplo*, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores mamíferos episomales). Otros vectores (*por ejemplo*, vectores mamíferos no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedante al ser introducidos en la célula hospedante, y de ese modo son replicados conjuntamente con el genoma del hospedante. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están ligados operativamente. A tales vectores se hace referencia en ésta como “vectores de expresión recombinante” (o simplemente, “vectores de expresión”). Generalmente, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de DNA recombinante se encuentran muchas veces en la forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden usarse en forma intercambiable, ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, la invención tiene la intención de incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (*por ejemplo*, retrovirus con replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), que tienen funciones equivalentes.

[0072] El término “célula hospedante recombinante” (o simplemente “célula hospedante”), según lo usado en ésta, tiene la intención de referirse a una célula en la cual ha sido introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que tales términos tienen la intención de referirse no solamente a la célula sujeto particular, sino también a la progenie de tal célula. Como pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas, debido a mutaciones o influencias

ambientales, tal progenie, de hecho, puede ser no idéntica a la célula parental, pero aún estar incluida dentro del alcance del término “célula hospedante” usado en ésta.

[0073] El término “hibridar selectivamente” referido en ésta significa ligar en forma detectable y específica. Polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos de acuerdo con la invención hibridan selectivamente con hebras de ácido nucleico bajo condiciones de hibridación y lavado que minimizan cantidades apreciables de ligaduras detectables a ácidos nucleicos no específicos. Pueden usarse condiciones de “elevada severidad” o “altamente estrictas” para lograr condiciones de hibridación selectiva, condiciones que son conocidas en el arte y discutidas en ésta. Un ejemplo de condiciones de “elevada severidad” o “altamente estrictas” es un método de incubación de un polinucleótido con otro polinucleótido, donde un polinucleótido puede ser fijado a una superficie sólida, tal como una membrana, en un buffer de hibridación de SSPE o SSC 6X, formamida al 50%, reactivo de Denhardt 5X, SDS al 0,5%, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón fragmentado, desnaturalizado a una temperatura de hibridación de 42°C durante 12-16 horas, seguido por dos lavados a 55°C, usando un buffer de lavado de SSC 1X, SDS al 0,5%. Vea también Sambrook et al., *supra*, pp. 9.50-9.55.

[0074] El término “porcentaje de identidad de secuencias”, en el contexto de secuencias nucleotídicas, se refiere a los residuos en dos secuencias que son iguales cuando las secuencias son alineadas para su máxima correspondencia. La longitud de la comparación de identidad de secuencias puede abarcar al menos aproximadamente nueve nucleótidos, usualmente al menos aproximadamente 18 nucleótidos, más usualmente al menos aproximadamente 24 nucleótidos, típicamente al menos aproximadamente 28 nucleótidos, más típicamente al menos aproximadamente 32 nucleótidos y preferentemente al menos aproximadamente 36, 48 o más nucleótidos. En el arte se conoce un número de algoritmos diferentes que pueden usarse para medir la identidad de secuencias nucleotídicas. Por ejemplo, secuencias polinucleotídicas pueden compararse usando FASTA, Gap o Bestfit, que son programas de la versión 10.3 del paquete de software Wisconsin Package, Accelrys, San Diego, CA. FASTA, que incluye, por ejemplo, los programas FASTA2 y FASTA3, provee alineamientos y porcentaje de identidad de secuencias de las regiones que presentan la mejor superposición entre las secuencias problema y de referencia (between the query and search sequences) (Pearson, *Methods Enzymol.*, 183: 63-98 (1990); Pearson, *Methods Enzymol. Biol.*, 132: 185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.*, 266: 227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276: 71-84 (1998); incorporadas en ésta por referencia). Siempre que no sea especificado de otro modo, se usan parámetros predeterminados para un programa o algoritmo particular. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de

secuencias entre secuencias nucleotídicas puede determinarse usando FASTA con sus parámetros predeterminados (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntaje) o usando Gap con sus parámetros predeterminados provistos en la versión 10.3 de Wisconsin Package, incorporada en ésta por referencia.

[0075] Una referencia a una secuencia nucleotídica comprende su complemento, siempre que no sea especificado de otro modo. Por lo tanto, debe entenderse que una referencia a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia particular comprende su hebra complementaria, que es su secuencia complementaria.

[0076] En el arte de la biología molecular, los investigadores usan los términos “porcentaje de identidad de secuencias”, “porcentaje de similitud de secuencias” y “porcentaje de homología de secuencias” en forma intercambiable. En esta solicitud, estos términos tendrán el mismo significado solamente con respecto a las secuencias nucleotídicas.

[0077] El término “similitud substancial” o “similitud substancial de secuencias”, al hacer referencia a un ácido nucleico o un fragmento del mismo, indica que al estar alineado el ácido nucleico óptimamente, con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiados, con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), existe una identidad de secuencias de nucleótidos en al menos aproximadamente 85%, preferentemente al menos aproximadamente 90%, y más preferentemente al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de las bases nucleotídicas, medida por cualquier algoritmo bien conocido para determinar la identidad de secuencias, tales como FASTA, BLAST o Gap, discutidos precedentemente.

[0078] Cuando se aplica a polipéptidos, el término “identidad substancial” significa que dos secuencias peptídicas, al ser alineadas óptimamente, tal como por el programa GAP o BESTFIT, usando pesos predeterminados del intervalo no homólogo (GAP), comparten una identidad de secuencias de al menos 75% u 80%, preferentemente al menos una identidad de secuencias de 90% ó 95%, aún más preferentemente una identidad de secuencia de al menos 98% ó 99%. Preferentemente, las posiciones de residuos que no son idénticos difieren en sustituciones con aminoácidos conservativos. Una “sustitución con un aminoácido conservativo” es una sustitución en la cual un residuo de aminoácido es substituído por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (*por ejemplo*, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución con un aminoácido conservativo no cambiará substancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en los cuales dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencias o grado de similitud puede ser ajustado hacia arriba para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución.

Medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los entendidos en el arte. Veá, *por ejemplo*, Pearson, *Methods Mol. Biol.*, 24: 307-31 (1994), incorporadas en ésta por referencia. Ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales hidroxil-alifáticas: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; y 6) cadenas laterales que contienen azufre son cisteína y metionina. Grupos de sustitución preferidos de aminoácidos conservativos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina.

[0079] Alternativamente, un reemplazo conservativo es cualquier cambio que tiene un valor positivo en la matriz de semejanza algorítmica (log-likelihood matrix) PAM250 revelada en Gonnet et al., *Science* 256: 1443-45 (1992), incorporado en ésta por referencia. Un reemplazo “moderadamente conservativo” es cualquier cambio que tiene un valor no negativo en la matriz de semejanza logarítmica PAM250.

[0080] La similitud de secuencias para polipéptidos se mide típicamente usando software para análisis de secuencias. Un software para análisis de proteínas compara secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a varias sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones con aminoácidos conservativos. Por ejemplo, GCG contiene programas tales como “Gap” y “Bestfit” que pueden usarse con parámetros predeterminados para determinar homología de secuencias o identidad de secuencias entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos, o entre una proteína natural y una muteína de la misma. Veá, *por ejemplo*, Wisconsin package, versión 10.3. Las secuencias polipeptídicas también pueden compararse usando FASTA con parámetros predeterminados o recomendados, un programa en Wisconsin package, versión 10.3. FASTA (*por ejemplo*, FASTA2 y FASTA3) provee alineaciones y porcentaje de identidad de secuencias de las regiones que presentan la mejor superposición entre las secuencias problema y de referencia (between the query and search sequences) (Pearson (1990); Pearson (2000)). Otro algoritmo preferido, al comparar una secuencia de la invención con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos, es el programa de computación BLAST, especialmente blastp o tblastn, usando parámetros predeterminados. Veá, *por ejemplo*, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990); Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997); incorporadas en ésta por referencia.

[0081] La longitud de las secuencias polipeptídicas cuya homología se compara será generalmente de al menos aproximadamente 16 residuos de aminoácidos, usualmente al menos aproximadamente 20 residuos, más usualmente al menos aproximadamente 24 residuos, típicamente al menos aproximadamente 28 residuos, y preferentemente mayor de aproximadamente 35 residuos. Cuando se investiga en una base de datos que contiene secuencias de un gran número de organismos diferentes, es preferible comparar secuencias de aminoácidos.

[0082] De acuerdo con lo usado en ésta, los términos “marcador” o “marcado” se refieren a la incorporación de otra molécula en el anticuerpo. En una realización, el marcador es un marcador detectable, *por ejemplo*, la incorporación de un aminoácido con marcador radioactivo o fijación de grupos de biotínulo a un polipéptido, grupos que pueden ser detectados por avidina marcada (*por ejemplo*, streptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede ser detectada por métodos ópticos o colorimétricos). En otra realización, la etiqueta o marcador puede ser terapéutico, *por ejemplo*, un conjugado de droga o toxina. En el arte se conocen varios métodos para marcar polipéptidos y glicoproteínas que pueden usarse. Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no están limitados a, los siguientes: radioisótopos o radionuclidos (*por ejemplo*, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcadores fluorescentes (*por ejemplo*, FITC, rodamina, sustancias fosforescentes a base de lantánidos), marcadores enzimáticos (*por ejemplo*, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotínulo, epítopes polipeptídicos predeterminados reconocidos por un reporter secundario (*por ejemplo*, secuencias apareadas de cierres de leucina (leucine zipper pair sequences), sitios de ligadura para anticuerpos secundarios, dominios que ligan metales, rótulos de epítopes), agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio, toxinas tal como toxina pertusis, taxol, citocalacina B, gramicidina D, bromuro de etilio, hemetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colquicina, toxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. En algunas realizaciones, los marcadores están unidos mediante brazos espaciadores de longitudes variadas para reducir el potencial de impedimento estérico.

[0083] El término “agente” se usa en ésta para señalar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto de materiales biológicos. El término “agente farmacéutico o droga” según lo usado en ésta, se refiere a un compuesto químico o composición capaz de inducir un efecto

terapéutico deseado al ser administrado adecuadamente a un paciente. Otros términos químicos se usan en ésta de acuerdo con el uso convencional en el arte, según lo ejemplificado por *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)), incorporado en ésta por referencia).

[0084] El término agente “anti-inflamatorio” o “inmuno-modulatorio” se usa en ésta para referirse a agentes que tienen la propiedad funcional de inhibir inflamación, incluyendo una enfermedad inflamatoria, en un sujeto, incluyendo un humano. En varias realizaciones de esta invención, la enfermedad inflamatoria puede consistir de, pero no está limitada a, enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal, incluyendo enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, diverticulitis, gastritis, enfermedad del hígado, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante. Las enfermedades inflamatorias también incluyen, pero no están limitadas a, enfermedad abdominal (incluyendo peritonitis, apendicitis, enfermedad del tracto biliar), mielitis transversal aguda, dermatitis alérgica (incluyendo piel alérgica, eczema alérgico, atopía de la piel, eczema atópico, dermatitis atópica, inflamación cutánea, eczema inflamatorio, dermatitis inflamatoria, piel de mosca, dermatitis miliaria, eczema de miliaria, piel de acáridos del polvo de la casa), espondilitis anquilosante (síndrome de Reiter), asma, inflamación de las vías respiratorias, arterosclerosis, arteriosclerosis, atresia biliar, inflamación de la vejiga, cáncer de las mamas, inflamación cardiovascular (incluyendo vasculitis, infartos periungueales reumatoides, úlceras de la pierna, polimiositis, inflamación vascular crónica, pericarditis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica), pancreatitis crónica, inflamación perineural, colitis (incluyendo colitis amebiana, colitis infecciosa, colitis bacteriana, colitis de Crohn, colitis isquémica, colitis ulcerativa, proctocolitis idiopática, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis pseudomembranosa), trastornos vasculares del colágeno (artritis reumatoide, SLE, esclerosis sistémica progresiva, enfermedad mixta del tejido conectivo, diabetes mellitus), enfermedad de Crohn (enteritis regional, ileitis granulomatosa, ileocolitis, inflamación del sistema digestivo), enfermedad de desmielinación (incluyendo mielitis, esclerosis múltiple, esclerosis diseminada, encefalomielitis diseminada aguda, desmielinación perivenosa, deficiencia en vitamina B12, síndrome de Guillain-Barre, retrovirus asociado a esclerosis múltiple(MS)), dermatomiositis, diverticulitis, diarrea exudativa, gastritis, hepatitis granulomatosa, inflamación granulomatosa, colecistitis, diabetes mellitus insulina-dependiente, enfermedades inflamatorias del hígado, fibrosis del hígado (cirrosis biliar primaria, hepatitis, colangitis esclerosante), inflamación pulmonar (fibrosis pulmonar idiopática, granuloma eosinofílico del pulmón, histiocitosis X pulmonar, inflamación peribronquiolar, bronquitis aguda), linfogranuloma venéreo, melanoma maligno,

enfermedad de boca/dientes (incluyendo gengivitis, enfermedad periodontal), mucositis, inflamación del sistema musculoesquelético (miositis), esteatohepatitis no alcohólica (enfermedad del hígado graso no alcohólica), inflamación ocular y orbital (incluyendo uveitis, neuritis óptica, ulceración reumatoide periférica, inflamación periférica de la córnea), osteoartritis, osteomielitis, inflamación de la faringe, poliartritis, proctitis, psoriasis, daño por radiación, sarcoidosis, necropatía de los drepanocitos, tromboflebitis superficial, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, tiroiditis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad del injerto versus hospedante, daño por quemadura aguda, síndrome de BEHÇET, síndrome de SJÖGREN.

[0085] Los términos paciente y sujeto incluyen sujetos humanos y veterinarios.

Anticuerpos anti-MAdCAM humanos y caracterización de los mismos

[0086] En una realización, la invención provee anticuerpos anti-MAdCAM que comprenden secuencias CDR humanas. En una realización preferida, la invención provee anticuerpos anti-MAdCAM humanos. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-MAdCAM humanos se producen mediante la inmunización de un animal transgénico no humano, *por ejemplo*, un roedor, cuyo genoma comprende genes de inmunoglobulina humana, de modo que el animal transgénico produce anticuerpos humanos. En algunas realizaciones, la invención provee un anticuerpo anti-MAdCAM que no liga complemento.

[0087] En una realización preferida, el anticuerpo anti-MAdCAM es 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-MAdCAM comprende una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66 ó 68 (con o sin secuencia señal) o la región variable de cualquiera de dichas secuencias de aminoácidos, o una o más CDRs de estas secuencias de aminoácidos. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-MAdCAM comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60 ó 64 (con o sin la secuencia señal) o la secuencia de aminoácidos de la región variable, o de una o más CDRs de dichas secuencias de aminoácidos. La invención también incluye anticuerpos anti-MAdCAM humanos que comprenden la secuencia de aminoácidos desde el comienzo de la CDR1 hasta el final de la CDR3 de cualquiera de las secuencias arriba mencionadas. La invención provee además un anticuerpo anti-MAdCAM que comprende una o más regiones FR de cualquiera de las secuencias arriba mencionadas.

[0088] La invención provee además un anticuerpo anti-MAdCAM que comprende una de las secuencias de aminoácidos arriba mencionadas en la cual se efectuaron una o más modificaciones. En algunas realizaciones, cisteínas en el anticuerpo, que pueden ser químicamente reactivas, se substituyen con otro residuo, tales como, sin limitación, alanina o serina. En una realización, la substitución es la de una cisteína no canónica. La substitución puede efectuarse en una región CDR o framework de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. En algunas realizaciones, la cisteína es canónica.

[0089] En algunas realizaciones, la substitución de aminoácidos se efectúa para eliminar sitios proteolíticos potenciales en el anticuerpo. Tales sitios pueden encontrarse en una región CDR o framework de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. La substitución de residuos de cisteína y la separación de sitios proteolíticos puede disminuir la heterogeneidad en el anticuerpo producido. En algunas realizaciones, se eliminan pares de asparagina-glicina, que forman sitios potenciales de desamidación, mediante la alteración de uno o ambos residuos. En algunas realizaciones, se efectúa una substitución de aminoácidos para agregar o remover sitios potenciales de glicosilación en la región variable de un anticuerpo de la invención.

[0090] En algunas realizaciones, se desdobra la lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo anti-MAdCAM de la invención. En varias realizaciones de la invención, las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos anti-MAdCAM pueden incluir opcionalmente una secuencia señal.

[0091] En un aspecto, la invención provee doce anticuerpos monoclonales anti-MAdCAM humanos inhibitorios y las líneas celulares de hibridoma que los producen. La Tabla 1 enumera los identificadores de secuencia (SEQ ID NO:) de los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y livianas de longitud completa (incluyendo la secuencia señal), y las correspondientes secuencias de aminoácidos deducidas de longitud completa.

47 45
56

Tabla 1

ANTICUERPOS ANTI-MAdCAM HUMANOS				
Anticuerpo monoclonal 1	IDENTIFICADOR DE SECUENCIAS (SEQ ID NO:)			
	Longitud completa			
	Pesado		Liviano	
	DNA	Proteína	DN A	Proteína
1.7.2	1	2	3	4
1.8.2	5	6	7	8
6.14.2	9	10	11	12
6.22.2	13	14	15	16
6.34.2	17	18	19	20
6.67.1	21	22	23	24
6.73.2	25	26	27	28
6.77.1	29	30	31	32
7.16.6	33	34	35	36
7.20.5	37	38	39	40
7.26.4	41	42	43	44
9.8.2	45	46	47	48

[0092] En otro aspecto, la invención provee una versión modificada de ciertos anticuerpos monoclonales anti-MAdCAM humanos arriba identificados. La Tabla 2 enumera los identificadores de secuencias para el DNA y las secuencias proteicas de los anticuerpos modificados.

Tabla 2

ANTICUERPOS ANTI-MAdCAM HUMANOS				
Anticuerpo monoclonal modificado	IDENTIFICADOR DE SECUENCIAS (SEQ ID NO:)			
	Longitud completa			
	Pesado		Liviano	
	DNA	Proteína	DNA	Proteína
6.22.2-mod	51	52	53	54
6.34.2-mod	55	56	57	58
6.67.1-mod	59	60	61	62
6.77.1-mod	63	64	65	66
7.26.4-mod	41	42	67	68

Clase y subclase de anticuerpos anti-MAdCAM

[0093] El anticuerpo puede ser una molécula IgG, IgM, IgE, IgA o IgD. En una realización preferida, el anticuerpo es una clase IgG y es una subclase IgG₁, IgG₂,

IgG₃ o IgG₄. En una realización más preferida, el anticuerpo anti-MAdCAM es de la subclase IgG₂ o IgG₄. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-MAdCAM pertenece a la misma clase y subclase que el anticuerpo 1.7.2, 1.8.2, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod que es IgG₂, o 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1 ó 9.8.2, que son IgG₄.

[0094] La clase y subclase de anticuerpos anti-MAdCAM puede determinarse mediante cualquier método conocido en el arte. En general, la clase y subclase de un anticuerpo puede determinarse usando anticuerpos que son específicos para una clase y subclase particular de anticuerpos. Tales anticuerpos están comercialmente disponibles. La clase y subclase puede determinarse mediante ELISA, transferencia de Western como así también mediante otras técnicas. Alternativamente, la clase y subclase puede determinarse mediante la secuenciación del total o de una porción de los dominios constantes de las cadenas pesadas y/o livianas de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de varias clases y subclases de inmunoglobulinas, y determinando la clase y subclase de los anticuerpos como la clase que muestra la mayor identidad de secuencias.

Selectividad para especies y moléculas

[0095] En otro aspecto de la invención, el anticuerpo anti-MAdCAM muestra ambas, selectividad para especies y selectividad molecular. En una realización, el anticuerpo anti-MAdCAM se liga a MAdCAM humano, de cynomolgus o de perro. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-MAdCAM no se liga a una especie de mono New World tal como un marmoset. Siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva, puede determinarse la selectividad para especies del anticuerpo anti-MAdCAM usando métodos bien conocidos en el arte. Por ejemplo, puede determinarse la selectividad para especies usando transferencia de Western, FACS, ELISA o inmunohistoquímica. En una realización preferida, puede determinarse la selectividad para especies usando inmunohistoquímica.

[0096] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-MAdCAM que liga específicamente MAdCAM tiene una selectividad para MAdCAM mayor que para VCAM, fibronectina o cualquier otro antígeno, selectividad que es al menos 10 veces, preferentemente al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ó 90 veces, lo más preferentemente al menos 100 veces mayor. En una realización preferida, el anticuerpo anti-MAdCAM no exhibe ninguna ligadura apreciable a VCAM, fibronectina o cualquier otro antígeno distinto a MAdCAM. Puede determinarse la selectividad del anticuerpo anti-MAdCAM para MAdCAM usando métodos bien

conocidos en el arte, siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva. Por ejemplo, puede determinarse la selectividad usando transferencia de Western, FACS, ELISA o inmunohistoquímica.

Afinidad de ligadura de anticuerpos anti-MAdCAM a MAdCAM

[0097] En otro aspecto de la invención, los anticuerpos anti-MAdCAM se ligan específicamente a MAdCAM con afinidad elevada. En una realización, el anticuerpo anti-MAdCAM se liga específicamente a MAdCAM con una K_d de 3×10^{-8} M o menor, medida mediante resonancia en la superficie de un plasmón, tal como BIAcore. En realizaciones más preferidas, el anticuerpo se liga específicamente a MAdCAM con una K_d de 1×10^{-8} o menor o 1×10^{-9} M o menor. En una realización aún más preferida, el anticuerpo se liga específicamente a MAdCAM con una K_d de 1×10^{-10} M o menor. En otras realizaciones preferidas, un anticuerpo de la invención se liga específicamente a MAdCAM con una K_d de $2,66 \times 10^{-10}$ M o menor, $2,35 \times 10^{-11}$ M o menor ó 9×10^{-12} M o menor. En otra realización preferida, el anticuerpo se liga específicamente a MAdCAM con una K_d de 1×10^{-11} M o menor. En otra realización preferida, el anticuerpo se liga específicamente a MAdCAM con substancialmente la misma K_d como un anticuerpo seleccionado entre 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. Un anticuerpo con “substancialmente la misma K_d ” como un anticuerpo de referencia tiene una K_d que es ± 100 pM, preferentemente ± 50 pM, más preferentemente ± 20 pM, aún más preferentemente ± 10 pM, ± 5 pM o ± 2 pM, en comparación con la K_d del anticuerpo de referencia en el mismo experimento. En otra realización preferida, el anticuerpo se liga a MAdCAM con substancialmente la misma K_d como un anticuerpo que comprende uno o más dominios variables o una o más CDRs de un anticuerpo seleccionado entre 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En aún otra realización preferida, el anticuerpo se liga a MAdCAM con substancialmente la misma K_d como un anticuerpo que comprende una de las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66 ó 68 (con o sin la secuencia señal), o el dominio variable de las mismas. En otra realización preferida, el anticuerpo se liga a MAdCAM con substancialmente la misma K_d como un anticuerpo que comprende una o más CDRs de un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66 ó 68.

[0098] La afinidad de ligadura de un anticuerpo anti-MAdCAM a MAdCAM puede determinarse mediante cualquier método conocido en el arte. En una realización, la afinidad de ligadura puede medirse mediante ensayos competitivos ELISA, RIA o mediante resonancia en la superficie de un plasmón, tal como BIAcore. En una realización más preferida, la afinidad de ligadura se mide mediante resonancia en la superficie de un plasmón. En una realización aún más preferida, la afinidad de ligadura y la velocidad de disociación se miden usando BIAcore. Un ejemplo de determinación de afinidad de ligadura se describe más abajo en el Ejemplo II.

Vida media de anticuerpos anti-MAdCAM

[0099] De acuerdo con otro objeto de la invención, el anticuerpo anti-MAdCAM tiene una vida media de al menos un día *in vitro* o *in vivo*. En una realización preferida, el anticuerpo o una porción del mismo tiene una vida media de al menos tres días. En una realización más preferida, el anticuerpo o una porción del mismo tiene una vida media de cuatro días o mayor. En otra realización, el anticuerpo o una porción del mismo tiene una vida media de ocho días o mayor. En otra realización, el anticuerpo o la porción que liga antígeno del mismo está derivatizado o modificado de modo que tiene una vida media mayor, según lo discutido más abajo. En otra realización preferida, el anticuerpo puede contener mutaciones puntuales para aumentar la vida media en suero, tal como descrito en WO 00/09560, publicada el 24 de febrero de 2000.

[0100] La vida media del anticuerpo puede medirse mediante cualquier medio conocido por un entendido en el arte. Por ejemplo, la vida media del anticuerpo puede medirse mediante transferencia de Western, ELISA o RIA durante un período de tiempo apropiado. La vida media del anticuerpo puede medirse en cualquier animal apropiado, tal como un primate, *por ejemplo*, mono cynomolgus, o un humano.

Identificación de epítopes MAdCAM reconocidos por un anticuerpo anti-MAdCAM

[0101] La invención también provee un anticuerpo anti-MAdCAM humano que liga el mismo antígeno o epítipo como un anticuerpo anti-MAdCAM humano provisto por ésta. Además, la invención provee un anticuerpo anti-MAdCAM humano que compite o compite en forma cruzada con un anticuerpo anti-MAdCAM humano. En una realización preferida, el anticuerpo anti-MAdCAM humano es 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-MAdCAM humano comprende uno o más dominios variables o una o más CDRs de un anticuerpo seleccionado entre 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2,

6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En aún otra realización preferida, el anticuerpo anti-MAdCAM humano comprende una de las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66 ó 68 (con o sin la secuencia señal), o un dominio variable de las mismas. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-MAdCAM humano comprende una o más CDRs de un anticuerpo que comprende una de las secuencias de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66 ó 68. En una realización altamente preferida, el anticuerpo anti-MAdCAM es otro anticuerpo humano.

[0102] Puede determinarse si un anticuerpo anti-MAdCAM se liga al mismo antígeno que otro anticuerpo anti-MAdCAM usando una variedad de métodos conocidos por el arte. Por ejemplo, puede usarse un anticuerpo anti-MAdCAM conocido para captar el antígeno, eluir el antígeno del anticuerpo anti-MAdCAM y determinar luego si el anticuerpo de ensayo se ligará al antígeno eluido. Puede determinarse si un anticuerpo compite con un anticuerpo anti-MAdCAM, ligando el anticuerpo anti-MAdCAM a MAdCAM bajo condiciones de saturación y midiendo luego la capacidad del anticuerpo de ensayo para ligarse a MAdCAM. Si el anticuerpo de ensayo es capaz de ligarse a MAdCAM simultáneamente con el anticuerpo anti-MAdCAM, entonces el anticuerpo de ensayo se liga a un epítipo diferente que el anticuerpo anti-MAdCAM. Sin embargo, si el anticuerpo de ensayo no es capaz de ligarse a MAdCAM simultáneamente, entonces el anticuerpo de ensayo compite con el anticuerpo anti-MAdCAM humano. Este experimento puede realizarse usando ELISA, o resonancia en la superficie de un plasmón o, preferentemente, BIAcore. Para ensayar si un anticuerpo anti-MAdCAM compite en forma cruzada con otro anticuerpo anti-MAdCAM, puede usarse el método de competición arriba descrito en dos direcciones, es decir, determinando si el anticuerpo conocido bloquea el anticuerpo de ensayo y viceversa.

Uso de genes de cadena liviana y pesada

[0103] La invención también provee un anticuerpo anti-MAdCAM que comprende una región variable de cadena liviana codificada por un gen κ humano. En una realización preferida, la región variable de la cadena liviana es codificada por un gen V κ de la familia A2, A3, A26, B3, O12 u O18. En varias realizaciones, la cadena liviana comprende no más de once, no más de seis o no más de tres substituciones de aminoácidos de la secuencia V κ A2, A3, A26, B3, O12 u O18 humana de la línea

germinal. En una realización preferida, las substituciones de aminoácidos son substituciones conservativas.

[0104] Las SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 y 48 proveen las secuencias de aminoácidos de las cadenas livianas kappa de longitud completa de doce anticuerpos anti-MAdCAM, 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 y 9.8.2. Las Figuras 1K-1T son alineaciones de las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de cadena liviana de doce anticuerpos anti-MAdCAM con las secuencias de la línea germinal de la cual están derivadas. La Figura 2A muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de cadena liviana de las cadenas livianas kappa de doce anticuerpos anti-MAdCAM entre sí. Siguiendo las enseñanzas de esta memoria descriptiva, un entendido en el arte puede determinar las diferencias entre las secuencias de la línea germinal y las secuencias de anticuerpo de los anticuerpos anti-MAdCAM adicionales. Los SEQ ID NOS: 54, 58, 62, 66 ó 68 proveen las secuencias de aminoácidos de las cadenas livianas kappa de longitud completa de cinco anticuerpos anti-MAdCAM adicionales, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod y 7.26.4-mod, modificadas por substitución de los aminoácidos de sus anticuerpos anti-MAdCAM parentales, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1 ó 7.26.4, respectivamente.

[0105] En una realización preferida, la VL del anticuerpo anti-MAdCAM contiene las mismas mutaciones, con relación a las secuencias de aminoácidos de la línea germinal, que una o más cualesquiera de las VL de los anticuerpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. La invención incluye un anticuerpo anti-MAdCAM que utiliza los mismos genes V κ humanos y J κ humanos que un anticuerpo ejemplificado. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una o más de las mismas mutaciones de la línea germinal como uno o más de los anticuerpos ejemplificados. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende diferentes substituciones en una o más de las mismas posiciones como uno o más de los anticuerpos ejemplificados. Por ejemplo, la VL del anticuerpo anti-MAdCAM puede contener una o más substituciones de aminoácidos que son las mismas que aquellas presentes en el anticuerpo 7.16.6, y otra substitución de aminoácidos que es la misma del anticuerpo 7.26.4. De este modo, se pueden mezclar y unir diferentes características de ligadura del anticuerpo con el fin de modificar, por ejemplo, la afinidad del anticuerpo para MAdCAM o su velocidad de disociación del antígeno. En otra realización, las mutaciones se efectúan en la misma posición como aquella encontrada en una o más cualesquiera de las VL de los anticuerpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod,

6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod, pero se hacen mas bien substituciones con aminoácidos conservativos en vez de utilizar el mismo aminoácido. Por ejemplo, si el aminoácido substituído en comparación con la línea germinal en uno de los anticuerpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod es glutamato, se puede substituir conservativamente con aspartato. Similarmente, si el aminoácido substituído es serina, puede substituirse conservativamente con treonina.

[0106] En otra realización preferida, la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos que es igual a la secuencia de aminoácidos de la VL de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En otra realización altamente preferida, la cadena liviana comprende secuencias de aminoácidos que son las mismas de las regiones CDR de la cadena liviana de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En otra realización preferida, la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos con al menos una región CDR de la cadena liviana de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En otra realización preferida, la cadena liviana comprende secuencias de aminoácidos con CDRs de diferentes cadenas livianas que usan los mismos genes Vk y Jk. En una realización más preferida, las CDRs de diferentes cadenas livianas se obtienen a partir de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En otra realización preferida, la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 64, 66 ó 68 con o sin la secuencia señal. En otra realización, la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia nucleotídica seleccionada entre SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 57, 61, 65 ó 67 (con o sin la secuencia señal), o una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene 1-11 inserciones, deleciones o substituciones de aminoácido de la misma. Preferentemente, las substituciones de aminoácidos son substituciones con aminoácidos conservativos. En otra realización, el anticuerpo o una porción del mismo comprende una cadena liviana lambda.

[0107] La presente invención también provee un anticuerpo anti-MAdCAM o una porción del mismo que comprende una secuencia del gen VH humano o una secuencia derivada del gen VH humano. En una realización, la secuencia de aminoácidos de cadena pesada se deriva de una familia de genes VH 1-18, 3-15, 3-21, 3-23, 3-30, 3-

33 ó 4-4 humanos. En varias realizaciones, la cadena pesada comprende no más de quince, no más de seis o no más de tres cambios de aminoácidos de la secuencia génica VH 1-18, 3-15, 3-21, 3-23, 3-30, 3-33 ó 4-4 humana de la línea germinal.

[0108] Las SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42 y 46 proveen las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas de longitud completa de doce anticuerpos anti-MAdCAM. Las Figuras 1A-1J son alineaciones de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada de doce anticuerpos anti-MAdCAM con las secuencias de la línea germinal de las cuales están derivadas. La Figura 2B muestra las alineaciones de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada de doce anticuerpos anti-MAdCAM entre sí. Siguiendo las enseñanzas de esta memoria descriptiva y las secuencias nucleotídicas de la invención, un entendido en el arte puede determinar las secuencias de aminoácidos codificadas de las doce cadenas pesadas anti-MAdCAM y las cadenas pesadas de la línea germinal y determinar las diferencias entre las secuencias de la línea germinal y las secuencias del anticuerpo. Las SEQ ID NOS: 52, 56, 60 y 64 proveen las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas de longitud completa de anticuerpos anti-MAdCAM, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod y 6.67.1-mod, modificadas mediante la substitución de aminoácidos de sus anticuerpos anti-MAdCAM parentales, 6.22.2, 6.34.2 y 6.67.1, respectivamente. Un anticuerpo anti-MAdCAM modificado adicional, 7.26.4-mod, tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa que es SEQ ID NO: 42.

[0109] En una realización preferida, la VH del anticuerpo anti-MAdCAM contiene las mismas mutaciones, con relación a las secuencias de aminoácidos de la línea germinal, que una o más cualesquiera de las VH de los anticuerpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. Similarmente a lo discutido precedentemente, el anticuerpo comprende una o más de las mismas mutaciones de la línea germinal como uno o más de los anticuerpos ejemplificados. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende diferentes substituciones en una o más de las mismas posiciones como uno o más de los anticuerpos ejemplificados. Por ejemplo, la VH del anticuerpo anti-MAdCAM puede contener una o más substituciones de aminoácidos que son las mismas que aquellas presentes en el anticuerpo 7.16.6, y otra substitución de un aminoácido que es la misma del anticuerpo 7.26.4. De este modo, se pueden mezclar y unir diferentes características de ligadura del anticuerpo con el fin de modificar, *por ejemplo*, la afinidad del anticuerpo para MAdCAM o su velocidad de disociación del antígeno. En otra realización, se efectúa una substitución de aminoácidos en comparación con la línea germinal en la misma posición como una

substitución de la línea germinal encontrada en una o varias cualesquiera de las VH del anticuerpo de referencia 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod, pero la posición es substituída con un residuo diferente, que es un residuo de substitución conservativo en comparación con el anticuerpo de referencia.

[0110] En otra realización preferida, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es igual a la secuencia de aminoácidos de la VH de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En otra realización altamente preferida, la cadena pesada comprende secuencias de aminoácidos que son las mismas de las regiones CDR de la cadena pesada de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En otra realización preferida, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de al menos una región CDR de la cadena pesada de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.4, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En otra realización preferida, la cadena pesada comprende secuencias de aminoácidos con CDRs de diferentes cadenas pesadas. En una realización más preferida, las CDRs de diferentes cadenas pesadas se obtienen a partir de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En otra realización preferida, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60 ó 64 con o sin la secuencia señal. En otra realización, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia nucleotídica seleccionada entre SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 59 ó 63, o una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene 1-15 inserciones, deleciones o substituciones de aminoácidos de la misma. En otra realización, las substituciones son substituciones con aminoácidos conservativos.

Métodos para producir anticuerpos y líneas celulares que producen anticuerpos

Inmunización

[0111] En una realización de la presente invención, se producen anticuerpos humanos inmunizando un animal no humano que comprende alguno o todos los loci de la cadena pesada y liviana de inmunoglobulina humana con un antígeno MAdCAM. En una realización preferida, el animal no humano es un animal XENOMOUSE™, que es una cepa de ratón producida por ingeniería genética que

comprende grandes fragmentos de loci de inmunoglobulina humana y es deficiente en la producción de anticuerpos de ratón. Veá, *por ejemplo*, Green et al., *Nature Genetics* 7:13-21 (1994) y Patentes de los Estados Unidos 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598 y 6.130.364. Veá también WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 y WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560 y WO 00/037504. El animal XENOMOUSETM produce un repertorio de anticuerpos completamente humanos similares a los de humanos adultos y genera anticuerpos monoclonales (mAbs) humanos antígeno-específicos. Una segunda generación del animal XENOMOUSETM contiene aproximadamente 80% del repertorio de genes V del anticuerpo humano, mediante la introducción de fragmentos del cromosoma artificial de levadura (YAC) con configuración de la línea germinal del tamaño megabase de los loci de cadena pesada humana y los loci de cadena liviana κ . En otras realizaciones, los ratones XENOMOUSETM contienen aproximadamente todo del locus de la cadena pesada y la cadena liviana λ humana. Veá Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998), cuyas revelaciones están incorporadas en ésta por referencia.

[0112] La invención también provee un método para producir anticuerpos anti-MAdCAM a partir de animales no ratón, no humanos mediante la inmunización de animales transgénicos no humanos que comprenden loci de inmunoglobulina humana. Pueden producirse tales animales usando los métodos descritos inmediatamente más arriba. Los métodos revelados en estos documentos pueden modificarse según lo descrito en la patente U.S. 5.994.619 (la “patente 619”), que es incorporada en ésta por referencia. La patente “619” describe métodos para producir nuevas células y líneas celulares de masa celular interior cultivada (CICM), derivadas de cerdos y vacas, y células CICM transgénicas en las cuales se había insertado DNA heterólogo. Las células CICM transgénicas pueden usarse para producir embriones, fetos y progenie transgénicos clonados. La patente ‘619 también describe métodos para producir animales transgénicos capaces de transmitir el DNA heterólogo a su progenie. En una realización preferida, los animales no humanos pueden ser ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado vacuno o caballos.

[0113] En otra realización, los animales no humanos que comprenden loci de inmunoglobulina humana son animales que tienen un “minilocus” de inmunoglobulinas humanas. En el enfoque de minilocus, se mimetiza un locus de Ig exógena mediante la inclusión de genes individuales del locus de la Ig. De este modo, uno o más genes VH, uno o más genes DH, uno o más genes JH, (un) dominio (dominios) constante(s) μ y (un) segundo dominio (dominios) constante(s)

(preferentemente (un) dominio (dominios) constante(s) gamma) son conformados en una construcción para la inserción en un animal. Este enfoque está descrito, *inter alia*, en las patentes U.S. No. 5.545.807, 5.545.806, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.591.669, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215 y 5.643.763, incorporadas en ésta por referencia.

[0114] Una ventaja del enfoque minilocus es la rapidez con la cual pueden generarse e introducirse en animales construcciones que incluyen porciones de locus Ig. Sin embargo, una desventaja potencial del enfoque minilocus es que no podría existir una diversidad de inmunoglobulinas suficiente para sustentar el desarrollo completo de células B, de modo que podría haber una menor producción de anticuerpos.

[0115] Para producir un anticuerpo anti-MAdCAM humano, se inmuniza un animal no humano que comprende alguno o todos los loci de la inmunoglobulina humana con un antígeno MAdCAM y se aísla del animal un anticuerpo o la célula que produce el anticuerpo. El antígeno MAdCAM puede ser MAdCAM aislado y/o purificado y es preferentemente un MAdCAM humano. En otra realización, el antígeno MAdCAM es un fragmento de MAdCAM, preferentemente el dominio extracelular de MAdCAM. En otra realización, el antígeno MAdCAM es un fragmento que comprende al menos un epítipo de MAdCAM. En otra realización, el antígeno MAdCAM es una célula que expresa MAdCAM sobre su superficie celular, preferentemente una célula que sobreexpresa MAdCAM sobre su superficie celular.

[0116] La inmunización de animales puede efectuarse mediante cualquier método conocido en el arte. Veá, *por ejemplo*, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press (1990). Métodos para inmunizar animales no humanos tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, ganado vacuno y caballos son bien conocidos en el arte. Veá, *por ejemplo*, Harlow y Lane y la patente de los Estados Unidos 5.994.619. En una realización preferida, el antígeno MAdCAM se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Tales adyuvantes incluyen al adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (didéptidos de muramilo) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Tales adyuvantes pueden proteger al polipéptido de una dispersión rápida, secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al hospedante para segregar factores que son quimiotácticos para macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Preferentemente, cuando se administra un polipéptido, el plan de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido repartidas en varias semanas.

[0117] El Ejemplo I provee un protocolo para inmunizar un animal XENOMOUSETM con MAdCAM humano de longitud completa en solución fisiológica buferada con fosfato.

Producción de anticuerpos y líneas celulares que producen anticuerpos

[0118] Después de la inmunización de un animal con un antígeno MAdCAM, pueden obtenerse del animal anticuerpos y/o células que producen anticuerpos. Se obtiene del animal un suero que contiene el anticuerpo anti-MAdCAM desangrando o sacrificando al animal. El suero puede usarse tal como se obtiene del animal, puede obtenerse una fracción de inmunoglobulina del suero o pueden purificarse anticuerpos anti-MAdCAM del suero.

[0119] En otra realización, a partir del animal inmunizado pueden prepararse células inmortalizadas que producen anticuerpos. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y se immortalizan células B usando métodos bien conocidos en el arte. Métodos para immortalizar células incluyen, pero no están limitados a, transfectar las células con oncogenes, infectarlas con un virus oncogénico y cultivarlas bajo condiciones selectivas para células inmortalizadas, someterlas a compuestos carcinogénicos o mutantes, fusionarlas con una célula inmortalizada, *por ejemplo*, una célula de mieloma, e inactivar un gen supresor de tumores. Vea, *por ejemplo*, Harlow y Lane, *supra*. En realizaciones que implican las células de mieloma, éstas no segregan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretoria). Después de immortalización y selección con antibiótico, las células inmortalizadas, o sobrenadantes del cultivo de las mismas, son rastreadas usando MAdCAM, una porción del mismo, o una célula que expresa MAdCAM. En una realización preferida, el rastreo inicial se realiza usando un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), preferentemente un ELISA. Un ejemplo de rastreo con ELISA se provee en la publicación PCT No. WO 00/37504, incorporada en ésta por referencia.

[0120] En otra realización, pueden prepararse células que producen anticuerpos a partir de un humano que tiene un trastorno autoinmune y que expresa anticuerpos anti-MAdCAM. Células que expresan los anticuerpos anti-MAdCAM pueden aislarse mediante la aislación de células de leucocitos y sometiéndolas a clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o mediante incubación sobre placas recubiertas con MAdCAM o una porción de las mismas. Estas células pueden fusionarse con un mieloma humano no secretorio para producir hibridomas humanos que expresan anticuerpos anti-MAdCAM humanos. Generalmente, esta es una realización menos preferida porque es probable que los anticuerpos anti-MAdCAM tendrán una baja afinidad para MAdCAM.

[0121] Las células que producen anticuerpos anti-MAdCAM, *por ejemplo*, hibridomas, son seleccionadas, clonadas y rastreadas adicionalmente para obtener características deseables, incluyendo crecimiento celular robusto, elevada producción

de anticuerpos y características deseables del anticuerpo, según lo discutido más abajo. Los hibridomas pueden cultivarse y expandirse *in vivo* en animales singénicos, en animales que carecen de un sistema inmune, *por ejemplo*, ratones desnudos, o en un cultivo celular *in vitro*. Métodos de selección, clonación y expansión de hibridomas son bien conocidos por los entendidos en el arte.

[0122] Preferentemente, el animal inmunizado es un animal no humano que expresa genes de inmunoglobulina humana, y las células B del bazo se fusionan con un mieloma derivado de la misma especie del animal no humano. Más preferentemente, el animal inmunizado es un animal XENOMOUSETM y la línea celular de mieloma es un mieloma de ratón no secretorio, tal como la línea celular de mieloma P3-X63-AG8-653 (ATCC). Vea, *por ejemplo*, Ejemplo I.

[0123] Por lo tanto, en una realización, la invención provee métodos para producir una línea celular que produce un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento del mismo dirigido a MAdCAM, métodos que comprenden (a) inmunizar un animal transgénico no humano descrito en ésta con MAdCAM, una porción de MAdCAM o una célula o tejido que expresa MAdCAM; (b) esperar que el animal transgénico tenga una respuesta inmune a MAdCAM; (c) aislar células que producen anticuerpos del animal transgénico; (d) immortalizar las células que producen el anticuerpo; (e) crear poblaciones monoclonales individuales de las células immortalizadas que producen el anticuerpo; y (f) rastrear las células immortalizadas que producen el anticuerpo o sobrenadantes del cultivo de las mismas para identificar un anticuerpo dirigido a MAdCAM.

[0124] En un aspecto, la invención provee hibridomas que producen anticuerpos anti-MAdCAM humanos. En una realización preferida, los hibridomas son hibridomas de ratón, según lo descrito anteriormente. En otra realización, los hibridomas se producen en una especie no humana, no ratón, tales como ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacunos o caballos. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos, en los cuales se fusiona un mieloma no secretorio humano con una célula humana que expresa un anticuerpo anti-MAdCAM.

Ácidos nucleicos, vectores, células hospedantes y métodos recombinantes para fabricar anticuerpos

Ácidos nucleicos

[0125] Se proveen moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-MAdCAM de la invención. En una realización, la molécula de ácido nucleico codifica una cadena pesada y/o liviana de una inmunoglobulina anti-MAdCAM. En una realización preferida, una sola molécula de ácido nucleico codifica una cadena pesada

de una inmunoglobulina anti-MAdCAM y otra molécula de ácido nucleico codifica la cadena liviana de una inmunoglobulina anti-MAdCAM. En una realización más preferida, la inmunoglobulina codificada es una inmunoglobulina humana, preferentemente una IgG humana. La cadena liviana codificada puede ser una cadena λ o una cadena κ , preferentemente una cadena κ .

[0126] En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena liviana comprende la secuencia de la línea germinal de un gen V κ A2, A3, A26, B3, O12 u O18 humano o una variante de dicha secuencia. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico que codifica la cadena liviana comprende una secuencia derivada de un gen J κ 1, J κ 2, J κ 3, J κ 4 o J κ 5 humano. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico que codifica la cadena liviana codifica no más de once cambios de aminoácidos del gen V κ A2, A3, A26, B3, O12 u O18 de la línea germinal, preferentemente no más de seis cambios de aminoácidos, y aún más preferentemente no más de tres cambios de aminoácidos. En una realización más preferida, el ácido nucleico que codifica la cadena liviana es la secuencia de la línea germinal.

[0127] La invención provee una molécula de ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena liviana (VL) que contiene hasta once cambios de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal, donde los cambios de aminoácidos son idénticos a los cambios de aminoácidos de la secuencia de la línea germinal de la VL de uno de los anticuerpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. La invención también provee una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. La invención también provee una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de una o más de las CDRs de cualquiera de las cadenas livianas de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de todas las CDRs de cualquiera de las cadenas livianas de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En otra realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de una de SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28,

32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66, 68 o comprende una secuencia nucleotídica de una de SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 57, 61, 65 ó 67. En otra realización preferida, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de una o más de las CDRs de cualquiera de SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66, 68 o comprende una secuencia nucleotídica de una o más de las CDRs de cualquiera de SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 57, 61, 65 ó 67. En una realización más preferida, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de todas las CDRs de cualquiera de SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66, 68 o comprende la secuencia nucleotídica de todas las CDRs de cualquiera de SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 57, 61, 65 ó 67.

[0128] La invención también provee una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de una VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica a una VL arriba descrita, particularmente a una VL que comprende una secuencia de aminoácidos de una de SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66 ó 68. La invención también provee una secuencia nucleotídica que es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica a una secuencia nucleotídica de una de SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 57, 61, 65 ó 67.

[0129] En otra realización, la invención provee una molécula de ácido nucleico que hibrida bajo condiciones altamente severas con una molécula de ácido nucleico que codifica una VL como arriba descrita, particularmente una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66 ó 68. La invención también provee una molécula de ácido nucleico que hibrida bajo condiciones altamente severas con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica de una de SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 57, 61, 65 ó 67.

[0130] La invención también provee una molécula de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada (VH) que utiliza un gen VH 1-18, 3-15, 3-21, 3-23, 3-30, 3-33 ó 4-4 humano. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica el gen VH utiliza además un gen humano de la familia JH4 o JH6. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica el gen VH utiliza el gen JH4b o JH6b humano. En otra realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia derivada de un gen D 3-10, 4-23, 5-5, 6-6 ó 6-19 humano.

En una realización aún más preferida, la molécula de ácido nucleico que codifica la VH contiene no más de quince cambios de aminoácidos de los genes VH 1-18, 3-15, 3-21, 3-23, 3-30, 3-33 ó 4-4 de la línea germinal, preferentemente no más de seis cambios de aminoácidos, y aún más preferentemente no más de tres cambios de aminoácidos. En una realización altamente preferida, la molécula de ácido nucleico que codifica la VH contiene al menos un cambio de aminoácido en comparación con la secuencia de la línea germinal, donde el cambio de aminoácido es idéntico a un cambio de aminoácido de la secuencia de la línea germinal de la cadena pesada de uno de los anticuerpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En una realización aún más preferida, la VH contiene no más de quince cambios de aminoácidos en comparación con las secuencias de la línea germinal, donde los cambios son idénticos a aquellos cambios de la secuencia de la línea germinal de la VH de uno de los anticuerpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod.

[0131] En una realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de la VH de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En otra realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de una o más de las CDRs de la cadena pesada de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico comprende secuencias nucleotídicas que codifican las secuencias de aminoácidos de todas las CDRs de la cadena pesada de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En otra realización preferida, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de una de SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60 ó 64 o que comprende una secuencia nucleotídica de una de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 59 ó 63. En otra realización preferida, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de una o más de las CDRs de cualquiera de SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60 ó 64 o comprende una secuencia nucleotídica de una o más de las CDRs de cualquiera de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 59 ó 63. En una realización preferida, la molécula de

ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica las secuencias de aminoácidos de todas las CDRs de cualquiera de SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60 ó 64 o comprende una secuencia nucleotídica de todas las CDRs de cualquiera de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 59 ó 63. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica una región contigua desde el comienzo de CDR1 hasta el final de CDR3 de una cadena pesada o liviana de cualquiera de los anticuerpos anti-MAdCAM arriba mencionados.

[0132] En otra realización, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos de una VH que es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica a una de las secuencias de aminoácidos que codifican una VH como descrito recientemente, particularmente a una VH que comprende una secuencia de aminoácidos de una de SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60 ó 64. La invención también provee una secuencia nucleotídica que es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica a una secuencia nucleotídica de una de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 59 ó 63.

[0133] En otra realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una VH es una molécula que hibrida bajo condiciones altamente severas con una secuencia nucleotídica que codifica una VH como descrito precedentemente, particularmente una VH que comprende una secuencia de aminoácidos de una de SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60 ó 64. La invención también provee una secuencia nucleotídica que codifica una VH que hibrida bajo condiciones altamente severas con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica de una de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 59 ó 63.

[0134] La secuencia nucleotídica que codifica cualquiera o ambas de las cadenas pesada y liviana de un anticuerpo anti-MAdCAM o las regiones variables de las mismas puede obtenerse a partir de cualquier fuente que produce un anticuerpo anti-MAdCAM. Métodos para aislar mRNA que codifica un anticuerpo son bien conocidos por el arte. Vea, *por ejemplo*, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). El mRNA puede usarse para producir cDNA a ser utilizado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o en la clonación con cDNA de genes del anticuerpo. En una realización de la invención, las moléculas de ácido nucleico pueden obtenerse a partir de un hibridoma que expresa un anticuerpo anti-MAdCAM, según lo descrito precedentemente, preferentemente un hibridoma que tiene como uno

de sus partícipes de fusión una célula de un animal transgénico que expresa genes de la inmunoglobulina humana, tal como un animal XENOMOUSETM, un animal transgénico ratón, no humano o un animal transgénico no ratón, no humano. En otra realización, el hibridoma se deriva de un animal no transgénico, no humano, que puede usarse, *por ejemplo*, para anticuerpos humanizados.

[0135] Una molécula de ácido nucleico que codifica toda la cadena pesada de un anticuerpo anti-MAdCAM puede construirse mediante la fusión de una molécula de ácido nucleico que codifica todo el dominio variable de una cadena pesada o un dominio que liga antígeno de la misma con un dominio constante de una cadena pesada. Similarmente, una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena liviana de un anticuerpo anti-MAdCAM puede construirse mediante la fusión de una molécula de ácido nucleico que codifica el dominio variable de una cadena liviana o un dominio que liga antígeno de la misma con un dominio constante de una cadena liviana. Moléculas de ácido nucleico que codifican regiones VH y VL pueden convertirse en genes de anticuerpo de longitud completa, insertándolas en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena liviana, respectivamente, de modo que el segmento VH está ligado operativamente con el segmento (los segmentos) de la región constante de la cadena pesada (CH) dentro del vector y el segmento VL está ligado operativamente con el segmento de la región constante de cadena liviana (CL) dentro del vector. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas VH o VL son convertidas en genes de anticuerpo de longitud completa mediante enlace, por ejemplo, ligando la molécula de ácido nucleico que codifica una cadena VH con una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena CH usando técnicas estándar de biología molecular. Lo mismo puede lograrse utilizando moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas VL y CL. Las secuencias de los genes de la región constante de cadena pesada y liviana humana son conocidas en el arte. Vea, *por ejemplo*, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed., NIH Publ. No. 91-3242 (1991). Luego pueden expresarse las moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y/o livianas de longitud completa a partir de una célula en la cual han sido introducidas y se aísla el anticuerpo anti-MAdCAM.

[0136] En una realización preferida, el ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena pesada codifica la región variable de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60 ó 64, y la molécula de ácido nucleico que codifica la región variable de las cadenas livianas codifica la región variable de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 66 ó 68.

[0137] En una realización, una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo anti-MAdCAM o una porción que liga antígeno de la misma, o la cadena liviana de un anticuerpo anti-MAdCAM o una porción que liga antígeno de la misma puede aislarse de un animal no humano, no ratón que expresa genes de inmunoglobulina humana y ha sido inmunizado con un antígeno MAdCAM. En otra realización, la molécula de ácido nucleico puede aislarse de una célula que produce anticuerpo anti-MAdCAM derivada de un animal no transgénico o de un paciente humano que produce anticuerpos anti-MAdCAM. El mRNA de células que producen anticuerpos anti-MAdCAM puede ser aislado mediante técnicas estándar, clonado y/o amplificado usando técnicas de PCR y de construcción de bibliotecas y ser rastreado usando protocolos estándar para obtener moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y livianas anti-MAdCAM.

[0138] Las moléculas de ácido nucleico pueden usarse para expresar recombinantemente grandes cantidades de anticuerpos anti-MAdCAM, según lo descrito más abajo. Las moléculas de ácido nucleico también pueden usarse para producir anticuerpos quiméricos, anticuerpos de una sola cadena, inmunoadhesinas, diacuerpos, anticuerpos mutados y derivados de anticuerpos, según lo descrito más abajo. Si las moléculas de ácido nucleico se derivan de un animal no humano, no transgénico, las moléculas de ácido nucleico pueden usarse para la humanización de anticuerpos, también según lo descrito más abajo.

[0139] En otra realización, pueden usarse las moléculas de ácido nucleico de la invención como sondas o cebadores PCR para secuencias específicas del anticuerpo. Por ejemplo, puede usarse una sonda de molécula de ácido nucleico en métodos diagnósticos o puede usarse un cebador PCR de molécula de ácido nucleico para amplificar regiones de DNA que pueden ser usadas, *inter alia*, para aislar secuencias nucleotídicas a ser usadas en la producción de dominios variables de anticuerpos anti-MAdCAM. En una realización preferida, las moléculas de ácido nucleico son oligonucleótidos. En una realización más preferida, los oligonucleótidos pertenecen a regiones altamente variables de las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo de interés. En una realización aún más preferida, los oligonucleótidos codifican el total o una parte de una o más CDRs.

Vectores

[0140] La invención provee vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico de la invención que codifican la cadena pesada o la porción que liga antígeno de la misma. La invención también provee vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico de la invención que codifican la cadena pesada o la porción que liga

antígeno de la misma. La invención también provee vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpo y sondas de los mismos.

[0141] Para expresar los anticuerpos o porciones de anticuerpos de la invención, se insertan DNAs que codifican cadenas livianas y pesadas parciales o de longitud completa, obtenidas como descrito precedentemente, en vectores de expresión, de modo que los genes son ligados operativamente a secuencias de control de transcripción y traducción. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), virus de plantas tales como virus del mosaico de coliflor, virus del mosaico de tabaco, cósmidos, YACs, episomas derivados de EBV y similares. El gen del anticuerpo es ligado dentro de un vector de modo que secuencias de control de transcripción y traducción dentro del vector pueden ejercer su función de regular la transcripción y traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se eligen de modo que sean compatibles con la célula hospedante usada para la expresión. El gen de la cadena liviana del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados. En una realización preferida, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante métodos estándar (*por ejemplo*, ligadura de sitios de restricción complementarios en el fragmento génico del anticuerpo y el vector, o ligadura con formación de extremos romos si no existen sitios de restricción).

[0142] Un vector conveniente es un vector que codifica una secuencia CH o CL funcionalmente completa de la inmunoglobulina humana, con sitios de restricción apropiados contruídos por métodos de ingeniería genética de modo que cualquier secuencia VH o VL puede ser insertada y expresada fácilmente, según lo descrito precedentemente. En tales vectores, el corte y empalme se produce usualmente entre el sitio dador de corte y empalme en la región J insertada y el sitio aceptor de corte y empalme que precede la región C humana, y también se produce en las regiones de corte y empalme que existen dentro de los exones de la CH humana. La poliadenilación y terminación de la transcripción se producen en sitios cromosomales nativos corriente abajo de las regiones de codificación. El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena del anticuerpo por una célula hospedante. El gen de la cadena del anticuerpo puede ser clonado en el vector, de modo que el péptido señal sea ligado en el marco de lectura con el terminal amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína que no sea una inmunoglobulina).

[0143] Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención llevan secuencias regulatorias que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula hospedante. Será apreciado por los entendidos en el arte que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias regulatorias, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedante a ser transformada, el nivel de expresión deseado de la proteína, etc. Secuencias regulatorias preferidas para la expresión en células hospedantes mamíferas incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células mamíferas, tales como promotores y/o intensificadores derivados de secuencias largas terminales repetidas (LTRs) de retrovirus, citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/intensificador de CMV), Virus Simian 40 (SV40) (tal como el promotor/intensificador de SV40), adenovirus, (*por ejemplo*, el promotor principal tardío de adenovirus (adenovirus mayor late promoter = AdMLP)), poliovirus y promotores fuertes de mamíferos tales como promotores de inmunoglobulina natural y actina. Para una descripción adicional de elementos regulatorios virales y secuencias de los mismos, vea, *por ejemplo*, U.S. Patentes Nos. 5.168.062, 4.510.245 y 4.968.615, cada una de las cuales es incorporada en ésta por referencia. El arte conoce métodos para expresar anticuerpos en plantas, incluyendo una descripción de promotores y vectores, como así también la transformación de plantas. Vea, *por ejemplo*, patente de los Estados Unidos 6.517.529. El arte también conoce bien métodos para expresar polipéptidos en células bacterianas o células fúngicas, *por ejemplo*, células de levadura.

[0144] Además de los genes de las cadenas del anticuerpo y de secuencias regulatorias, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedantes (*por ejemplo*, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de las células hospedantes en las cuales se introdujo el vector (vea, *por ejemplo*, Patentes U.S. Nos. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, típicamente el gen marcador de selección confiere resistencia a drogas, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedante en la cual se introdujo el vector. Genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen dihidrofolato reductasa (DHFR) (a ser usado en células hospedantes dhfr con selección/amplificación de metotrexato) el gen neo (para la selección de G418) y el gen glutamato sintetasa.

Células hospedantes no hibridoma y métodos recombinantes para producir proteínas

[0145] Moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada o una porción que liga antígeno de la misma y/o la cadena liviana o una porción que liga antígeno de la misma de un anticuerpo anti-MAdCAM, y vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico, pueden usarse para la transformación de una célula hospedante mamífera, vegetal, bacteriana o de levadura adecuada. La transformación puede realizarse mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedante. Métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células mamíferas son bien conocidos por el arte e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplasto, electroporación, encapsulación del (de los) polinucleótido(s) en liposomas, inyección biolística y microinyección directa del DNA en núcleos. Además, moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en células mamíferas mediante vectores virales. Métodos para la transformación de células son bien conocidos por el arte. Vea, *por ejemplo*, patentes U.S. Nos. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455 (patentes que son incorporadas en ésta por referencia). Métodos de transformación de células vegetales son bien conocidos por el arte, incluyendo, *por ejemplo*, transformación mediada por agrobacterium, transformación biolística, inyección directa, electroporación y transformación viral. Métodos para transformar células bacterianas y de levadura también son bien conocidos por el arte.

[0146] Líneas celulares mamíferas disponibles como hospedantes para la expresión son bien conocidas por el arte e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la colección American Type Culture Collection (ATCC). Estas líneas celulares incluyen, *inter alia*, células del ovario del hamster chino (Chinese hamster ovary (CHO) cells), células NSO, células SP2, células HEK-293T, células NIH-3T3, células HeLa, células de riñón de la cría de hamster (baby hamster kidney (BHK) cells), células del riñón del mono (COS), células del carcinoma hepatocelular humano (*por ejemplo*, Hep G2), células A549, células 3T3 y un número de otras líneas celulares. Células hospedantes mamíferas incluyen células humanas, de ratón, rata, perro, mono, cerdo, cabra, bovino, caballo y hamster. Líneas celulares de preferencia particular se seleccionan determinando aquellas líneas celulares que tienen elevados niveles de expresión. Otras líneas celulares que pueden usarse son líneas celulares de insectos, tales como células Sf9, células de anfibios, células bacterianas, células vegetales y células fúngicas. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican la cadena pesada o la porción que liga antígeno de la misma, la cadena liviana y/o la porción que liga antígeno de la misma en células

hospedantes mamíferas, los anticuerpos son producidos cultivando las células hospedantes durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedantes o, más preferentemente, mediante la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual se cultivan las células hospedantes. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos estándar para la purificación de proteínas. Células vegetales hospedantes incluyen, *por ejemplo*, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lenteja de agua (duckweed), maíz, trigo, papa, etc. Células hospedantes bacterianas incluyen las especies *E. coli* y *Streptomyces*. Células hospedantes de levadura incluyen *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

[0147] Además, la expresión de anticuerpos de la invención (u otros grupos funcionales de los mismos) de líneas celulares de producción puede intensificarse usando varias técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión de genes con glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque común para aumentar la expresión bajo ciertas condiciones. El sistema GS se discute total o parcialmente en conexión con las Patentes Europeas Nos. 0 216 846, 0 256 055, 0 338 841 y 0 323 997.

[0148] Es probable que anticuerpos expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tendrán una glicosilación diferente entre sí. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por las moléculas de ácido nucleico provistas en ésta, o que comprenden las secuencias de aminoácidos provistas en ésta, forman parte de la presente invención, independientemente de la glicosilación de los anticuerpos.

Animales y plantas transgénicos

[0149] La invención también provee animales no humanos transgénicos y plantas transgénicas que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico de la invención que pueden ser usados para producir anticuerpos de la invención. Los anticuerpos pueden ser producidos en y recuperados de tejidos o fluidos corporales, tales como leche, sangre u orina de cabras, vacas, caballos, cerdos, ratas, ratones, conejos, hamsters u otros animales. Vea, *por ejemplo*, Patentes U.S. Nos. 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172 y 5.741.957. Según lo descrito precedentemente, pueden inmunizarse animales transgénicos humanos que comprenden loci de inmunoglobulina humana con MAdCAM o una porción del mismo. Métodos para producir anticuerpos en plantas están descritos, *por ejemplo*, en las patentes U.S. 6.046.037 y 5.959.177, incorporadas en ésta por referencia.

[0150] En otra realización, animales no humanos transgénicos y plantas transgénicas son producidos mediante la introducción de una o más moléculas de ácido nucleico de la invención en el animal o planta mediante técnicas transgénicas estándar. Vea

Hogan, *supra*. Las células transgénicas usadas para hacer al animal transgénico pueden ser células del tronco embrionario, células somáticas o células de huevo fertilizado. Los organismos transgénicos no humanos pueden ser quiméricos, heterocigotas no quiméricos y homocigotas no quiméricos. Veá, *por ejemplo*, Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* 2^a ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson et al., *Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach*, Oxford University Press (2000); y Pinkert, *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press (1999). En otra realización, los organismos transgénicos no humanos pueden tener una ruptura dirigida y reemplazo que codifica una cadena pesada y/o una cadena liviana de interés. En una realización preferida, los animales o plantas transgénicos comprenden y expresan moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y livianas que se combinan para ligarse específicamente a MAdCAM, preferentemente MAdCAM humano. En otra realización, los animales o plantas transgénicos comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo modificado tal como un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos anti-MAdCAM pueden fabricarse en cualquier animal transgénico. En una realización preferida, los animales no humanos son ratones, ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado vacuno o caballos. El animal transgénico no humano expresa dichos polipéptidos codificados en sangre, leche, orina, saliva, lágrimas, moco y otros fluidos corporales.

Bibliotecas de exhibición en fagos

[0151] La invención provee un método para producir un anticuerpo anti-MAdCAM o una porción que liga antígeno del mismo que comprende las etapas de sintetizar una biblioteca de anticuerpos humanos en fagos, rastrear la biblioteca con MAdCAM o una porción del mismo, aislar el fago que liga MAdCAM y obtener el anticuerpo del fago. Un método para preparar la biblioteca de anticuerpos comprende las etapas de inmunizar un animal hospedante no humano que comprende un locus de inmunoglobulina humana con MAdCAM o una porción antigénica del mismo para crear una respuesta inmune, extraer células del animal hospedante que son responsables para la producción de anticuerpos; aislar de las células extraídas RNA, someter el RNA a transcripción inversa para producir cDNA, amplificar el cDNA usando un cebador, e insertar el cDNA en un vector de exhibición en fagos, de modo que los anticuerpos sean expresados en el fago. De este modo pueden obtenerse anticuerpos anti-MAdCAM recombinantes de la invención.

[0152] Anticuerpos humanos anti-MAdCAM recombinantes de la invención, además de los anticuerpos anti-MAdCAM revelados en ésta, pueden aislarse mediante

el rastreo de una biblioteca recombinante combinatoria de anticuerpos, preferentemente una biblioteca que exhibe en fagos scFv, preparada usando cDNAs de VL y VH humanas preparadas a partir de mRNA aislado de linfocitos humanos. Las metodologías para preparar y rastrear tales bibliotecas son conocidos por el arte. Equipos para generar bibliotecas que exhiben en fagos están comercialmente disponibles (*por ejemplo*, el sistema de anticuerpos recombinantes en fagos Pharmacia (Pharmacia Recombinant Phage Antibody System), número de catálogo 27-9400-01; y el equipo de exhibición en fagos Stratagene SurfZAP[™], número de catálogo 240612). También hay otros métodos y reactivos que pueden usarse para generar y rastrear bibliotecas de exhibición de anticuerpos (vea, *por ejemplo*, Patente U.S. No. 5.223.409; Publicación PCT No. 92/18619; Publicación PCT No. WO 91/17271; Publicación PCT No. 92/20791; Publicación PCT No. WO 92/15679; Publicación PCT No. WO 93/01288; Publicación PCT No. WO 92/01047; Publicación PCT No. WO 92/09690; Fuchs et al. (1991), *Biotechnology*, 9:1369-1372; Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas*, 3:81-85 (1992); Huse et al., *Science*, 246:1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J*, 12:725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992); Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:3576-3580 (1992); Garrad et al., *Biotechnology*, 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., *Nuc Acid Res*, 19:4133-4137 (1991); y Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978-7982 (1991).

[0153] En una realización preferida, para aislar anticuerpos anti-MAdCAM humanos con las características deseadas, primero se usa un anticuerpo anti-MAdCAM humano descrito en ésta para seleccionar secuencias de cadenas pesadas y livianas humanas que tienen actividad de ligadura similar hacia MAdCAM, usando métodos de imprinting de epítopes descritos en Hoogenboom et al., Publicación PCT No. WO 93/06213. Las bibliotecas de anticuerpos usadas en este método son preferentemente bibliotecas en scFv preparadas y rastreadas según lo descrito en McCafferty et al., Publicación PCT No. WO 92/01047, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); y Griffiths et al., *EMBO J* 12:725-734 (1993). Las bibliotecas de anticuerpos en scFv son rastreadas preferentemente usando como antígeno MAdCAM humano.

[0154] Una vez seleccionados los segmentos VL y VH iniciales humanos, se realizan experimentos de "mix and match" ("mezclar y unir"), en los cuales se rastrean diferentes pares de los segmentos VL y VH inicialmente seleccionados para la ligadura con MAdCAM, para seleccionar combinaciones preferidas de pares VL/VH. Adicionalmente, para mejorar aún más la calidad del anticuerpo, los segmentos VL y VH del (de los) par(es) preferido(s) VL/VH pueden ser sometidos a mutación

aleatoria, preferentemente dentro de la región CDR3 de la VH y/o VL, en un proceso análogo al proceso de mutación somática *in vivo* responsable por la maduración de la afinidad de anticuerpos durante una respuesta inmune natural. Esta maduración de la afinidad *in vitro* puede lograrse mediante la amplificación de regiones VH y VL, usando cebadores PCR complementarios a la CDR3 de la VH o CDR3 de la VL, respectivamente, cebadores que han sido “spiked” con (a los cuales se ha agregado) una mezcla aleatoria de las cuatro bases nucleotídicas en ciertas posiciones, de modo que los productos PCR resultantes codifiquen segmentos VH y VL en los cuales han sido introducidas mutaciones aleatorias en las regiones CDR3 de la VH y/o CDR3 de la VL. Estos segmentos VH y VL sometidos a mutación aleatoria pueden rastrearse nuevamente para la ligadura con MAdCAM.

[0155] Después de la selección y aislación de un anticuerpo anti-MAdCAM de la invención a partir de una biblioteca que exhibe inmunoglobulina recombinante, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo seleccionado pueden recuperarse del paquete de exhibición (display package) (por ejemplo, del genoma del fago) y subclonarse en otros vectores de expresión mediante técnicas de DNA recombinante estándar. Si deseado, el ácido nucleico puede ser sometido a manipulación adicional para crear otras formas del anticuerpo de la invención, según lo descrito más abajo. Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado mediante el rastreo de una biblioteca combinatoria, el DNA que codifica el anticuerpo es clonado en un vector de expresión recombinante e introducido en células hospedantes mamíferas, según lo descrito precedentemente.

Conmutación de clases

[0156] Otro aspecto de la presente invención es proveer un mecanismo mediante el cual la clase de un anticuerpo anti-MAdCAM puede ser conmutada por otra. En un aspecto de la invención, se aísla una molécula de ácido nucleico que codifica VL o VH usando métodos bien conocidos en el arte de modo que no incluye cualquier secuencia nucleotídica que codifica CL o CH. Luego, la molécula de ácido nucleico que codifica VL o VH es ligada operativamente con una secuencia nucleotídica que codifica una CL o CH de una clase diferente de molécula de inmunoglobulina. Esto puede lograrse usando un vector o molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica CL o CH, según lo descrito precedentemente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-MAdCAM que originalmente fue una IgM puede ser conmutado de clase a una IgG. Además, la conmutación de clase puede usarse para convertir una subclase IgG a otra subclase, *por ejemplo*, de IgG₄ a IgG₂. Un método preferido para producir un anticuerpo de la invención que comprende una subclase de isotipo o

anticuerpo deseada comprende los pasos de aislar un ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo anti-MAdCAM y un ácido nucleico que codifica la cadena liviana de un anticuerpo anti-MAdCAM, obtener la región variable de la cadena pesada, ligar la región variable de la cadena pesada con el dominio constante de una cadena pesada del isotipo deseado, expresar la cadena liviana y la cadena pesada ligada en una célula, y recolectar el anticuerpo anti-MAdCAM con el isotipo deseado.

Derivados de anticuerpos

[0157] Pueden usarse las moléculas de ácido nucleico descritas precedentemente para generar derivados de anticuerpos usando técnicas y métodos conocidos por un entendido en el arte.

Anticuerpos humanizados

[0158] La inmunogenicidad de anticuerpos no humanos puede ser reducida en alguna medida usando técnicas de humanización, empleando potencialmente técnicas de exhibición usando bibliotecas apropiadas. Será apreciado que anticuerpos murinos o anticuerpos de otras especies pueden ser humanizados o primatizados usando técnicas bien conocidas en el arte. Veá, *por ejemplo*, Winter y Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) y Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.*, 12125-168 (1992). El anticuerpo de interés puede ser preparado mediante ingeniería genética usando técnicas de DNA recombinante para substituir los dominios visagra C_H1, C_H2, C_H3, y/o el dominio framework con la secuencia humana correspondiente (vea WO 92/02190 y patentes U.S. Nos. 5.530.101, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.792, 5.714.350 y 5.777.085). En otra realización, un anticuerpo anti-MAdCAM no humano puede ser humanizado substituyendo el C_H1, dominio visagra, C_H2, C_H3 y/o los dominios framework con la secuencia humana correspondiente de un anticuerpo anti-MAdCAM de la invención.

Anticuerpos mutados

[0159] En otra realización, las moléculas de ácido nucleico, los vectores y las células hospedantes pueden usarse para fabricar anticuerpos anti-MAdCAM mutados. Los anticuerpos pueden ser mutados en los dominios variables de las cadenas pesadas y/o livianas para modificar una propiedad de ligadura del anticuerpo. Por ejemplo, puede efectuarse una mutación en una o varias de las regiones CDR para aumentar o disminuir la K_d del anticuerpo para MAdCAM. Técnicas de mutagénesis dirigidas a un sitio son bien conocidas por el arte. Veá, *por ejemplo*, Sambrook et al. y Ausubel et al., *supra*. En una realización preferida, se efectúan mutaciones en un residuo de

aminoácidos del cual se sabe que está modificado, en comparación con la línea germinal, en una región variable de un anticuerpo anti-MAdCAM. En una realización más preferida, se efectúan una o más mutaciones en un residuo de aminoácidos del cual se sabe que está cambiado en comparación con la línea germinal en una región variable o una región CDR de uno de los anticuerpos anti-MAdCAM 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En otra realización, se efectúan una o más mutaciones en un residuo de aminoácidos del cual se sabe que está modificado con respecto a la línea germinal en una región variable o región CDR cuya secuencia de aminoácidos está presente en SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66 ó 68 o cuya secuencia nucleotídica está presente en SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 51, 53, 55, 57, 61, 63, 65 ó 67. En otra realización, las moléculas de ácido nucleico son sometidas a mutación en una o más de las regiones framework. Puede efectuarse una mutación en una región framework o un dominio constante para aumentar la vida media del anticuerpo anti-MAdCAM. Vea, *por ejemplo*, WO 00/09560, publicada el 24 de febrero de 2000, incorporada en ésta por referencia. En una realización, puede haber una, tres o cinco o diez mutaciones puntuales y no más de quince mutaciones puntuales. También puede efectuarse una mutación en una región framework o en un dominio constante para modificar la inmunogenecidad del anticuerpo, para proveer un sitio para la ligadura covalente o no covalente con otra molécula, o para modificar propiedades tales como fijación de complemento. Pueden efectuarse mutaciones en cada una de las regiones framework, el dominio constante y las regiones variables de un anticuerpo mutado simple. Alternativamente, pueden efectuarse mutaciones en solo una de las regiones framework, las regiones variables o el dominio constante en un anticuerpo mutado simple.

[0160] En una realización, no hay modificaciones mayores que de quince aminoácidos en cualquiera de las regiones VH o VL del anticuerpo anti-MAdCAM mutado en comparación con el anticuerpo anti-MAdCAM previo a la mutación. En una realización más preferida, no hay más de diez modificaciones de aminoácidos en cualquiera de las regiones VH o VL del anticuerpo anti-MAdCAM mutado, más preferentemente no más de cinco modificaciones de aminoácidos, o aún más preferentemente no más de tres modificaciones de aminoácidos. En otra realización, no hay más de quince modificaciones de aminoácidos en los dominios constantes, más preferentemente, no más de diez cambios de aminoácidos, aún más preferentemente, no más de cinco cambios de aminoácidos.

Anticuerpos modificados

[0161] En otra realización, puede fabricarse un anticuerpo de fusión o una inmunoadhesina que comprende el total o una porción de un anticuerpo anti-MAdCAM ligado con otro polipéptido. En una realización preferida, solo las regiones variables del anticuerpo anti-MAdCAM están ligadas con el polipéptido. En otra realización preferida, el dominio VH de un anticuerpo anti-MAdCAM está ligado con un primer polipéptido, mientras que el dominio VL de un anticuerpo anti-MAdCAM está ligado con un segundo polipéptido, asociado con el primer polipéptido de modo tal que los dominios VH y VL pueden interactuar entre sí para formar un sitio de ligadura de anticuerpo. En otra realización preferida, el dominio VH está separado del dominio VL mediante un engarce, de modo que los dominios VH y VL pueden interactuar entre sí (vea abajo bajo anticuerpos de cadena simple). Luego, el anticuerpo VH-engarce-VL es ligado con el polipéptido de interés. El anticuerpo de fusión es útil para dirigir un polipéptido hacia una célula o tejido que expresa MAdCAM. El polipéptido puede ser un agente terapéutico, tal como una toxina, un factor de crecimiento u otra proteína regulatoria, o puede ser un agente diagnóstico, tal como una enzima que puede ser fácilmente visualizada, tal como peroxidasa de rábano picante. Además, pueden crearse anticuerpos de fusión en los cuales dos (o más) anticuerpos de cadena simple están ligados entre sí. Esto es útil si se desea crear un anticuerpo bivalente o polivalente sobre una sola cadena polipeptídica, o si se desea crear un anticuerpo biespecífico.

[0162] Para crear un anticuerpo de cadena simple (scFv), los fragmentos del DNA que codifican VH y VL son ligados operativamente con otro fragmento que codifica un engarce flexible, *por ejemplo*, codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃ (SEQ ID NO: 147) de modo que las secuencias VH y VL pueden ser expresadas como una proteína de cadena simple contigua, con las regiones VL y VH unidas por el engarce flexible (vea, *por ejemplo*, Bird et al., *Science*, 242:423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883 (1988); McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990)). El anticuerpo de cadena simple puede ser monovalente, si se usa solamente una sola VH y VL, bivalente, si se usan dos VH y VL, o polivalente, si se usan más de dos VH y VL.

[0163] En otra realización, pueden prepararse otros anticuerpos modificados usando moléculas de ácido nucleico que codifican anti-MAdCAM. Por ejemplo, pueden prepararse "cuerpos Kappa" (Ill et al., *Protein Eng.* 10: 949-57 (1997)), "Minicuerpos" (Martin et al., *EMBO J.* 13: 5303-9 (1994)), "Diacuerpos" (Holliger et al., *PNAS USA* 90: 6444-6448 (1993)), o "Janusinas" (Traunecker et al., *EMBO J* 10: 0:3655-3659 (1991) y Traunecker et al., "Janusin: un nuevo diseño molecular para

reactivos biespecíficos”, *Int J Cancer Suppl* 7:51-52 (1992)) usando técnicas estándar de biología molecular siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva.

[0164] En otro aspecto, pueden generarse anticuerpos quiméricos y biespecíficos. Puede fabricarse un anticuerpo quimérico que comprende regiones CDRs y framework de diferentes anticuerpos. En una realización preferida, las CDRs del anticuerpo quimérico comprenden todas las CDRs de la región variable de una cadena liviana o cadena pesada de un anticuerpo anti-MAdCAM humano, mientras que las regiones framework se derivan de uno o más anticuerpos diferentes. En una realización más preferida, las CDRs del anticuerpo quimérico comprenden todas las CDRs de las regiones variables de la cadena liviana y la cadena pesada de un anticuerpo anti-MAdCAM humano. Las regiones framework pueden ser de otras especies y, en una realización preferida, pueden ser humanizadas. Alternativamente, las regiones framework pueden ser de otro anticuerpo humano.

[0165] Puede generarse un anticuerpo biespecífico que se liga específicamente a MAdCAM a través de un dominio ligante y a una segunda molécula a través de un segundo dominio ligante. El anticuerpo biespecífico puede producirse mediante técnicas recombinantes de biología molecular, o las moléculas pueden ser conjugadas físicamente entre sí. Además, puede generarse un anticuerpo de cadena simple que contiene más de una VH y VL que se liga específicamente a MAdCAM y a otra molécula. Tales anticuerpos biespecíficos pueden generarse usando técnicas bien conocidas, por ejemplo, en conexión con (i) y (ii) *vea, por ejemplo*, Fanger et al., *Immunol Methods* 4: 72-81 (1994) y Wright y Harris, *supra.*, y en conexión con (iii) *vea, por ejemplo*, Traunecker et al. *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7: 51-52 (1992). En una realización preferida, el anticuerpo biespecífico se liga a MAdCAM y a otra molécula expresada con alto nivel sobre células endoteliales. En una realización más preferida, la otra molécula es VCAM, ICAM o L-selectina.

[0166] En varias realizaciones, los anticuerpos modificados arriba descritos se preparan usando una o más de las regiones variables o una o más de las regiones CDRs de uno de los anticuerpos seleccionados entre 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ó 7.26.4-mod. En otra realización, los anticuerpos modificados se preparan usando una o más de las regiones variables o una o más regiones CDR cuya secuencia de aminoácidos está presente en SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66 ó 68 o cuya secuencia nucleotídica está presente en SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 51, 53, 55, 57, 61, 63, 65 ó 67.

Anticuerpos derivatizados y marcados

[0167] Un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención puede ser derivatizado o ligado a otra molécula (*por ejemplo*, otro péptido o proteína). Generalmente, los anticuerpos o porciones de los mismos son derivatizados de modo que la ligadura con MAdCAM no sea afectada adversamente por la derivatización o el marcado. Por lo tanto, los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención tienen la intención de incluir ambas, las formas intactas y las formas modificadas de los anticuerpos anti-MAdCAM humanos descritos en ésta. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención puede estar ligado funcionalmente (mediante enlace químico, función genética, asociación no covalente o de otro modo) con una o más entidades moleculares diferentes, tal como otro anticuerpo (*por ejemplo*, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o porción del anticuerpo con otra molécula, tal como una región del núcleo de streptavidina o un rótulo de polihistidina.

[0168] Un tipo de anticuerpo derivatizado es producido mediante la reticulación de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, *por ejemplo*, para crear anticuerpos biespecíficos). Reticulantes adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos reactivos claramente separados por un espaciador apropiado (*por ejemplo*, éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimídico), o homobifuncionales (*por ejemplo*, suberato de disuccinimidilo). Tales reticulantes están disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.

[0169] Otro tipo de anticuerpo derivatizado es un anticuerpo marcado. Agentes de detección útiles con los cuales puede derivatizarse un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención incluyen compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamino-1-naftalensulfonilo, ficoeritrina, sustancias fosforescentes a base de lantánidos y similares. Un anticuerpo también puede marcarse con enzimas útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo está marcado con una enzima detectable, es detectado mediante el agregado de reactivos adicionales usados por la enzima para producir un producto de reacción que puede ser discernido. Por ejemplo, cuando está presente el agente peroxidasa de rábano picante, el agregado de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina lleva a un producto de reacción coloreado detectable. Un anticuerpo también puede ser marcado con biotina y ser detectado mediante medición indirecta de la ligadura de avidina o streptavidina. Un anticuerpo

puede ser marcado con un agente magnético, tal como gadolinio. Un anticuerpo también puede ser marcado con un epítipo polipeptídico predeterminado reconocido por un reporter secundario (*por ejemplo*, secuencias apareadas de cierres de leucina, sitios de ligadura para anticuerpos secundarios, dominios que ligan metales, rótulos de epítopes). En algunas realizaciones, los marcadores están unidos mediante brazos espaciadores de longitudes variadas para reducir el potencial de impedimento estérico.

[0170] Un anticuerpo anti-MAdCAM también puede estar marcado con un aminoácido radiomarcado. El radiomarcador puede ser usado tanto con propósitos diagnósticos como terapéuticos. Por ejemplo, el radiomarcador puede usarse para detectar tejidos que expresan MAdCAM mediante rayos x u otras técnicas de diagnóstico. Además, el radiomarcador puede usarse terapéuticamente como una toxina para tejidos enfermos o tumores que expresan MAdCAM. Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no están limitados a, los radioisótopos o radionuclidos siguientes: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I .

[0171] Un anticuerpo anti-MAdCAM también puede ser derivatizado con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo o un grupo de hidrato de carbono. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, *por ejemplo*, para aumentar la vida media en suero o para aumentar la ligadura al tejido. Esta metodología también se aplicará a fragmentos o versiones cualesquiera de anticuerpos anti-MAdCAM que ligan antígeno.

Composiciones y equipos farmacéuticos

[0172] En otro aspecto, la invención provee composiciones que comprenden un anticuerpo inhibitorio anti-MAdCAM humano y métodos para tratar sujetos con tales composiciones. En algunas realizaciones, el sujeto de tratamiento es un humano. En otras realizaciones, el sujeto es un sujeto veterinario. En algunas realizaciones, el sujeto veterinario es un perro o un primate no humano.

[0173] El tratamiento puede implicar la administración de uno o más anticuerpos monoclonales anti-MAdCAM inhibitorios de la invención, o fragmentos que ligan antígeno de los mismos, solos o con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los anticuerpos anti-MAdCAM inhibitorios de la invención y las composiciones que los comprenden pueden administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos, diagnósticos o profilácticos adicionales. Agentes terapéuticos adicionales incluyen agentes anti-inflamatorios o inmunomodulatorios. Estos agentes incluyen, pero no están limitados a, los corticosteroides tópicos y orales tales como prednisolona, metilprednisolona, NCX-1015 o budesonida; los aminosalicilatos tales como mesalazina, olsalazina, balsalazida o NCX-456; la clase de inmunomoduladores

tales como azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato, ciclosporina, FK506, IL-10 (Ilodecacina), IL-11 (Oprelevcina), IL-12, antagonistas de MIF/CD74, antagonistas de CD40, tales como TNX-100/5-D12, antagonistas de OX40L, GM-CSF, pimecrolimus o rapamicina; la clase de agentes anti-TNF α tales como infliximab, adalimumab, CDP-870, onercept, etanercept; la clase de agentes antiinflamatorios, tales como inhibidores de PDE-4 (roflumilast, etc), inhibidores de TACE (DPC-333, RDP-58, etc) e inhibidores de ICE (VX-740, etc) como así también antagonistas del receptor IL-2, tal como daclizumab, la clase de antagonistas de moléculas de adhesión selectivas, tales como natalizumab, MLN-02, o alicaforsen, clases de agentes analgésicos tales como, pero no estando limitados a, inhibidores de COX-2, tales como rofecoxib, valdecoxib, celecoxib, moduladores de canales de sensibilización de voltaje del tipo P/Q ($\alpha 2\delta$), tales como gabapentina y pregabalina, antagonistas del receptor NK-1, modulares del receptor cannabinoide, y agonistas del receptor opioide delta, como así también agentes anti-neoplásicos, anti-tumorales, anti-angiogénicos o quimioterapéuticos. Tales agentes adicionales pueden incluirse en la misma composición o administrarse por separado. En algunas realizaciones, pueden usarse uno o más anticuerpos anti-MAdCAM inhibitorios de la invención como vacuna o como adyuvantes de una vacuna. Particularmente, debido a que MAdCAM es expresado en tejido linfoide, los antígenos de una vacuna pueden ser dirigidos ventajosamente al tejido linfoide conjugando el antígeno con un anticuerpo anti-MAdCAM de la invención.

[0174] Según lo usado en ésta, “excipiente farmacéuticamente aceptable” significa cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos e intensificantes o retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables son agua, solución fisiológica, solución fisiológica buferada con fosfato, buffer de acetato con cloruro de sodio, dextrosa, glicerol, polietilenglicol, etanol y similares, como así también combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. Ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes tensoactivos, agentes de humectación o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes de humectación o emulsión, preservativos o buffers, que aumentan la vida de estante o efectividad del anticuerpo.

[0175] Las composiciones de esta invención pueden encontrarse en una variedad de formas, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (*por ejemplo*, soluciones inyectables y de infusión),

dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, tortas liofilizadas, polvos secos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración deseado y de la aplicación terapéutica. Composiciones preferidas típicas están en la forma de soluciones inyectables o de infusión, tales como las composiciones similares a aquellas usadas para la inmunización pasiva de humanos. El modo de administración preferido es el parenteral (*por ejemplo*, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular, intradérmico). En una realización preferida, el anticuerpo se administra mediante infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular, intradérmica o subcutánea.

[0176] Composiciones terapéuticas típicas deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como solución, torta liofilizada, polvo seco, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración elevada de droga. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del anticuerpo anti-MAdCAM en la cantidad requerida de un solvente apropiado con un, o una combinación de los, ingrediente(s) arriba enumerado(s), según lo requerido, seguido de esterilización. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado al vacío y liofilización, que proveen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada de dichos ingredientes. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos entre aquellos arriba enumerados. Pueden mantenerse las características deseadas de una solución usando, por ejemplo, agentes tensoactivos y el tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión mediante el uso de agentes tensoactivos, fosfolípidos y polímeros. Puede lograrse una absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante la inclusión en la composición de un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato, materiales poliméricos, aceites y gelatina.

[0177] Los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse mediante una variedad de métodos conocidos por el arte, si bien para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta / el modo preferido de administración es la infusión subcutánea, intramuscular, intradérmica o intravenosa. Como será apreciado por el entendido en el arte, la ruta y/o el modo de administración variará en dependencia de los resultados deseados.

[0178] En ciertas realizaciones, las composiciones del anticuerpo pueden prepararse con un excipiente que protegerá el anticuerpo contra una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de liberación microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como vinilacetato de etileno, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o generalmente conocidos por los entendidos en el arte. Vea, *por ejemplo*, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems* (J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

[0179] En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-MAdCAM de la invención puede ser administrado oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un excipiente comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si deseado) también puede ser encerrado en una cápsula de gelatina dura o blanda, comprimido en tabletas o incorporado directamente en la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los anticuerpos anti-MAdCAM pueden ser incorporados con excipientes y ser usados en la forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la invención mediante otro tipo de administración que la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación.

[0180] Las composiciones de la invención pueden incluir una “cantidad terapéuticamente efectiva” o una “cantidad profilácticamente efectiva” de un anticuerpo o una porción que liga antígeno de la invención. Una “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o porción de anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es una cantidad con la cual se compensan efectos tóxicos o perniciosos cualesquiera del anticuerpo o porción de anticuerpo mediante los efectos terapéuticos beneficiosos. Una “cantidad profilácticamente efectiva” se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, como una dosis profiláctica se usa en sujetos previo a, o en una etapa anterior de, la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva puede ser menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

[0181] Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proveer la respuesta óptima deseada (*por ejemplo*, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, varias dosis divididas durante un período de tiempo, o la dosis puede ser reducida o aumentada proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en la forma de unidades de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. “Forma de unidad de dosificación”, según lo usado en ésta, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el tratamiento de sujetos mamíferos; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el excipiente farmacéutico requerido. La especificación de las formas de unidad de dosificación de la invención es dictada por, y directamente dependiente de, (a) las características únicas del anticuerpo anti-MAdCAM o la porción del mismo y del efecto terapéutico o profiláctico particular a ser logrado, y (b) las limitaciones inherentes al arte de formular la composición de tal anticuerpo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

[0182] Una gama típica, no limitativa, para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención es 0,025 a 50 mg/kg, más preferentemente 0,1 a 50 mg/kg, más preferentemente 0,1-25, 0,1 a 10 ó 0,1 a 3 mg/kg. En algunas realizaciones, una formulación contiene 5 mg/ml de anticuerpo en un buffer de acetato de sodio 20 mM, pH 5,5, NaCl 140 mM y 0,2 mg/ml de polisorbato 80. Debe observarse que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la severidad de la condición a ser aliviada. Debe entenderse, además, que para cualquier sujeto particular deben ajustarse regímenes de dosificación específicos a lo largo del tiempo, de acuerdo con la necesidad del individuo y la evaluación profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que las gamas de dosificación establecidas en ésta son dadas solamente a modo de ejemplo y no tienen la intención de limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

[0183] Otro aspecto de la presente invención provee equipos que comprenden un anticuerpo anti-MAdCAM o un porción de anticuerpo de la invención o una composición que comprende tal anticuerpo. Un equipo puede incluir, además del anticuerpo o la composición, agentes diagnósticos o terapéuticos. Un equipo también puede incluir instrucciones de uso para un método diagnóstico o terapéutico. En una realización preferida, el equipo incluye el anticuerpo o una composición que lo comprende y un agente diagnóstico que puede ser usado en un método descrito más abajo. En otra realización preferida, el equipo incluye el anticuerpo o una

composición que lo comprende y uno o más agentes terapéuticos que pueden usarse en un método descrito más abajo.

Terapia con genes

[0184] Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden administrarse a un paciente que lo necesita vía terapia con genes. La terapia puede ser o *in vivo* o *ex vivo*. En una realización preferida, se administran a un paciente moléculas de ácido nucleico que codifican ambas, una cadena pesada y una cadena liviana. En una realización más preferida, las moléculas de ácido nucleico se administran de modo tal que se integran en forma estable en los cromosomas de células B, debido a que estas células están especializadas para producir anticuerpos. En una realización preferida, células B precursoras se transfectan o infectan *ex vivo* y se re-transplantan en un paciente que lo necesita. En otra realización, células B precursoras u otras células se infectan *in vivo* usando un virus recombinante conocido por infectar el tipo celular de interés. Vectores típicos usados para terapia con genes incluyen liposomas, plásmidos y vectores virales. Vectores virales típicos son retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados. Después de la infección *in vivo* o *ex vivo*, pueden monitorearse los niveles de expresión del anticuerpo tomando una muestra del paciente tratado y usando cualquier inmunoensayo conocido en el arte o discutido en ésta.

[0185] En una realización preferida, el método de terapia con genes comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o una porción que liga antígeno de la misma de un anticuerpo anti-MAdCAM y expresar la molécula de ácido nucleico. En otra realización, el método de terapia con genes comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena liviana o una porción que liga antígeno de la misma de un anticuerpo anti-MAdCAM y expresar la molécula de ácido nucleico. En un método más preferido, el método de terapia con genes comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o una porción que liga antígeno de la misma y una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena liviana o la porción que liga antígeno de la misma de un anticuerpo anti-MAdCAM de la invención y expresar las moléculas de ácido nucleico. El método de terapia con genes también puede comprender la etapa de administrar otro agente antiinflamatorio o inmunomodulatorio.

Métodos diagnósticos usados

[0186] Los anticuerpos anti-MAdCAM pueden usarse para detectar MAdCAM en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos anti-MAdCAM pueden usarse en un inmunoensayo convencional, incluyendo, sin limitación, un ensayo ELISA, un ensayo RIA, FACS, inmunohistoquímica de tejidos, transferencia de Western o inmunoprecipitación. Los anticuerpos anti-MAdCAM de la invención pueden usarse para detectar MAdCAM de humanos. En otra realización, los anticuerpos anti-MAdCAM pueden usarse para detectar MAdCAM de primates Old World tales como monos cynomolgus y rhesus, chimpancés y simios. La invención provee un método para detectar MAdCAM en una muestra biológica, método que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo anti-MAdCAM de la invención y detectar el anticuerpo ligado a MAdCAM. En una realización, el anticuerpo anti-MAdCAM es derivatizado directamente con un marcador detectable. En otra realización, el anticuerpo anti-MAdCAM (el primer anticuerpo) no está marcado y un segundo anticuerpo u otra molécula que puede ligar al anticuerpo anti-MAdCAM está marcado. Como es bien conocido por un entendido en el arte, se elige un segundo anticuerpo que sea capaz de ligar específicamente la especie y clase específica del primer anticuerpo. Por ejemplo, si el anticuerpo anti-MAdCAM es una IgG humana, entonces el segundo anticuerpo puede ser una IgG anti-humana. Otras moléculas que pueden ligarse con anticuerpos incluyen, sin limitación, Proteína A y Proteína G, ambas disponibles comercialmente, *por ejemplo*, de Pierce Chemical Co.

[0187] Marcadores adecuados para el anticuerpo o anticuerpo secundario se han revelado *supra*, e incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, agentes magnéticos y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen streptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilaminofluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; un ejemplo de un agente magnético incluye gadolinio; y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

[0188] En una realización alternativa, MAdCAM puede ensayarse en una muestra biológica mediante un inmunoensayo de competición utilizando estándares de MAdCAM marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-MAdCAM no marcado. En este ensayo, se combinan la muestra biológica, los estándares de MAdCAM marcados y el anticuerpo anti-MAdCAM, y se determina la cantidad de

MAdCAM estándar marcado ligada al anticuerpo no marcado. La cantidad de MAdCAM en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de MAdCAM estándar marcado ligada al anticuerpo anti-MAdCAM.

[0189] Los inmunoensayos arriba expuestos pueden usarse para varios propósitos. En una realización, los anticuerpos anti-MAdCAM pueden usarse para detectar MAdCAM en células de un cultivo celular. En una realización preferida, los anticuerpos anti-MAdCAM pueden usarse para determinar el nivel de expresión de MAdCAM en la superficie celular después del tratamiento de las células con varios compuestos. Este método puede usarse para ensayar compuestos que pueden usarse para activar o inhibir MAdCAM. En este método, una muestra de células se trata con un compuesto de ensayo durante un período de tiempo mientras que se deja otra muestra sin tratar, pudiendo determinarse luego la expresión en la superficie celular mediante citometría de flujo, inmunohistoquímica, transferencia de Western, ELISA o RIA. Además, los inmunoensayos pueden realizarse en mayor escala para una clasificación de alto rendimiento, con el fin de ensayar un gran número de compuestos, ya sea para la activación o inhibición de MAdCAM.

[0190] Los anticuerpos anti-MAdCAM de la invención también pueden usarse para determinar los niveles de MAdCAM en un tejido o en células derivadas del tejido. En una realización preferida, el tejido es un tejido enfermo. En una realización más preferida, el tejido es el tracto gastrointestinal inflamado o una biopsia del mismo. En una realización preferida del método, un tejido o una biopsia del mismo es extirpado de un paciente. Luego, el tejido o biopsia se usa en un inmunoensayo para determinar, *por ejemplo*, niveles de MAdCAM, niveles de MAdCAM en la superficie celular o la ubicación de MAdCAM mediante los métodos discutidos precedentemente. El método puede usarse para determinar si un tejido inflamado expresa un elevado nivel de MAdCAM.

[0191] El método diagnóstico arriba descrito puede usarse para determinar si un tejido expresa altos niveles de MAdCAM, lo que puede ser una indicación de que el tejido responderá bien al tratamiento con anticuerpo anti-MAdCAM. Además, el método diagnóstico también puede usarse para determinar si el tratamiento con anticuerpo anti-MAdCAM (vea más abajo) tiene el efecto de que un tejido expresa niveles menores de MAdCAM, pudiendo usarse el método de este modo para determinar si el tratamiento es exitoso.

[0192] Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse *in vivo* para localizar tejidos y órganos que expresan MAdCAM. En una realización preferida, los anticuerpos anti-MAdCAM pueden usarse para localizar tejido inflamado. La ventaja de los anticuerpos anti-MAdCAM de la presente invención es que no generarán una

respuesta inmune con la administración. El método comprende las etapas de administrar un anticuerpo anti-MAdCAM o una composición farmacéutica del mismo a un paciente que necesita tal ensayo diagnóstico y someter al paciente a un análisis por imagen para determinar la ubicación de los tejidos que expresan MAdCAM. El análisis por imagen es bien conocido por el arte médico, e incluye, sin limitación, análisis con rayos x, gammagrafía, diagnóstico por imagen con resonancia magnética (MRI), tomografía de emisión de positrones o tomografía computada (CT). En otra realización del método, en vez de someter al paciente a un análisis por imagen, se obtiene una biopsia del paciente para determinar si el tejido de interés expresa MAdCAM. En una realización preferida, los anticuerpos anti-MAdCAM pueden marcarse con un agente detectable que puede ser determinado en un paciente mediante análisis por imagen. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un agente de contraste, tal como bario, que puede usarse para análisis con rayos x, o un agente de contraste magnético, tal como un quelato de gadolinio, que puede usarse para MRI o CT. Otros agentes marcadores incluyen, sin limitación, radioisótopos, tal como ⁹⁹Tc. En otra realización, el anticuerpo anti-MAdCAM no estará marcado y será diagnosticado por imagen mediante la administración de un segundo anticuerpo u otra molécula que sea detectable y que pueda ligar el anticuerpo anti-MAdCAM.

[0193] Los anticuerpos anti-MAdCAM de la invención también pueden usarse para determinar los niveles de MAdCAM soluble presentes en sangre, suero, plasma u otro biofluido de un donante, incluyendo, pero no estando limitado a, una muestra de deposición, orina, esputo o biopsia. En una realización preferida, el biofluido es plasma. Luego, el biofluido se usa en un inmunoensayo para determinar niveles de MAdCAM soluble. MAdCAM soluble puede ser un marcador sustituto para una inflamación gastrointestinal en curso y el método de detección puede usarse como un marcador diagnóstico para medir la severidad de la enfermedad.

[0194] El método diagnóstico arriba descrito puede usarse para determinar si un individuo expresa altos niveles de MAdCAM soluble, lo que puede ser una indicación de que el individuo responderá bien al tratamiento con un anticuerpo anti-MAdCAM. Además, el método diagnóstico también puede usarse para determinar si el tratamiento de la enfermedad con anticuerpo anti-MAdCAM (vea más abajo) u otro agente farmacéutico tiene el efecto de que el individuo expresa niveles menores de MAdCAM, y de este modo el método puede usarse para determinar si el tratamiento es exitoso.

Inhibición de la adhesión $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM-dependiente mediante un anticuerpo anti-MAdCAM:

[0195] En otra realización, la invención provee un anticuerpo anti-MAdCAM que liga MAdCAM e inhibe la ligadura y adhesión de células que llevan la integrina $\alpha_4\beta_7$ a MAdCAM o de otros ligandos análogos, tal como L-selectina, a MAdCAM. En una realización preferida, la MAdCAM es humana y o es una forma soluble o es expresada sobre la superficie de una célula. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-MAdCAM es un anticuerpo humano. En otra realización, el anticuerpo o una porción del mismo inhibe la ligadura entre $\alpha_4\beta_7$ y MAdCAM con un valor de la IC_{50} no mayor de 50 nM. En una realización preferida, el valor de la IC_{50} no es mayor de 5 nM. En una realización más preferida, el valor de la IC_{50} es menor de 5 nM. En una realización más preferida, el valor de la IC_{50} es menor de 0,05 $\mu\text{g/mL}$, 0,04 $\mu\text{g/mL}$ o 0,03 $\mu\text{g/mL}$. En otra realización preferida, el valor de la IC_{50} es menor de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 0,4 $\mu\text{g/mL}$ o 0,3 $\mu\text{g/mL}$. El valor de la IC_{50} puede medirse mediante cualquier método conocido en el arte. Típicamente, el valor de la IC_{50} puede medirse mediante ELISA o un ensayo de adhesión. En una realización preferida, el valor de la IC_{50} se mide mediante un ensayo de adhesión usando células o tejidos que expresan MAdCAM naturalmente o células o tejidos que han sido fabricados mediante ingeniería genética para expresar MAdCAM.

Inhibición del reclutamiento de linfocitos para el tejido linfoide asociado al intestino mediante anticuerpos anti-MAdCAM

[0196] En otra realización, la invención provee un anticuerpo anti-MAdCAM que liga MAdCAM naturalmente expresado e inhibe la ligadura de linfocitos al tejido linfoide gastrointestinal especializado. En una realización preferida, el MAdCAM expresado naturalmente es MAdCAM humano o de primate y o se encuentra en una forma soluble, o es expresado sobre la superficie de una célula. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-MAdCAM es un anticuerpo humano. En otra realización, el anticuerpo o una porción del mismo inhibe el reclutamiento de linfocitos $\alpha_4\beta_7^+$ intestino-tróficos para tejidos que expresan MAdCAM con un valor de la IC_{50} no mayor de 5 mg/kg. En una realización preferida, el valor de la IC_{50} no es mayor de 1 mg/kg. En una realización más preferida, el valor de la IC_{50} es menor de 0,1 mg/kg. En una realización, puede determinarse el valor de la IC_{50} midiendo la relación dosis-efecto del reclutamiento de linfocitos de la sangre periférica marcados con tecnecio para el tracto gastrointestinal, usando gammagrafía o tomografía computarizada de emisión monofotónica. En otra realización, el valor de la IC_{50} puede determinarse midiendo en la circulación periférica el aumento en linfocitos $\alpha_4\beta_7^+$ intestino-tróficos,

tales como, pero no estando limitados a, células T de memoria $CD4^+ \alpha_4\beta_7^+$, usando citometría de flujo como una función de la dosis del anticuerpo anti-MAdCAM.

[0197] Con el fin de un mejor entendimiento de esta invención, se exponen los ejemplos siguientes. Estos ejemplos tienen solamente el propósito de ilustración y no deben ser interpretados como limitativos de cualquier modo del alcance de la invención.

EJEMPLO 1:

Generación de hibridomas que producen anti-MAdCAM

[0198] Se prepararon, ensayaron y seleccionaron anticuerpos de la invención de acuerdo con el presente Ejemplo.

Preparación del inmunógeno primario:

[0199] Se prepararon dos inmunógenos para la inmunización de ratones XenoMouse™: (i) una proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc y (ii) membranas celulares preparadas a partir de células transfectadas establemente con MAdCAM.

(i) Proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc

Construcción del vector de expresión:

[0200] Se escindió un fragmento de cDNA EcoRI/BglII que codifica el dominio maduro extracelular, similar a inmunoglobulina, de MAdCAM de un clon pINCY Incyte (3279276) y se clonó en sitios EcoRI/BamHI del vector pIG1 (Simmons, D. L. (1993) in *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*, ed. Hartley, D. A. (Oxford Univ. Press, Oxford), pp. 93-127.)) para generar una proteína de fusión IgG₁ Fc en el marco de lectura. El inserto resultante se cortó con EcoRI/NotI y se clonó en pCDNA3.1+ (Invitrogen). Se confirmó la secuencia del cDNA MAdCAM-IgG₁ Fc en el vector. La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc se muestra más abajo:

Proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc:

MDFGLALLLAGLLGLLLGQSLQVKPLQVEPPEPVVAVALGASRQLTCRLACADRGASV
QWRGLDTSLGAVQSDTGRSVLTVRNASLSAAGTRVCVGSCGGRTFQHTVQLLVYAFPD
QLTVSPAALVPGDPEVACTAHKVTPVDPNALSFSLLVGGQELEGAQALGPEVQEEEE
PQGD EDVLF RVTERWRLPPLGTPVPPALYCQATMRLPGLELSHRQAI PVLHSP TSPEP
PDTTSPESPDTTSPESPDTTSPQEPD TTSQEPD TTSQEPD TTSQEPD TTSPEPPDKTSPEPAP
QQGSTHTPRSPGSTRTRRPEIQPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL

VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 107)

Subrayado: péptido señal

Negrita: dominio extracelular MAdCAM

Expresión/purificación de la proteína recombinante:

[0201] Células CHO-DHFR se transfectaron con el vector pCDNA3.1+ que contiene el cDNA de la proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc y clones estables que expresan la proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc seleccionados en el medio de Iscove que contiene 600 µg/mL de G418 y 100 ng/mL de metotrexato. Para la expresión de la proteína, se sembró un bioreactor de fibra hueca con células CHO que expresan establemente MAdCAM-IgG₁ Fc en medio de Iscove que contiene 10% de suero bovino fetal de bajo título de IgG (Gibco), aminoácidos no esenciales (Gibco), glutamina 2 mM (Gibco), piruvato de sodio (Gibco), 100 µg/mL de G418 y 100 ng/mL de metotrexato y se usó para generar un sobrenadante del medio concentrado. La proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc se purificó a partir del sobrenadante cosechado mediante cromatografía de afinidad. Brevemente, el sobrenadante se aplicó a una columna HiTrap con proteína G sefarosa (5 mL, Pharmacia) (2 mL/min), se lavó con Tris 25 mM, pH 8, NaCl 150 mM (5 volúmenes de columna) y se eluyó con glicina 100 mM, pH 2,5 (1 mL/min), neutralizando inmediatamente las fracciones a pH 7,5 con Tris 1 M, pH 8. Las fracciones que contienen proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc se identificaron mediante SDS-PAGE, se reunieron y se aplicaron a una columna Sephacryl S100 (Pharmacia), pre-equilibrada con BisTris 35 mM, pH 6,5, NaCl 150 mM. La filtración por gel se realizó a 0,35 mL/min, recolectando un pico de proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc en aproximadamente 3 fracciones de 5 mL. Estas muestras se reunieron y se aplicaron a una columna Resource Q (6 mL, Pharmacia), pre-equilibrada en BisTris 35 mM, pH 6,5. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de Bis Tris 35 mM, pH 6,5, NaCl 150 mM (6 mL/min) y la proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc se eluyó en una fracción de 4-6 mL con Bis Tris 35 mM, pH 6,5, NaCl 400 mM. En esta etapa, la proteína tenía una pureza de 90% y migró como una banda simple a aproximadamente 68 kD mediante SDS-PAGE. Para su uso como inmunógeno y en todos los ensayos subsecuentes, el material se intercambió al buffer HEPES 25 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, NaCl 100 mM, glicerol al 50% y se almacenó en alícuotas a -80°C.

(ii) Membranas celulares que expresan establemente MAdCAM

[0202] Un fragmento SacI/NotI que comprende los nucleótidos 645-1222 de la secuencia MAdCAM publicada (Shyjan AM, et al., *J Immunol.*, 156, 2851-7 (1996))

se amplificó mediante PCR a partir de una biblioteca de cDNA de colon y se clonó en sitios de SacI/NotI del vector pIND-Hygro (Invitrogen). En esta construcción se subclonó un fragmento SacI, que comprende la secuencia codificadora 5'adicional, a partir de pCDNA3.1 MAdCAM-IgG₁ Fc, para generar el cDNA de MAdCAM de longitud completa. Luego se clonó un fragmento KpnI/NotI que contiene el cDNA de MAdCAM en los sitios correspondientes de un vector pEF5FRTV5GWCAT (Invitrogen) y reemplazando la secuencia codificadora CAT. Se verificó la secuencia del inserto de cDNA y se usó en transfecciones para generar clones simples de expresión estable en células FlpIn NIH 3T3 (Invitrogen) mediante la tecnología de Flp recombinasa, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se seleccionaron clones de expresión estable por su capacidad de sustentar la ligadura de una línea celular linfoblastoide B humana JY $\alpha_4\beta_7^+$ (Chan BM, et al. *J. Biol. Chem.*, 267:8366-70 (1992)), resumida más abajo. Del mismo modo se prepararon clones estables de células CHO que expresan MAdCAM, usando células FlpIn CHO (Invitrogen).

[0203] Se cultivaron células FlpIn NIH-3T3 que expresan MAdCAM en el medio de Eagle modificado por Dulbecco (Gibco) que contiene L-glutamina 2 mM, suero de ternero Donor al 10% (Gibco) y 200 μ g/mL de higromicina B (Invitrogen) y se expandieron en botellas con una gran superficie interior (roller bottles). Se cultivaron células FlpIn CHO que expresan MAdCAM en el medio de Ham F12 / medio de Eagle modificado por Dulbecco (Gibco) que contiene L-glutamina 2 mM, suero de ternero Donor al 10% (Gibco) y 350 μ g/mL de higromicina B (Invitrogen) y se expandieron en botellas "roller". Las células se cosecharon usando una solución de disociación celular no enzimática (Sigma) y por raspado, lavando en solución fisiológica con buffer de fosfato mediante centrifugación. Las membranas celulares se prepararon a partir de la pella celular mediante dos rondas de homogenización politron en Bis Tris 25 mM pH 8, MgCl₂ 10 mM, aprotinina al 0,015% (p/v), bacitracina 100 U/mL y centrifugación. La pella final se resuspendió en el mismo buffer, y se agregaron en alícuotas 50×10^6 equivalentes celulares en tubos eppendorf de pared gruesa y se centrifugaron a >100.000 g para generar pellas de membrana celular para la inmunización de ratones XenoMouse. El sobrenadante se decantó y las membranas se almacenaron en tubos eppendorf a -80°C hasta su uso. La confirmación de la expresión de proteína en las membranas celulares se determinó mediante SDS-PAGE y transferencia de Western con un anticuerpo anti-péptido de conejo dirigido contra los residuos N-terminales de MAdCAM ([C]-KPLQVEPPEP) (SEQ ID NO: 134).

Inmunización y generación de hibridomas:

[0204] Ratones XENOMOUSE™ de ocho a diez semanas de edad se inmunizaron intraperitonealmente o en las plantas de sus patas traseras con la proteína de fusión recombinante purificada MAdCAM-IgG₁ Fc (10 µg/dosis/ratón), o con membranas celulares preparadas a partir de células MAdCAM-CHO o células NIH 3T3 de expresión estable (10 x 10⁶ células/dosis/ratón). Esta dosis se repitió cinco a siete veces durante un período de tres a ocho semanas. Cuatro días antes de la fusión, los ratones recibieron una inyección final del dominio extracelular de MAdCAM humano en PBS. Los linfocitos del bazo y del nodo linfático de los ratones inmunizados se fusionaron con la línea celular no secretoria del mieloma P3-X63-Ag8.653 y se sometieron a selección en medio HAT como previamente descrito (Galfre y Milstein, *Methods Enzymol.* 73:3-46 (1981)). Se recuperó y se subclonó un panel de hibridomas que segregan todos anticuerpos IgG₂k e IgG₄k humanos específicos para MAdCAM. Doce subclones de hibridoma, 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 y 9.8.2, que producen anticuerpos monoclonales específicos para MAdCAM se recuperaron y se detectaron con ensayos descritos más abajo. Las líneas parentales 1.7, 1.8, 6.14, 6.22, 6.34, 6.67, 6.73, 6.77, 7.16, 7.20, 7.26 y 9.8, de las cuales se derivaron las líneas de hibridoma subclonado 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 y 9.8.2, tenían todas actividad anti-MAdCAM.

Ensayos ELISA:

[0205] La detección de anticuerpos antígeno-específicos en suero de ratón y sobrenadante de hibridoma se determinó mediante ELISA según lo descrito (Coligan et al., Unit 2.1 "Enzyme-linked immunosorbent assays," in *Current Protocols in Immunology* (1994)) utilizando la proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc para captar los anticuerpos. Para los animales que se inmunizaron con proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc, los anticuerpos se clasificaron según su reactividad no específica contra IgG₁ humana y su capacidad para ligarse a células FlpIn CHO MAdCAM mediante citometría de flujo.

[0206] En un ensayo ELISA preferido, se usan las técnicas siguientes:

[0207] Placas ELISA se recubrieron durante la noche a 4°C con 100 µL/cavidad de proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc (4,5 µg/mL), conteniendo las placas buffer (buffer de carbonato / bicarbonato de sodio 100 mM, pH 9,6). Después de la incubación, se sacó el buffer de recubrimiento y la placa se bloqueó con 200 µL/cavidad de buffer de bloqueo (5% de BSA, 0,1% de Tween 20, en solución fisiológica con buffer de fosfato) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora.

El buffer de bloqueo se separó y se agregaron durante 2 horas a temperatura ambiente 50 μ L/cavidad de sobrenadante de hibridoma u otro suero o sobrenadante (*por ejemplo*, control positivo). Después de la incubación, la placa se lavó con PBS (3 x 100 μ L/cavidad) y se detectó la ligadura del mAb del hibridoma con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (es decir, IgG₂-HRP anti-humana de ratón 1:1000 (Cat. SB No. 9060-05) para anticuerpos IgG₂ o IgG₄-HRP anti-humana de ratón 1:1000 (Cat. Zymed No. 3840) para anticuerpos IgG₄) diluídos en PBS. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavaron en PBS (3 x 100 μ L/cavidad) y finalmente se desarrollaron con 100 μ L de OPD (o-fenilendiamina (DAKO S2405) + 5 μ L de H₂O₂ al 30% / 12 mL). Las placas se dejaron desarrollar durante 10-20 minutos, deteniendo la reacción con 100 μ L de H₂SO₄ 2 M. Las placas se leyeron a 490 nm.

Ensayos de adhesión:

[0208] Anticuerpos que mostraron mediante ELISA una ligadura a la proteína de fusión MAdCAM-IgG1 Fc se evaluaron por su actividad antagonista en ensayos de adhesión con células JY $\alpha_4\beta_7^+$ y (i) proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc o (ii) células MAdCAM-CHO.

(i) Ensayo con la proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc

[0209] 100 μ L de una solución de 4,5 μ g/mL de proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc en PBS de Dulbecco se adsorbieron sobre placas Black Microfluor "B" de fondo en blanco con 96 cavidades (Dynex #7805) durante la noche a 4°C. Luego, las placas recubiertas con MAdCAM se invirtieron y se separó el exceso de líquido con papel secante, antes de bloquear a 37°C durante al menos 1 hora en BSA/PBS al 10%. Durante este tiempo se contaron células JY cultivadas utilizando selección con azul de triptano (debe haber aproximadamente 8×10^5 células/mL) y en un tubo de centrifuga de 50 mL se pipetearon 20×10^6 células/placa de ensayo. Las células JY se cultivaron en medio RPMI1640 (Gibco), que contiene L-glutamina 2 mM y suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Life Technologies #10108-165), y se sembraron a $1-2 \times 10^5$ /mL cada 2-3 días para prevenir la diferenciación del cultivo. Las células se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 (Gibco) que contiene L-glutamina 2 mM (Gibco) mediante centrifugación (240 g), resuspendiendo la pella celular final a 2×10^6 células/mL en RPMI 1640 para cargar calceína AM. A las células se agregó calceína AM (sondas moleculares #C-3099) en la forma de una dilución 1:200 en DMSO (concentración final aproximadamente 5 μ M) y las células se protegieron de la luz durante la incubación (37°C durante 30 min). Durante esta etapa de incubación de

las células, los anticuerpos a ser ensayados se diluyeron como sigue: para el ensayo de una sola dosis, los anticuerpos se llevaron a la concentración de 3 $\mu\text{g/mL}$ (1 $\mu\text{g/mL}$ final) en 0,1 mg/mL de BSA (Sigma#A3059) en PBS; para curvas completas de IC_{50} , los anticuerpos se diluyeron en 0,1 mg/mL de BSA/PBS, siendo la concentración máxima de 3 $\mu\text{g/mL}$ (1 $\mu\text{g/mL}$ final), luego se duplicaron las diluciones (relación 1:2) a través de la placa. La cavidad final de la fila se usó para determinar ligadura total, de modo que se usó 0,1 mg/ml de BSA en PBS.

[0210] Después del bloqueo, se sacó el contenido de la placa golpeando ligeramente, y a cada placa se agregaron 50 μL de anticuerpos/controles y se incubó a 37°C durante 20 minutos. Durante este tiempo, células JY cargadas con calceína se lavaron con centrifugación, una vez con medio RPMI 1640 que contiene 10% de suero bovino fetal y una vez con BSA/PBS 1 mg/mL, resuspendiendo la pella celular final en 1 mg/mL de BSA/PBS a la concentración de 1×10^6 mg/mL. A cada cavidad de la placa con fondo en U se agregaron 100 μL de células, la placa se cerró, se centrifugó brevemente (1000 rpm durante 2 min) y luego se incubó la placa a 37°C durante 45 min. Después de este tiempo, las placas se lavaron con un lavador de placas Skatron y se midió la fluorescencia con un instrumento Wallac Victor² 1420 Multilabel Reader (excitación λ 485nm, emisión λ 535nm, conteo desde arriba, 8 mm desde el fondo de la placa, durante 0,1 seg con apertura de emisión normal). Para cada concentración de anticuerpo, el porcentaje de adhesión se expresó como un porcentaje de la respuesta máxima de fluorescencia en ausencia de cualquier anticuerpo menos la fluorescencia asociada con ligadura no específica. El valor IC_{50} se define como la concentración de anticuerpo anti-MAdCAM a la cual la respuesta de adhesión está disminuída al 50% de la respuesta en ausencia de anticuerpo anti-MAdCAM. Se consideró que los anticuerpos capaces de inhibir la ligadura de células JY a la proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc con un valor $\text{IC}_{50} < 0,1$ $\mu\text{g/mL}$ tienen una actividad antagonista potente y estos anticuerpos se pasaron al ensayo de adhesión a MAdCAM-CHO. Todos los doce anticuerpos ensayados mostraron una actividad antagonista potente (Tabla 3). Los anticuerpos monoclonales 1.7.2, 1.8.2, 7.16.6, 7.20.5 y 7.26.4 se derivaron de las líneas IgG₂ κ , y los anticuerpos monoclonales 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1 y 9.8.2 se derivaron de las líneas IgG₄ κ .

(ii) Ensayo de adhesión a células MAdCAM-CHO

[0211] Se cultivaron células JY según lo descrito precedentemente. Las células CHO que expresan MAdCAM se generaron con la construcción pEF5FRT cDNA de MAdCAM y usando la tecnología de Flp recombinasa (Invitrogen) según lo descrito

precedentemente. Se seleccionaron clones individuales estables de células CHO que expresan MAdCAM en base a su capacidad de sostener la adhesión de células JY y la ligadura, mediante citometría de flujo, del anticuerpo antipeptido de conejo dirigido contra el N-terminal de MAdCAM y descrito precedentemente. Células CHO que expresan MAdCAM se cultivaron en un medio DMEM/F12 (Gibco # 21331-020) que contiene L-glutamina 2 mM, suero bovino fetal al 10% (Gibco) e higromicina B 350 µg/mL (Invitrogen), dividiendo 1:5 cada 2/3 días. Para el ensayo de adhesión, las células CHO que expresan MAdCAM se sembraron a 4×10^4 células/cavidad en placas negras de 96 cavidades con fondo claro (Costar # 3904) en 200 µL de medio de cultivo y se cultivaron durante la noche a 37°C / 5% de CO₂.

[0212] Al día siguiente, un sobrenadante de hibridoma o un anticuerpo monoclonal purificado se diluyó desde una concentración inicial de 30 µg/mL (equivalente a una concentración final de 10 µg/mL) en 1 mg/mL de BSA/PBS, según lo descrito previamente. Se sacó el contenido de las placas con MAdCAM CHO golpeando ligeramente, se agregaron 50 µL de anticuerpos/controles a cada placa y se incubó a 37°C durante 20 min. La cavidad final de la fila se usó para determinar la ligadura total, de modo que se usó 0,1 mg/mL de BSA en PBS. Se prepararon células JY cargadas con calceína AM con una concentración final de 1×10^6 /mL en BSA/PBS 1 mg/mL según lo arriba indicado, luego se agregaron a la placa 100 µL después del período de incubación de 20 min con el anticuerpo. Luego, la placa se incubó a 37°C durante 45 min, se lavó con un lavador de placas Tecan (PW 384) y se midió la fluorescencia con un lector de placas Wallac según lo descrito precedentemente. Para cada concentración de anticuerpo, el porcentaje de adhesión se expresó como un porcentaje de la respuesta máxima de fluorescencia en ausencia de cualquier anticuerpo menos la fluorescencia asociada con ligadura no específica. Se consideró que los anticuerpos capaces de inhibir la ligadura de células JY a células MAdCAM CHO con un valor $IC_{50} < 1$ µg/mL tienen una actividad antagonista potente. Como antes, el valor IC_{50} se define como la concentración de anticuerpo anti-MAdCAM a la cual la respuesta de adhesión está disminuída al 50% de la respuesta en ausencia de anticuerpo anti-MAdCAM. Las potencias IC_{50} para 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 y 9.8.2 en este ensayo se describen en la Tabla 3 siguiente.

Tabla 3. Valores IC_{50} de anticuerpos anti-MAdCAM ejemplificados

Clon	Proteína de fusión MAdCAM IgG ₁ Fc IC_{50} promedio (µg/mL) n	Ensayo MAdCAM FlpIn CHO IC_{50} promedio (µg/mL) n
1.7.2	0.030 ± 0.011 6	0.502 ± 0.280 9

[0213] Para medir la potencia antagonista de anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-MAdCAM en ensayos a base de flujometría, bajo condiciones de stress por cizallamiento diseñadas para mimetizar el efecto del ambiente microvascular sobre las vénulas altas endoteliales que irrigan el tejido linfoide asociado con el intestino, se depositaron células CHO que expresan MAdCAM sobre microportaobjetos (microslides) de vidrio (50 x 4 mm) y se dejaron adherir las células para formar una monocapa confluyente (*aprox.* $2,5 \times 10^5$ células). Luego, las células se incubaron con una gama de concentraciones (0,1-10 $\mu\text{g/mL}$) de un cuerpo monoclonal purificado por afinidad durante 20 minutos a 37°C, antes de la conexión con el sistema de determinación de flujo. Como control negativo se usó un anticuerpo monoclonal del isotipo IgG₂ o IgG₄ (10 $\mu\text{g/mL}$). La monocapa celular se perfusionó con linfocitos de la sangre periférica (peripheral blood lymphocytes = PBLs) de un donante normal con un stress por cizallamiento constante de 0,05 Pa. Los experimentos se grabaron en vídeo y se calculó la adhesión total de los linfocitos (rodadura + adhesión firme). Se mostró que todos los anticuerpos monoclonales ensayados eran antagonistas potentes bajo las condiciones descritas.

(iii) Ensayos Stamper-Woodruff

[0214] Para visualizar vasos MAdCAM⁺, se generaron anticuerpos monoclonales anti-MAdCAM biotinilados sobre 1-2 mg de proteína purificada por afinidad, usando un exceso 20 molar de biotina-NHS (Pierce) en solución fisiológica con buffer de fosfato, según las instrucciones del fabricante. La reacción se deja proceder a temperatura ambiente (30 min), se desmineralizó con una columna PD-10 (Pharmacia) y se determinó la concentración de la proteína.

[0215] Nodos linfáticos de hígado normal se separaron del órgano de un donante, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta el uso. Previo al ensayo se cortaron secciones criostáticas de 10 μm , se secaron con aire sobre portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina y se fijaron en acetona. Las secciones se bloquearon usando un sistema de bloqueo con avidina-biotina (DAKO) y luego se incubaron con una gama de concentraciones (1-50 $\mu\text{g/mL}$) de anticuerpo monoclonal anti-MAdCAM biotinilado a temperatura ambiente (2 h). Como control negativo se usó un anticuerpo monoclonal del tipo IgG₂ o IgG₄ (50 $\mu\text{g/mL}$) y como control positivo se usó un anticuerpo anti- β_7 bloqueante (50 $\mu\text{g/mL}$).

[0216] Linfocitos de sangre periférica, tomados de donantes normales, se marcaron con mAb CD2 anti-humano de ratón (DAKO) para posibilitar la visualización subsecuente de células adherentes. 5×10^5 PBLs se agregaron a cada sección del nodo linfático y se incubaron durante 30 minutos antes de enjuagar suavemente para

evitar el desprendimiento de células adheridas. Luego las secciones se refijaron en acetona y se reincubaron con mAb anti-MAdCAM biotinilado (10 $\mu\text{g/mL}$), seguido de mAb anti-ratón de cabra biotinilado (para reconocer PBLs marcados con CD2 y vasos MAdCAM⁺ sin teñir) y luego del complejo streptABcomplex/HRP (DAKO). Finalmente, los vasos MAdCAM⁺ y las PBLs marcados con CD2 se visualizaron mediante el agregado de sustrato DAB (DAKO) a las secciones, señalando un producto de reacción marrón las áreas de coloración positiva. La adhesión de linfocitos fue cuantificada mediante el conteo del número de linfocitos que se adhirieron a 50 vasos MAdCAM-1⁺ de tractos portales, venas o sinusoides. Los datos, expresados como valores promedio, luego se normalizaron a porcentajes de adhesión, tomando la adhesión de PBLs en ausencia de cualquier anticuerpo como 100%. Los datos se compilaron sobre la base de $n = 3$ donantes diferentes de PBL y para donantes diferentes de nodos linfáticos del hígado. Datos representativos para los anticuerpos monoclonales purificados biotinilados 1.7.2 y 7.16.6 se representan en la Figura 4 en comparación de un control de anticuerpo anti- β_7 bloqueante.

Ensayos de selectividad:

[0217] VCAM y fibronectina tienen una estructura cercana y secuencias homólogas a MAdCAM. Se evaluaron anticuerpos monoclonales anti-MAdCAM purificados por afinidad por su especificidad para MAdCAM mediante la determinación de su capacidad de bloquear la ligadura de células T Jurkat $\alpha_4\beta_1^+/\alpha_5\beta_1^+$ (ATCC) a su molécula de adhesión celular análoga. 100 μL de una solución de 4,5 $\mu\text{g/mL}$ de un fragmento de ligadura celular de fibronectina (110 Kd, Europa Bioproducts Ltd, Cat. No. UBF4215-18) o de VCAM (Panvera) en PBS de Dulbecco se adsorbieron sobre placas Black Microfluor "B" de fondo en U con 96 cavidades (Dynex #7805) durante la noche a 4°C. Luego, las placas recubiertas se invirtieron y se separó el exceso de líquido, antes de bloquear a 37°C durante al menos 1 hora en BSA/PBS al 10%. Durante este tiempo se contaron células T Jurkat cultivadas mediante exclusión con azul triptano y se cargaron con colorante calceína AM según lo descrito previamente para células JY. Los anticuerpos a ser ensayados se diluyeron en 0,1 mg/mL de BSA en PBS, comenzando con una concentración máxima de 10 $\mu\text{g/mL}$. La cavidad final de la fila se usó para determinar ligadura total, de modo que se usó 0,1 mg/ml de BSA en PBS. Se usó una preparación de Echistatin (Bachem, Cat. No. H-9010) en PBS con una concentración máxima de 100 nM para bloquear la interacción $\alpha_5\beta_1$ /fibronectina. Se usó un mAb anti-CD106 (Clon 51-10C9, BD Pharmingen Cat. No. 555645) con una concentración máxima de 1 $\mu\text{g/mL}$ para bloquear la interacción $\alpha_4\beta_1$ /VCAM.

[0218] Después del bloqueo, se sacó el contenido de la placa mediante golpeo ligero y se agregaron a cada cavidad 50 µL de anticuerpos/controles y se incubó la placa a 37°C durante 20 min. Las células T Jurkat cargadas con calceína se lavaron una vez como antes, resuspendiendo la pella celular final hasta 1x10⁶/mL en BSA/PBS 1 mg/mL. A cada cavidad de la placa con fondo en U se agregaron 100 µL de células, la placa se cerró, se centrifugó brevemente (1000 rpm durante 2 min) y luego se incubó la placa a 37°C durante 45 min. Después de este tiempo, las placas se lavaron con un lavador de placas Skatron y se midió la fluorescencia con un lector de placas Wallac Victor² 1420 Multilabel Reader (excitación λ485nm, emisión λ535nm, conteo desde arriba, 8 mm desde el fondo de la placa, durante 0,1 seg con apertura de emisión normal). En la Tabla 4 siguiente se expresa gráficamente el grado de inhibición para cada anticuerpo (- significa inhibición de la adhesión insignificante, ***significa inhibición de la adhesión completa). Todos los anticuerpos monoclonales ejemplificados son antagonistas anti-MAdCAM potentes y selectivos, mostrando una selectividad para MAdCAM substancialmente mayor de 100 veces que VCAM y fibronectina.

Tabla 4. Selectividad comparativa del anticuerpo anti-MAdCAM para MAdCAM con respecto a otras moléculas de adhesión celular, fibronectina y VCAM

Clon	Inhibición en el ensayo de α5β1/fibronectina (10 µg/mL)	Inhibición en el ensayo de α4β1/VCAM (10 µg/mL)	Inhibición en el ensayo de α4β7/MAdCAM (0,1 µg/mL)
1.7.2	-	-	***
1.8.2	-	-	***
7.16.6	-	-	***
7.20.5	-	-	***
7.26.4	-	-	***
6.14.2	-	-	***
6.22.2	-	-	***
6.34.2	-	-	***
6.67.1	-	-	***
6.73.2	-	-	***
6.77.1	-	-	***

9.8.2	-	-	***
-------	---	---	-----

[0219] El 9 de septiembre de 2003 se depositaron hibridomas en la colección “European Collection of Cell Cultures” (ECACC), H.P.A en CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG con los siguientes números de depósito:

Hibridoma	No. de depósito
1.7.2	03090901
1.8.2	03090902
6.14.2	03090903
6.22.2	03090904
6.34.2	03090905
6.67.1	03090906
6.73.2	03090907
6.77.1	03090908
7.16.6	03090909
7.20.5	03090910
7.26.4	03090911
9.8.2	03090912

EJEMPLO II:

Determinación de constantes de afinidad (K_d) de anticuerpos monoclonales anti-MAdCAM completamente humanos mediante BIAcore

[0220] Realizamos mediciones de afinidad de anticuerpos purificados mediante resonancia en la superficie de un plasmón usando el instrumento BIAcore 3000, siguiendo los protocolos del fabricante.

Protocolo 1

[0221] Para realizar análisis cinéticos, se preparó una superficie de anticuerpo anti-humano de ratón (IgG₂ e IgG₄) de alta densidad sobre un chip sensor CM5 BIAcore usando copulación de amina rutinaria. Los sobrenadantes de hibridoma se diluyeron 10, 5 y 2 veces en buffer de corrimiento HBS-P (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, agente tensoactivo P20 al 0,005%) que contiene 100 µg/mL de BSA y 10 mg/mL de carboximetildextrano o se utilizaron puros. Cada mAb se capturó sobre una superficie separada utilizando un tiempo de contacto de 1 min y un lavado de 5 min para estabilizar la línea base del mAb. Luego se inyectó proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc (141 nM) en todas las superficies durante un minuto, seguido de

una disociación durante 3 min. Los datos se normalizaron para la cantidad de anticuerpo capturada sobre cada superficie y se evaluaron con ajuste global Langmuir 1:1, usando modelos de desplazamiento de la línea base disponibles en el software de BIAevaluación provisto por BIAcore.

Protocolo 2

[0222] Un mAb purificado por afinidad se inmovilizó sobre la capa de dextrano de un chip biosensor CM5 usando copulación de amina. Los chips se prepararon utilizando como buffer de inmovilización un buffer de acetato de pH 4,5 y se lograron densidades de proteína de 2,5-5,5 kRU. Se prepararon muestras de proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc en buffer de corrimiento a concentraciones en la gama de 0,2-55 nM (como referencia cero se incluyó una solución 0 nM que comprende solamente buffer de corrimiento). Las muestras se aleatorizaron y se inyectaron cada una por duplicado durante 3 minutos en 4 celdas de flujo, usando como buffer de corrimiento HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, agente tensoactivo P20 al 0,005%). Se utilizó una velocidad de flujo de 100 µL/min para minimizar las limitaciones debidas al transporte de masas. La disociación de la proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc se monitoreó durante 180 min, se regeneró la superficie mediante una inyección durante 6 seg de H₃PO₄ 25 mM (50 µL/min), o NaOH 10 mM (6.22.2), 20 mM (6.67.1, 6.73.2, 6.77.1) a 25 mM (6.34.2) y 45 mM (6.14.2) y se analizaron los datos usando el paquete de software BIAevaluación (v3.1).

[0223] La Tabla 5 enumera mediciones de afinidad para anticuerpos anti-MAdCAM representativos de la presente invención:

Tabla 5. Determinación de la constante de afinidad, K_d , mediante resonancia en la superficie de un plasmón (BIAcore)

CLON	Protocolo 1			Protocolo 1		
	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (pM)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (pM)
1.7.2	2.4×10^5	1×10^{-5}	42	5.5×10^3	1.3×10^{-7}	23.6
1.8.2	2.9×10^5	1×10^{-5}	35	1.8×10^5	2.3×10^{-5}	128
7.16.6	1.5×10^6	2.2×10^{-6}	1.5	2.9×10^5	1.4×10^{-6}	4.8
7.20.5	4.5×10^5	1.9×10^{-5}	42.2	1.6×10^5	1.2×10^{-5}	75
7.26.4	9.6×10^5	2.6×10^{-4}	271	1.5×10^5	1.2×10^{-5}	80
6.14.2	1.3×10^5	1×10^{-5}	7.7	5×10^5	$< 5 \times 10^{-6}$	< 10
6.22.2	1.5×10^6	1.4×10^{-5}	9.3	2.3×10^5	8.7×10^{-7}	3.8
6.34.2	1.2×10^6	1.9×10^{-5}	15.8	3.3×10^5	$< 5 \times 10^{-6}$	< 15
6.67.1	5.9×10^5	1×10^{-5}	17	2.4×10^5	$< 5 \times 10^{-6}$	< 20
6.73.2	1.4×10^5	1.3×10^{-4}	93			
6.77.1	1.5×10^5	1×10^{-5}	6.7			
9.8.2	2.3×10^6	2.3×10^{-4}	100	4.4×10^5	1.4×10^{-5}	32.5

IgG2
IgG4

[0224] Los análisis cinéticos indican que los anticuerpos preparados de acuerdo con la invención poseen elevadas afinidades y fuertes constantes de ligadura para el dominio extracelular de MAdCAM.

EJEMPLO III:

Identificación de selectividad para epítopes y reactividad cruzada con especies de anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-MAdCAM

[0225] Los anticuerpos reconocen epítopes expuestos sobre la superficie de antígenos como regiones de secuencia lineal (primaria) o secuencia estructural (secundaria). Con el fin de definir el panorama funcional de epítopes de los anticuerpos anti-MAdCAM, se usaron conjuntamente el agrupamiento de epítopes en base a Luminex (Luminex epitope binning), el agrupamiento en base a BIAcore y el análisis inmunohistoquímico de especies.

Agrupamiento de epítopes (Epitope Binning) en base a Luminex:

[0226] Perlas conjugadas con MxhlgG 2,3,4 (Calbiochem MI 1427) se copularon con el anticuerpo primario desconocido anti-MAdCAM. Agregamos 150 μ L de la dilución del anticuerpo desconocido (0,1 μ g/mL diluidos en medio de hibridoma) a la cavidad de una placa para cultivo de tejidos de 96 cavidades. El material de perlas se agitó suavemente con movimiento circular y se diluyó en sobrenadante hasta una

concentración de $0,5 \times 10^5$ perlas/mL. Las perlas se incubaron en el sobrenadante sobre un agitador en la oscuridad durante la noche a 4°C .

[0227] Cada cavidad de una placa filtrante para microtitulación de 96 cavidades (Millipore # MABVN1250) se prehumedeció mediante el agregado de 200 μL de buffer de lavado (PBS que contiene 0,05% de Tween20) y se retiró el exceso por aspiración. Luego, se agregaron a la placa filtrante 50 μL /cavidad del material de $0,5 \times 10^5$ perlas/mL y se lavaron las cavidades con buffer de lavado ($2 \times 100 \mu\text{L}$ /cavidad). Se agregaron 60 μL /cavidad de antígeno MAdCAM-IgG₁ Fc diluídos en medio de hibridoma (0,1 $\mu\text{g/mL}$). Las placas se cubrieron y se incubaron a temperatura ambiente con sacudimiento suave durante una hora. Las placas se lavaron dos veces mediante el agregado de 100 μL /cavidad de buffer de lavado seguido de aspiración. Luego, agregamos 60 μL /cavidad de anticuerpo anti-MAdCAM secundario desconocido diluido en medio de hibridoma (0,1 $\mu\text{g/mL}$). Las placas se sacudieron a temperatura ambiente en la oscuridad durante dos horas. Luego, las placas se lavaron dos veces mediante el agregado de 100 μL /cavidad de buffer de lavado seguido de aspiración. Luego, se agregaron 60 μL /cavidad de MxhIgG 2,3,4 biotinilado (0,5 $\mu\text{g/mL}$). Las placas se sacudieron a temperatura ambiente en la oscuridad durante una hora. Las cavidades se lavaron dos veces mediante el agregado de 100 μL /cavidad de buffer de lavado seguido de aspiración. A cada cavidad se agregaron 60 μL de 1 $\mu\text{g/mL}$ de MxhIgG 2,3,4 Streptavidin-PE (Pharmacia #554061) diluídos en medio de hibridoma. Las placas se sacudieron a temperatura ambiente en la oscuridad durante veinte minutos. Las cavidades se lavaron dos veces mediante el agregado de 100 μL /cavidad de buffer de lavado seguido de aspiración. Luego, cada cavidad se resuspendió en 80 μL de buffer de bloqueo (PBS con 0,5% de albúmina de suero bovino, 0,1% de TWEEN y 0,01% de Thimerosal) y se pipeteó cuidadosamente con movimiento ascendente y descendente para resuspender las perlas.

[0228] Utilizando Luminex 100 y el software que lo acompaña (Luminex® Corporation) se leyeron las placas para determinar lecturas de luminiscencia. En base a los datos de luminiscencia obtenidos para los varios anticuerpos anti-MAdCAM ensayados, los anticuerpos anti-MAdCAM se agruparon de acuerdo con sus especificidades de ligadura. Los anticuerpos anti-MAdCAM ensayados caen dentro de una serie de grupos de epítipo (epitope bins), representados en la Tabla 8.

Agrupamiento BIAcore:

[0229] En un método similar al arriba descrito, también puede usarse BIAcore para determinar la exclusividad para epítipes de los anticuerpos anti-MAdCAM ejemplificados por esta invención. Nueve clones de anticuerpo anti-MAdCAM,

6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1, 7.20.5, 9.8.2, 1.7.2, 7.26.4 y 7.16.6, se inmovilizaron sobre la capa de dextrano de celdas de flujo separadas de un chip biosensor CM5 usando copulación de amina. El buffer de inmovilización fue un buffer de acetato 10 mM, pH 4,5 (clones 6.22.2, 6.34.2, 7.20.5, 9.8.2, 1.7.2, 7.26.4 y 7.16.6) o un buffer de acetato 10 mM, pH 5,5 (clones 6.67.1 y 6.77.1). En todos los casos se logró una densidad de proteína de aproximadamente 3750 RU. La desactivación de ésteres de N-hidroxisuccinimida sin reaccionar se realizó usando clorhidrato de etanolamina 1 M, pH 8,5.

[0230] La proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc se diluyó a una concentración de 1,5 µg/mL (aproximadamente 25 nM) en buffer de corrimiento HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Polisorbato 20 al 0,005%). Luego se inyectó a través de la primera celda de flujo, en un volumen de 50 µL a una velocidad de 5 µL/min. Una vez completada la inyección, se agregó la primera sonda de anticuerpo a la misma celda de flujo. Todos los anticuerpos de ensayo se diluyeron a una concentración de aproximadamente 20 µg/mL en HBS-EP, y también se inyectaron en un volumen de 50 µL con un caudal de 5 µL/min. Cuando no se observó ninguna ligadura del anticuerpo de ensayo, se inyectó el próximo clon de ensayo inmediatamente después. Cuando se produjo ligadura, se regeneró la superficie del sensor para separar ambos, la proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc y el anticuerpo de ensayo. Se usaron varias soluciones de regeneración en dependencia del anticuerpo inmovilizado y el anticuerpo de ensayo presente. Un resumen de las condiciones de regeneración usadas se representa en la Tabla 6.

Tabla 6. Resumen de las condiciones de regeneración usadas para realizar la elaboración de mapas de epítopes en base a BIAcore

Anticuerpo inmovilizado	Sonda de anticuerpo a ser separada	Solución de regeneración	Volumen de inyección
7.16.6	6.22.2	Ácido fosfórico 40 mM	20 µL
	6.34.2	Ácido fosfórico 40 mM	40 µL
	7.20.5	Ácido fosfórico 40 mM	20 µL
6.77.1	9.8.2	Ácido fosfórico 40 mM	10 µL
	1.7.2	Ácido fosfórico 40 mM	5 µL
	7.16.6	Ácido fosfórico 40 mM	10 µL
1.7.2	6.77.1	Ácido fosfórico 25 mM	5 µL
	9.8.2	Ácido fosfórico 25 mM	5 µL
	7.20.5	Ácido fosfórico 25 mM	5 µL
	6.22.2	Ácido fosfórico 25 mM	5 µL
	6.34.2	Hidróxido de sodio 25 mM	5 µL
	6.67.1	Hidróxido de sodio 25 mM	5 µL
6.22.2	9.8.2	Hidróxido de sodio 25 mM	20 µL
	7.26.4	Hidróxido de sodio 25 mM	5 µL
6.34.2	9.8.2	Hidróxido de sodio 25 mM	70 µL
	1.7.2	Hidróxido de sodio 40 mM	5 µL
	7.26.4	Hidróxido de sodio 40 mM	5 µL
6.67.1	9.8.2	Hidróxido de sodio 40 mM	5 µL
	1.7.2	Hidróxido de sodio 40 mM	5 µL

7.20.5	9.8.2	Ácido fosfórico 25 mM	5 µL
	1.7.2	Ácido fosfórico 25 mM	5 µL
	7.26.4	Ácido fosfórico 25 mM	5 µL
7.26.4	9.8.2	Hidróxido de sodio 40 mM	20 µL
	6.22.2	Ácido fosfórico 75 mM	20 µL
	7.20.5	Ácido fosfórico 75 mM	20 µL
	7.16.6	Ácido fosfórico 75 mM	20 µL
9.8.2	9.8.2	Ácido fosfórico 25 mM	15 µL
	6.22.2	Ácido fosfórico 25 mM	10 µL
	7.20.5	Ácido fosfórico 25 mM	20 µL
	7.16.6	Ácido fosfórico 25 mM	10 µL

(El caudal fue 50 µL/min durante todos los procedimientos de regeneración)

[0231] Después de la regeneración, la proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc se ligó nuevamente y se inyectaron anticuerpos de ensayo adicionales. Estos procedimientos se llevaron a cabo hasta inyectar el panel entero de clones sobre la superficie del anticuerpo inmovilizado con la proteína de fusión MAdCAM-IgG₁ Fc ligada. Luego se usó una nueva celda de flujo con un anticuerpo inmovilizado diferente y MAdCAM ligado para ensayar con los nueve clones de ensayo. Se esperó que los anticuerpos anti-MAdCAM 1.7.2 y 1.8.2 reconocieran el mismo epítope MAdCAM, en base a la homología cercana de las secuencias de aminoácidos primarias de sus cadenas pesada y liviana kappa, SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, respectivamente. Por lo tanto, se evaluó solo 1.7.2 mediante la matriz de respuesta BIAcore. Los anticuerpos 6.14.2 y 6.73.2 se omitieron de este análisis, pero todas las demás combinaciones de pares de anticuerpos anti-MAdCAM se ensayaron de este modo. Se eligió un nivel arbitrario de 100 RU como umbral entre ligadura / no ligadura y se creó una matriz de respuesta (Tabla 7) en base a la observación positiva o negativa de ligadura.

Tabla 7. Matriz de respuesta de agrupamiento de epítopes en base a BIAcore

Anticuerpo inmovilizado	Anticuerpo secundario								
	6.22.2	6.34.2	6.67.1	6.77.1	7.20.5	9.8.2	1.7.2	7.26.4	7.16.6
6.22.2	-	-	-	-	-	x	x	x	x
6.34.2	-	-	-	-	-	x	x	x	x
6.67.1	-	-	-	-	-	x	x	-	-
6.77.1	-	-	-	-	-	x	x	-	x
7.20.5	-	-	-	-	-	x	x	x	x
9.8.2	x	x	x	x	x	-	-	-	x
1.7.2	x	x	x	x	x	x	-	-	x
7.26.4	x	x	-	-	x	x	-	-	x
7.16.6	x	x	-	-	x	-	-	-	x

Matriz de respuesta para todas las combinaciones de pares de anticuerpos. - indica no ligadura de la sonda de anticuerpo, x indica que se observó ligadura (por encima de un nivel umbral seleccionado de 100 RU).

[0232] La diagonal de la matriz en la Tabla 7 (sombreada en gris) contiene los datos de ligadura para pares de sondas idénticas. En todos los casos, con excepción de los dos clones 7.16.6 y 9.8.2, los anticuerpos eran autobloqueantes. Los anticuerpos 7.16.6 y 9.8.2 no compiten en forma cruzada. La ausencia del efecto autobloqueante puede deberse a un cambio conformacional inducido por el anticuerpo monoclonal en la proteína de fusión que permite que el anticuerpo monoclonal se ligue adicionalmente a un segundo sitio sobre MAdCAM-IgFc.

El agrupamiento de los clones que muestran el mismo molde de reactividad da lugar a al menos seis agrupamientos de epítopos diferentes, según lo mostrado en la representación gráfica, Figura 5.

[0233] Puede determinarse una identificación precisa adicional de las secuencias de epítipo de MAdCAM con las cuales interactúa un anticuerpo anti-MAdCAM mediante varios métodos, incluyendo, pero no estando limitados a, análisis Western de arreglos punteados de bibliotecas de péptidos (Reineke et al., *Curr. Topics in Microbiol. and Immunol* 243: 23-36, (1999), M. Famulok, E-L Winnacker, C-H Wong eds., Springer-Verlag, Berlin), expresión en fago o flagellin/*fliC* bacteriano de una biblioteca, o simplemente análisis MALDI-TOF de fragmentos de proteína ligada seguido de proteólisis limitada.

Ensayos inmunohistoquímicos:

[0234] Muestras de tejido congelado embebido con OCT o sacarosa de ileo (parches de Peyer), nodo linfático mesentérico, bazo, estómago, duodeno, jejunio y colon se usaron como controles de coloración positivos para los anticuerpos monoclonales anti-MAdCAM. Para colorear secciones humanas con mAbs IgG₂ humanos, se generaron derivados biotinilados de los mAbs anti-MAdCAM. Secciones de 10 µm de tejido congelado se cortaron sobre portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina, se colocaron directamente en acetona al 100% a 4°C (10 min), luego en agua oxigenada al 3% en metanol (10 min), lavando entre las etapas con PBS. Los portaobjetos se bloquearon con el sistema de bloqueo con biotina (DAKO Cat. No. X0590), previo a la incubación con el anticuerpo primario (1:100 – 1:1000) en PBS (1 h) se lavó con PBS-Tween 20 (0,05%) y luego se desarrolló la ligadura con HRP-streptavidina (BD Bioscience Cat. No.550946, 30 min) y substrato de DAB (Sigma Cat. No. D5905). Para los anticuerpos monoclonales (mAbs) IgG₄, se usó un IgG₄ anti-humano de ratón secundario (Zymed Cat. No. 3840) conjugado con HRP. Los portaobjetos se

contracoloraron con Haemalum de Mayer (1 min), se lavaron y luego se armaron en DPX.

[0235] Se comparó la afinidad de ligadura para varias especies (tejido de ratón, rata, conejo, perro, cerdo, cynomolgus y humano). Al analizar mediante inmunohistoquímica, no se observó reactividad para tejido de rata, conejo y cerdo y al analizar mediante ELISA no se observó reactividad cruzada de los anticuerpos anti-MAdCAM para MAdCAM de ratón recombinante. Los datos para tejido humano, de cynomolgus y perro se presentan en forma de tabla en la Tabla 8 siguiente:

Tabla 8. Molde de reactividad cruzada de anticuerpos anti-MAdCAM con especies ortólogas de MAdCAM

		reactividad cruzada IHC			
CLON	Agrupamiento	ileon	ileon	ileon	ileon
		humano	cyno	marmoset	perro
1.7.2	3a				
1.8.2	3a				
7.16.6	3b				
7.20.5	2b			n.d	
7.26.4	3b			n.d	
6.14.2	2			n.d	
6.22.2	2			n.d	
6.34.2	6			n.d	
6.67.1	5			n.d	
6.73.2	3		n.d	n.d	
6.77.1	1			n.d	
9.8.2	3a		n.d		

IgG2
IgG4

Sin ligadura
Ligadura

n.d: no determinado

[0236] De acuerdo con la clave, la ligadura de anti-MAdCAM a estructuras endoteliales especializadas y tejido linfoide se indica mediante sombreado. Para cada anticuerpo se indican el agrupamiento de epítopes basado en el análisis de epítopes Luminex y el molde de reactividad cruzada con MAdCAM. Los datos de agrupamiento de epítopes en base a Luminex para los anticuerpos anti-MAdCAM 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.3 y 6.77.1 (cursiva) se derivaron de experimentos distintos que los datos para 1.7.2, 1.8.2, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 y 9.8.2 (negrita), según lo indicado por las diferencias en la fuente de los caracteres.

[0237] Todos los anticuerpos anti-MAdCAM ensayados tenían la capacidad de reconocer un epítipo MAdCAM humano expresado sobre compartimentos endoteliales vasculares del tracto gastrointestinal. Con excepción de 1.7.2 y 1.8.2, todos los demás anticuerpos anti-MAdCAM ensayados eran capaces de ligar específicamente los compartimentos endoteliales vasculares del tracto gastrointestinal de cynomolgus. Ciertos otros anticuerpos anti-MAdCAM, a saber 6.14.2 y 6.67.1 tenían también la capacidad de reconocer específicamente el ortólogo de MAdCAM de perro como así también el MAdCAM de cynomolgus.

Generación de una línea celular CHO que expresa MAdCAM de cynomolgus/humano quimérico funcionalmente activa:

[0238] Las diferencias en la afinidad de ligadura de ciertos anticuerpos anti-MAdCAM para MAdCAM humano y de cynomolgus nos llevó a determinar si se puede encontrar una base estructural para esta observación.

[0239] En base a la secuencia de aminoácidos publicada para MAdCAM de Macaque (Shyjan AM, et al., *J Immunol.*, 156, 2851-7 (1996)), se diseñaron sondas para amplificar la secuencia del dominio que liga $\alpha_4\beta_7$ de MAdCAM de cynomolgus mediante PCR. Se preparó RNA total a partir del nodo linfático mesentérico extirpado congelado de cynomolgus (aprox. 200 mg) usando el método Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 1-2 μ g se cebaron con oligo-dT y se sometieron a transcripción inversa con transcriptasa inversa AMV (Promega). Una proporción del producto sometido a transcripción inversa se sometió a PCR con el cebador adelantado 5'-AGC ATG GAT CGG GGC CTG GCC-3' (SEQ ID NO: 111) y el cebador inverso 5'-GTG CAG GAC CGG GAT GGC CTG-3' (SEQ ID NO: 112) con polimerasa GC-2 en GC-melt 1 M (Clontech) y a una temperatura de reasociación de 62°C. Se escindió un producto RT-PCR del tamaño apropiado y se purificó a partir de un gel con 1% de agarosa después de electroforesis, luego se clonó con TOPO-TA (Invitrogen) entre los sitios EcoRI de pCR2.1. El inserto se confirmó por

secuenciación. La secuencia nucleotídica y la secuencia de aminoácidos traducida pronosticada se muestran en SEQ ID NOS 49 y 50, respectivamente.

[0240] Las secuencias de aminoácidos pronosticadas de MAdCAM humano y de cynomolgus para el dominio que liga $\alpha_4\beta_7$ muestran un alto grado de identidad de secuencia (90,8%) al ser alineadas (la Figura 3 provee esta alineación de secuencias). Para generar una línea celular funcionalmente activa que expresa MAdCAM de cynomolgus, que mimetiza el molde de ligadura anti-MAdCAM representado por la Tabla 8, un fragmento SacI correspondiente a la secuencia del dominio que liga $\alpha_4\beta_7$ de cynomolgus en pCR2.1 se subclonó directamente en la construcción pIND-Hygro C-terminal de MAdCAM humano arriba descrita que contiene el tallo de mucina carboxil-terminal y el dominio de transmembrana. Se verificó la secuencia y la orientación, y luego se clonó un fragmento KpnI/NotI en el vector pEF5FRTV5GWCAT (Invitrogen), reemplazando la secuencia codificadora CAT y usando el vector obtenido en transfecciones para generar clones simples que se expresan establemente en células Flp In CHO (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0241] La ligadura de clones de anticuerpos anti-MAdCAM a las células CHO que expresan MAdCAM quimérico de cynomolgus/humano se evaluó mediante citometría de flujo y la actividad funcional de anticuerpos anti-MAdCAM se determinó usando un ensayo de adhesión de células JY muy similar al descrito precedentemente. La ligadura y actividad funcional de anticuerpos anti-MAdCAM se expresan en la Tabla 9.

[0242] Tabla 9. Correlación entre la actividad funcional en el ensayo de adhesión MAdCAM de cynomolgus/humano – CHO/JY y la ligadura a células MAdCAM de cynomolgus/humano - CHO, medida mediante FACS, para una gama de anticuerpos anti-MAdCAM.

CLON	Actividad funcional IC ₅₀ (µg/mL)	ligadura FACS	
		humano	cyno/humano
1.7.2	inactivo		
1.8.2	inactivo		
7.16.6	0,72		
7.20.5	0,62		
7.26.4	0,96		
6.14.2	0,53		
6.22.2	0,83		

6.34.2	0,47	
6.67.1	0,75	
6.73.2	inactivo	
6.77.1	0,64	
9.8.2	0,83	

IgG2	Sin ligadura
IgG4	Ligadura

[0243] Tomado en conjunto, existe una buena correlación entre la capacidad de un anticuerpo anti-MAdCAM dado para ligar MAdCAM humano o de cynomolgus, según lo detectado por inmunohistoquímica (Tabla 8), con ligadura recombinante a base de células, y la actividad funcional (Tabla 9). Los anticuerpos anti-MAdCAM 1.7.2, 1.8.2 y 6.73.2, por ejemplo, muestran una falta consistente de ligadura a tejido de cynomolgus y células que expresan una proteína de MAdCAM quimérica de cynomolgus/humano. Los anticuerpos anti-MAdCAM 1.7.2, 1.8.2 y 6.73.2 tampoco tenían la capacidad de detectar actividad bloqueadora funcional en el ensayo de adhesión MAdCAM de cynomolgus/humano / JY.

[0244] Pueden usarse enfoques similares para definir el epítipo de los anticuerpos anti-MAdCAM 6.14.2 y 6.67.1 que reconocen MAdCAM de perro.

EJEMPLO IV:

Uso de anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-MAdCAM en la detección de MAdCAM soluble circulante como método para el diagnóstico de enfermedades

[0245] Los anticuerpos anti-MAdCAM pueden usarse para la detección de MAdCAM soluble circulante (sMAdCAM). La detección de sMAdCAM en plasma clínico, muestras de suero u otro biofluido, tales como, pero no estando limitado a, deposición, orina, esputo, es probablemente un sustituto útil para un biomarcador de enfermedades subyacentes, incluyendo, pero no estando limitado a, enfermedad inflamatoria del intestino.

[0246] En base a los datos de agrupamiento de epítopes (Tablas 7 y 8), los anticuerpos anti-MAdCAM 1.7.2 y 7.16.6 parecen reconocer epítopes diferentes sobre MAdCAM humano. Se recubrieron placas ELISA durante la noche a 4°C con 100 µL/cavidad de una solución de 50 µg/mL de 1.7.2 en solución fisiológica con buffer de fosfato (PBS). Después de la incubación, la placa se bloqueó durante 1,5 horas con un buffer de bloqueo de PBS que contiene leche al 10% (200 µL/cavidad). Después

de la incubación, la placa se lavó con PBS (2 x 100 μ L/cavidad) y se agregaron a la placa soluciones seriadas de proteína de fusión MAdCAM-IgG1-Fc, desde una concentración máxima de 50 μ g/mL hasta aproximadamente 5 ng/mL en PBS, llevando a volumen final de 100 μ L, para la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente. En un enfoque similar, la proteína MAdCAM-IgG1-FC puede diluirse en plasma o suero, o algún otro biofluido relevante tal, y usarse para determinar la expresión de MAdCAM soluble en una muestra clínica, según lo descrito más abajo. Como control negativo, se agregó solamente buffer a las cavidades que contiene anticuerpo anti-MAdCAM primario. Luego, la placa se lavó con PBS (3 x 100 μ L/cavidad) y luego la placa se incubó en la oscuridad con un 7.16.6 marcado con Alexa488 (100 μ L, 5 μ g/mL). El 7.16.6 marcado con Alexa488 se generó usando un equipo comercialmente disponible (Molecular Probes, A-20181), siguiendo los protocolos del fabricante.

[0247] La placa se lavó con PBS que contiene 0,05% de Tween-20, y se determinó la ligadura del 7.16.6 marcado al MAdCAM soluble capturado midiendo la fluorescencia (lector Wallac Victor² 1420 Multilabel Reader, excitación λ 485nm, emisión λ 535nm, conteo desde la parte superior, 3 mm desde el fondo de la placa, durante 0,1 seg con abertura de emisión normal). Cuando la fluorescencia es representada gráficamente en función de la concentración de la proteína de fusión MAdCAM-IgG1-Fc, Figura 6, se observa que un 1.7.2 y un 7.16.6 marcado pueden usarse con fines de diagnóstico para determinar el nivel de MAdCAM soluble circulante expresado en un biofluido o una muestra clínica. Este enfoque de sandwich ELISA no está restringido al uso de 1.7.2 y 7.16.6, sino puede usarse cualquier combinación de anticuerpos anti-MAdCAM que reconoce diferentes epítopes sobre MAdCAM, según lo resumido por los datos y la interpretación de la Tabla 7 y la Figura 5. Pueden aplicarse estrategias similares para el desarrollo de ensayos similares, tales como inmunohistoquímica y transferencia de Western, con los otros anticuerpos anti-MAdCAM descritos, usando diferentes partícipes, variantes, marcadores, etc.

EJEMPLO V:

Estructura de aminoácidos de anticuerpos monoclonales anti-MAdCAM preparados de acuerdo con la invención

[0248] En la discusión siguiente, se provee información estructural relacionada con los mAbs anti-MAdCAM preparados de acuerdo con la invención.

[0249] Para analizar estructuras de mAbs producidos de acuerdo con la invención, clonamos los genes que codifican los fragmentos de cadena pesada y liviana a partir

del clon de hibridoma específico. La clonación de genes y la secuenciación se realizaron como sigue:

[0250] mRNA Poly(A)+ se aisló a partir de aproximadamente 2×10^5 células de hibridoma derivadas de ratones XenoMouse inmunizados usando un equipo Fast-Track (Invitrogen). Después de la generación de cDNA sintetizado con cebadores aleatorios se siguió con PCR. Se usaron cebadores específicos de la familia VH o V κ humana (Marks et al., 'Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable gene and design of family-specific oligonucleotide probes'; *Eur. J. Immunol.*, 21, 985-991 (1991)) o un cebador VH humano universal, MG-30 (5'-CAG GTG CAG CTG GAG CAG TCI GG-3 (SEQ ID NO: 108) conjuntamente con cebadores específicos para el C γ 2 humano, MG40-d (5'-GCT GAG GGA GTA GAG TCC TGA GGA-3 (SEQ ID NO: 109) o la región constante C γ 4, MG-40d (5'-GCT GAG GGA GTA GAG TCC TGA GGA CTG T -3 (SEQ ID NO: 110), o la región constante C κ (h κ P2; según lo descrito previamente en Green et al., 1994). Las secuencias de los transcritos de cadena pesada y liviana kappa derivadas del mAb humano de hibridomas se obtuvieron mediante la secuenciación directa de productos PCR generados a partir de RNA poly (A+) usando los cebadores descritos precedentemente. Los productos PCR se clonaron en pCR2.1 usando un equipo de clonación TOPO-TA (Invitrogen) y se secuenciaron ambas hebras usando equipos de secuenciación "Prism dye terminator" y una máquina de secuenciación ABI 377. Todas las secuencias se analizaron mediante alineaciones con la base de datos 'V BASE sequence directory' (Tomlinson, et al, *J. Mol. Biol.*, 227, 776-798 (1992); *Hum. Mol. Genet.*, 3, 853-860 (1994); *EMBO J.*, 14, 4628-4638 (1995)).

[0251] Además cada uno de los anticuerpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod y 7.26.4-mod, se sometieron a secuenciación de DNA de longitud completa. Con tal fin, se aisló RNA total a partir de aproximadamente $3-6 \times 10^6$ células de hibridoma usando un equipo RNeasy (Qiagen). El mRNA se sometió a transcripción inversa usando oligo-dT y un sistema de transcriptasa inversa en base a AMV (Promega). Se usó V BASE para diseñar cebadores de amplificación 5' específicos que contienen una secuencia Kozak óptima y un codón de iniciación ATG (subrayado) y cebadores inversos 3' para las cadenas pesada y kappa específicas, según lo representado en la Tabla 10.

209
111
120

Tabla 10: Pares de cebadores PCR para la amplificación de cDNA a partir de hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales anti-MAdCAM y cebadores usados en la construcción de versiones modificadas de anticuerpos anti-MAdCAM.

	Oligo-secuencia
VH1-18 VH3-15 VH3-21 VH3-23 VH3-30 VH3-33 VH4-4	5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGACTGGACCTGGAGCATCCTT 3' (SEQ ID NO: 70) 5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGATT 3' (SEQ ID NO: 71) 5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGAAGTGGGGCTCCGCTGGGTT 3' (SEQ ID NO: 72) 5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTT 3' (SEQ ID NO: 73) 5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTT 3' (SEQ ID NO: 74) 5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTT 3' (SEQ ID NO: 75) 5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGAAACACCTGTGTTCTTCCTC 3' (SEQ ID NO: 76)
A2/A3 A26 B3 O12 O18	5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTG 3' (SEQ ID NO: 77) 5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGTTGCCATCACAACCTCATTTGGG 3' (SEQ ID NO: 78) 5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGGTGTTGCAGACCCAGGTCTTC 3' (SEQ ID NO: 79) 5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAG 3' (SEQ ID NO: 80) 5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCTGCTCAG 3' (SEQ ID NO: 81)
RevIgG2 RevIgG4 RevKappa	5' TTCTCTGATCAGAATTCTATCATTTACCCGAGACAGGGAGAG 3' (SEQ ID NO: 82) 5' TTCTTTGATCAGAATTCTCACTAACACTCTCCCTGTGAAGC 3' (SEQ ID NO: 83) 5' TTCTCTGATCAGAATTCTATCATTTACCCAGAGACAGGGAGAG 3' (SEQ ID NO: 84)
6.22.2VK_F1 6.22.2VK_R1 6.22.2VH_F1 6.22.2VH_R1 6.22.2VH_CS*	5'-GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACC CTC ACC ATC AAT AGC CTG GAA GC-3' (SEQ ID NO: 85) 5'-GCT TCC AGG CTA TTG ATG GTG AGG GTG AAA TCT GTC CCA GAT CC-3' (SEQ ID NO: 86) 5'-GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC-3' (SEQ ID NO: 87) 5'-GCT ACT GAA GGT GAA TCC AGA CGC TGC-3' (SEQ ID NO: 88) 5'-CGG AGG TGC TTC TAG AGC AGG GCG-3' (SEQ ID NO: 89)
6.34.2VK_F1 6.34.2VK_R1 6.34.2VK_F2 6.34.2VK_R3 6.34.2VH_F16.34 .2VH_R1	5'-GCA AGT CAG AGT ATT AGT AGC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CC-3' (SEQ ID NO: 90) 5'-GGT TTC TGC TGA TAC CAA TTT AAA TAG CTA CTA ATA CTC TGA CTT GC-3' (SEQ ID NO: 91) 5'-CCA TCA GTT CTC TGC AAC CTG AGG ATT TTG CAA CTT ACT ACT GTC ACC-3' (SEQ ID NO: 92) 5'-GGT GAC AGT AGT AAG TTG CAA AAT CCT CAG GTT GCA GAG AAC TGA TGG-3' (SEQ ID NO: 93) 5'-GCA AAT GAA CAG CCT GCG CGC TGA GGA CAC G-3' (SEQ ID NO: 94) 5'-CGT GTC CTC AGC GCG CAG GCT GTT CAT TTG C-3' (SEQ ID NO: 95)
6.67.1VK_F1 6.67.1VK_R1 6.67.1VH_F1 6.67.1VH_R1 6.67.1VH_CS*	5'-CAA TAA GAA CTA CTT AGC TTG GTA CCA ACA GAA ACC AGG ACA GCC-3' (SEQ ID NO: 96) 5'-GGC TGT CCT GGT TTC TGT TGG TAC CAA GCT AAG TAG TTC TTA TTG-3' (SEQ ID NO: 97) 5'-CCC TCA GGG GTC GAG TCA CCA TGT CAG TAG ACA CGT CCA AGA ACC-3' (SEQ ID NO: 98) 5'-GGT TCT TGG ACG TGT CTA CTG ACA TGG TGA CTC GAC CCC TGA GGG-3' (SEQ ID NO: 99) 5'-ATT CTA GAG CAG GGC GCC AGG-3' (SEQ ID NO: 100)
6.77.1VK_F1 6.77.1VK_R1	5'-CCA TCT CCT GCA AGT CTA GTC AGA GCC TCC-3' (SEQ ID NO: 101) 5'-GGA GGC TCT GAC TAG ACT TGC AGG AGA TGG-3' (SEQ ID NO: 102)

40
122
321

	Oligo-secuencia
6.77.1VK_F2	5'-GGT TTA TTA .CTG CAT GCA AAG TAT ACA GCT TAT GTC CAG TTT TGG CC - 3' (SEQ ID NO: 103)
6.77.1VK_R2	5'-GGC CAA AAC TGG ACA TAA GCT GTA TAC TTT GCA TGC AGT AAT AAA CC - 3' (SEQ ID NO: 104)
7.26.4K_F1	5'-CCT GCA AGT CTA GTC AGA GCC TCC-3' (SEQ ID NO: 105)
7.26.4K_R1	5'-GGA GGC TCT GAC TAG ACT TGC AGG-3' (SEQ ID NO: 106)

[0252] Se usaron los pares de cebadores para amplificar los cDNAs usando Taq polimerasa Expand High Fidelity (Roche), y los productos PCR se clonaron en pCR2.1 TOPO-TA (Invitrogen) para la secuenciación subsecuente. Luego, los clones con las secuencias de cadena pesada y liviana kappa verificada se clonaron en los vectores pEE6.1 y pEE12.1 (LONZA) usando los sitios XbaI/EcoRI e HindIII/EcoRI respectivamente.

Análisis de genes utilizados

[0253] La Tabla 11 exhibe el gen de cadena pesada y liviana kappa utilizado para cada hibridoma expuesto en la invención.

Tabla 11: Utilización de genes de la cadena pesada y liviana kappa

CLON	Cadena pesada			Cadena liviana kappa	
	VH	D	JH	Kκ	Jκ
1.7.2	VH3-15	D6-19	JH4b	A3	JK5
1.8.2	VH3-15	D6-19	JH4b	A3	JK5
7.16.6	VH1-18	D6-6	JH6b	A2	JK1
7.20.5	VH4-4	D3-10	JH6b	A3	JK4
7.26.4	VH1-18	D6-6	JH6b	A2	JK1
6.14.2	VH3-23	D5-5	JH4b	O12	JK5
6.22.2	VH3-33	D5-12	JH6b	A26	JK4
6.34.2	VH3-30	D4-23	JH6b	O12	JK3
6.67.1	VH4-4	D3-10	JH4b	B3	JK4
6.73.2	VH3-23	D6-19	JH6b	O12	JK2
6.77.1	VH3-21	D6-19	JH6b	A2	JK2
9.8.2	VH3-33	D3-10 o D3-16	JH4b	O18	JK5

IgG2
IgG4

Análisis de secuencias

[0254] Para examinar aún más la estructura del anticuerpo, se obtuvieron secuencias de aminoácidos pronosticadas de los anticuerpos a partir de los cDNAs obtenidos a partir de los clones.

[0255] Los números de identificación de secuencias (SEQ ID NO:) 1-48 y 51-68 proveen las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de las cadenas pesada y liviana kappa de los anticuerpos anti-MAdCAM 1.7.2 (SEQ ID NOS 1-4), 1.8.2 (SEQ ID NOS 5-8), 6.14.2 (SEQ ID NOS 9-12), 6.22.2 (SEQ ID NOS 13-16), 6.34.2 (SEQ ID

NOS 17-20), 6.67.1 (SEQ ID NOS 21-24), 6.73.2 (SEQ ID NOS 25-28), 6.77.1 (SEQ ID NOS 29-32), 7.16.6 (SEQ ID NOS 33-36), 7.20.5 (SEQ ID NOS 37-40), 7.26.4 (SEQ ID NOS 41-44), 9.8.2 (SEQ ID NOS 45-48) y los anticuerpos anti-MAdCAM modificados 6.22.2-mod (SEQ ID NOS 51-54), 6.34.2-mod (SEQ ID NOS 55-58), 6.67.1-mod (SEQ ID NOS 59-62) y 6.77.1-mod (SEQ ID NOS 63-66) y 7.26.4-mod (SEQ ID NOS 67-68). Para cada secuencia del anticuerpo anti-MAdCAM clonado, se indican las secuencias de la secuencia peptídica señal (o las bases que la codifican) en minúscula y subrayadas.

[0256] Las Figuras 1A-1J proveen alineaciones de secuencias entre las secuencias de aminoácidos de cadena pesada pronosticadas de los anticuerpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 y 9.8.2 y la secuencia de aminoácidos de los productos génicos de la línea germinal respectiva. Las posiciones de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de los anticuerpos están subrayadas, las diferencias entre la secuencia expresada y la secuencia de la línea germinal correspondiente están indicadas en negrita y cuando hay agregados en la secuencia expresada en comparación con la línea germinal, estos se indican como (-) en la secuencia de la línea germinal.

[0257] Las Figuras 1K-1T proveen alineaciones de secuencias entre las secuencias pronosticadas de aminoácidos de la cadena liviana kappa de los anticuerpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 y 9.8.2 y la secuencia de aminoácidos de los productos génicos de la línea germinal respectiva. Las posiciones de las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de los anticuerpos están subrayadas, las diferencias entre la secuencia expresada y la línea germinal correspondiente están indicadas en negrita y cuando hay agregados en la secuencia expresada en comparación con la línea germinal, estos se indican como (-) en la secuencia de la línea germinal.

Presencia de modificaciones post-traducción: glicosilación y desamidación:

[0258] El efecto de algunos de los cambios en la secuencia del anticuerpo anti-MAdCAM expresada, en comparación con la secuencia derivada de la línea germinal, consiste en introducir residuos que potencialmente podrían estar sujetos a glicosilación ligada a N (Asn-X-Ser/Thr) y/o desamidación (Asn-Gly) (vea Tabla 12). Las secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena liviana kappa de los anticuerpos anti-MAdCAM 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.26.4 y 9.8.2, (SEQ ID NOS: 16, 20, 24, 28, 32, 44 y 48) y el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo 6.14.2, (SEQ ID NO: 10), predicen la presencia de una glicosilación ligada a N. La presencia de esta

modificación post-traducción se investigó usando con los anticuerpos monoclonales 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.26.4 y 9.8.2 una combinación de SDS-PAGE y coloración de glicoproteína con Pro-Q® Emerald 488 (Molecular Probes).

[0259] Brevemente, aproximadamente 2 µg de anticuerpo anti-MAdCAM reducido se cargaron sobre un gel con 4-12% de SDS-poliacrilamida usando un buffer MOPS. Después de la electroforesis, el gel se fijó en MeOH al 50%, ácido acético al 5% y se lavó en ácido acético al 3%. Carbohidratos cualesquiera sobre el gel se oxidaron luego con ácido periódico y se coloreó usando el equipo de coloración de glicoproteína Pro-Q® Emerald 488 (Molecular Probes). Después de una etapa de lavado final, se visualizó la coloración de glicoproteína usando un escaner de fluorescencia ajustado a una longitud de onda de 473 nm.

[0260] Después de la coloración de la glicoproteína, el gel se coloreó para proteína total usando una coloración de proteína en gel con SYPRO Ruby y analizando con un escáner de fluorescencia ajustado a una longitud de onda de 473 nm. Las cadenas livianas kappa de los anticuerpos anti-MAdCAM, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.26.4 y 9.8.2, se colorearon todas positivamente indicando la presencia de glicosilación. Como confirmación adicional, el anticuerpo anti-MAdCAM 7.26.4 se sometió a digestión triptica/quimiotriptica, confirmando el análisis LC-MS/MS la presencia de un péptido triptico modificado y proveyendo confirmación adicional de la glicolisación de la cadena liviana kappa.

[0261] Las secuencias específicas Asn-Gly en las regiones CDR1 de los anticuerpos anti-MAdCAM 1.7.2, 1.8.2, 6.22.2 y 7.20.5, hacen estas regiones sensibles a desamidación. La desamidación a pH neutro introduce una carga negativa y también puede llevar a isomerización β, la que podría afectar las propiedades de un anticuerpo. Para los anticuerpos anti-MAdCAM 1.7.2, 1.8.2 y 7.20.5, se evaluó la presencia de residuos Asn-isoaspartato desamidados mediante espectroscopía de masa después del atrapamiento de la cadena lateral de isoaspartato con MeOH.

[0262] En breve, para el anticuerpo anti-MAdCAM 1.7.2, se seleccionó el estado del péptido triptico/Asp-N SSQSLLQSNGYNYL (SEQ ID NO: 69) (1573.7 Da) para monitorear mediante LC-MS/MS. El anticuerpo anti-MAdCAM 1.7.2 se redujo en DTT 10 mM, se alquiló en Na iodoacetato 5 mM y subsiguientemente se cambió el buffer por buffer de digestión de tripsina (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7,6). Luego, el anticuerpo se mezcló con tripsina modificada del grado secuenciación (Promega) en una relación proteasa:proteína de 1:20. La proteína se digirió en tripsina durante 15 horas a 30°C, y los péptidos resultantes se separaron mediante HPLC usando cromatografía de fase inversa (RPC) C-18 en un sistema LC Ettan. El péptido que contiene ³³Asn (4032 Da) se recolectó de la columna y se diluyó en el buffer de

digestión de Asp-N (buffer de fosfato de sodio 50 mM, pH 8,0). Luego se agregó endoproteinasa Asp-N (Roche) en una relación aproximada péptido:enzima de 10:1.

[0263] Se agregó cloruro de acetilo (100 µL) a una muestra de metanol (1 mL, - 20°C) y se calentó la mezcla a temperatura ambiente. La digestión triptica + Asp-N se secó en un Speed-Vac y luego se agregaron 5 µL de metanol/cloruro de acetilo (45 min, temperatura ambiente), luego se secó nuevamente en un Speed-Vac. El residuo resultante se reconstituyó en TFA al 0,1% y los péptidos se analizaron inicialmente con el espectrómetro de masa Voyager-DE STR MALDI-TOF, usando el método de preparación de muestra en capa delgada de nitrocelulosa o la purificación en fase inversa con ZipTips C18 (Millipore), seguida por mezclado de gotas con matriz de α-ciano. La mezcla de péptidos metilados también se analizó mediante LC-MS/MS con un espectrómetro de masa Deca XP Plus Ion Trap como arriba indicado. La elución se hizo caer directamente al espectrómetro de masa Ion Trap y subsecuentemente se analizaron los péptidos mediante MS y MS/MS. El MS se ajustó para analizar todos los iones entre 300 y 2000 Da. Luego, el ión más fuerte de cualquier barrido particular se sometió a análisis MS/MS.

Tabla 12. Modificación post-traducción de anticuerpos anti-MAdCAM

CLON	Cadena pesada		Cadena liviana kappa			
	Glicosilación (NXS/T)	Confirmado	Glicosilación (NXS/T)	Confirmado	Desamidación (NG)	Confirmado
1.7.2					LQSNNGYN	MS
1.8.2					LQSNNGYN	MS
7.16.6						
7.20.5					HGNGYNY	MS
7.26.4			CKSNQSLLY	MS / PAGE		
6.14.2	TFNNSAMT	N.D				
6.22.2			SGTNFTLTI	PAGE	LTINGLEA	N.D
6.34.2			ASQNISSYL	PAGE		
6.67.1			SSNNKTYLA	PAGE		
6.73.2			RASQNITN	PAGE		
6.77.1			SCNSSQSL	PAGE		
9.8.2			HSDNLSIT	PAGE		

IgG2
IgG4

La tabla 12 revela las SEQ ID NOS: 135-146, respectivamente en orden, de izquierda a derecha y de arriba abajo.

Estudios de mutagénesis:

[0264] Las secuencias de aminoácidos primarios de los anticuerpos anti-MAdCAM ejemplificados en esta invención pueden modificarse, mediante mutagénesis dirigida a un sitio, para separar potenciales sitios de modificación post-traducción (*por ejemplo*, glicosilación, desamidación) o para cambiar el fondo de isotipo o para realizar otros cambios mediante ingeniería genética que pueden mejorar la utilidad terapéutica. Como ejemplo, se usó PCR para introducir cambios a los anticuerpos anti-MAdCAM 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1 y 7.26.4, para revertir ciertas secuencias framework a las de la línea germinal, para separar sitios potenciales de glicosilación y/o para modificar el fondo de isotipo a un IgG2 humano. cDNAs (100 ng) clonados en pCR2.1 TOPO-TA, correspondientes a los nucleótidos de cadena pesada SEQ ID NOS: 13, 17, 21 y 29, y los nucleótidos de cadena liviana kappa SEQ ID NOS: 15, 19, 23, 31 y 43, se usaron como molde en una serie de PCRs utilizando extensión solapada y un panel de conjuntos de cebadores descritos en la Tabla 10.

[0265] Cadena pesada de 6.22.2: Se usaron los conjuntos de cebadores PCR 6.22.2_VH_F1 y 6.22.2VH_CS* (1) y VH3-33 y 6.22.2_VH_R1 (2) para generar los productos PCR separados (1) y (2), usando una *Taq* polimerasa Expand y un molde de cDNA pCR2.1 TOPO-TA (100 ng) representado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 13. Los productos (1) y (2) se purificaron y combinaron en una tercer etapa PCR (*aproximadamente* 50 ng cada uno) conjuntamente con cebadores VH3-33 y VK6.22.2_CS*, para generar el dominio V modificado de la cadena pesada 6.22.2. Esta versión modificada contiene una mutación His/Phe en FR1 e introduce un sitio de restricción XbaI para posibilitar la clonación en marco de lectura en un vector derivado de pEE6.1, llamado pEE6.1CH, que contiene el dominio constante IgG₂ humano correspondiente. El fragmento PCR final se clonó en el sitio XbaI de pEE6.1CH, se controló su orientación y se verificó la secuencia completa del inserto. La secuencia nucleotídica para la cadena pesada de 6.22.2 modificada se encuentra en SEQ ID NO: 51 y la secuencia de aminoácidos correspondiente en SEQ ID NO: 52. Se indican los cambios en las secuencias nucleotídica y de aminoácidos en comparación con la línea parental.

[0266] Cadena liviana kappa de 6.22.2: Se usaron los conjuntos de cebadores PCR 6.22.2_VK_F1 y revKappa (1) y A26 y 6.22.2_VK_R1 (2) para generar los productos PCR separados (1) y (2), usando una *Taq* polimerasa Expand y un molde de cDNA pCR2.1 TOPO-TA (100 ng) representado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 15. Los productos (1) y (2) se purificaron y combinaron en una tercer etapa PCR (*aproximadamente* 50 ng cada uno) conjuntamente con cebadores A26 y revKappa, para generar el dominio V modificado de la cadena liviana kappa 6.22.2. Esta versión

modificada contiene cambios Asn/Asp y Gly/Ser con respecto a la secuencia FR3. El producto PCR resultante se clonó en pEE12.1 usando sitios HindIII/EcoR1 y se verificó la secuencia completamente. La secuencia nucleotídica para la cadena liviana kappa de 6.22.2 modificada se encuentra en SEQ ID NO: 53 y la secuencia de aminoácidos correspondiente en SEQ ID NO: 54. Se indican los cambios en las secuencias nucleotídica y de aminoácidos en comparación con la línea parental.

[0267] Cadena pesada de 6.34.2: Se usaron los conjuntos de cebadores PCR 6.34.2_VH_F1 y 6.22.2VH_CS* (1) y VH3-30 y 6.34.2_VH_R1 (2) para generar los productos PCR separados (1) y (2), usando una *Taq* polimerasa Expand y un molde de cDNA pCR2.1 TOPO-TA (100 ng) representado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 17. Los productos (1) y (2) se purificaron y combinaron en una tercer etapa PCR (*aproximadamente* 50 ng cada uno) conjuntamente con cebadores VH3-30 y VK6.22.2_CS*, para generar el dominio V modificado de la cadena pesada de 6.34.2. Esta versión modificada contiene una mutación Ser/Arg en FR3 e introduce un sitio de restricción XbaI para posibilitar la clonación en marco de lectura en un vector derivado de pEE6.1, llamado pEE6.1CH, que contiene el dominio constante IgG2 humano correspondiente. El fragmento PCR final se clonó en el sitio XbaI de pEE6.1CH, se controló su orientación y se verificó la secuencia completa del inserto. La secuencia nucleotídica para la cadena pesada de 6.34.2 modificada se encuentra en SEQ ID NO: 55 y la secuencia de aminoácidos correspondiente en SEQ ID NO: 56. Se indican los cambios en las secuencias nucleotídica y de aminoácidos en comparación con la línea parental.

[0268] Cadena liviana kappa de 6.34.2: Se usaron los conjuntos de cebadores PCR O12 y 6.34.2_VK_R1 (1), 6.34.2_VK_F1 y 6.34.2_VK_R2 (2), como así también 6.34.2_VK_F2 y revKappa (3) para generar los productos PCR separados (1), (2) y (3), usando una *Taq* polimerasa Expand y un molde de cDNA pCR2.1 TOPO-TA (100 ng) representado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 19. Los productos (1), (2) y (3) se purificaron y (1) y (2) se combinaron en una tercer etapa PCR (*aproximadamente* 50 ng cada uno), conjuntamente con los cebadores O12 y 6.34.2_VK_R2, para generar el producto PCR (4). Los productos PCR (2) y (3) se combinaron en una cuarta etapa PCR (*aproximadamente* 50 ng cada uno), conjuntamente con 6.34.2_VK_F1 y revKappa, para generar el producto PCR (5). Los productos PCR (4) y (5) se purificaron y combinaron conjuntamente (*aproximadamente* 50 ng cada uno) con cebadores O12 y revKappa para generar el dominio V modificado de la cadena liviana kappa de 6.34.2. Esta versión modificada contiene un cambio Asn/Ser en CDR1, un cambio Phe/Tyr en FR2 y cambios Arg-Thr/Ser-Ser, Asp/Glu y Ser/Tyr en la secuencia FR3. El producto PCR resultante se

clonó en pEE12.1 usando sitios HindIII/EcoR1 y se verificó la secuencia completamente. La secuencia nucleotídica para la cadena liviana kappa de 6.34.2 modificada se encuentra en SEQ ID NO: 57 y la secuencia de aminoácidos correspondiente en SEQ ID NO: 58. Se indican los cambios en las secuencias nucleotídica y de aminoácidos en comparación con la línea parental.

[0269] Cadena pesada de 6.67.1: Se usaron los conjuntos de cebadores PCR 6.67.1_VH_F1 y 6.67.1VH_CS* (1) y VH4-4 y 6.67.1_VH_R1 (2) para generar los productos PCR separados (1) y (2), usando una *Taq* polimerasa Expand y un molde de cDNA pCR2.1 TOPO-TA (100 ng) representado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 21. Los productos (1) y (2) se purificaron y combinaron en una tercer etapa PCR (*aproximadamente* 50 ng cada uno) conjuntamente con cebadores VH4-4 y VK6.67.1_CS* para generar el dominio V modificado de la cadena pesada de 6.67.1. Esta versión modificada contiene una conversión Ile-Leu-Ala/Met-Ser-Val en FR3 e introduce un sitio de restricción XbaI para posibilitar la clonación en marco de lectura en un vector derivado de pEE6.1, llamado pEE6.1CH, que contiene el dominio constante IgG2 humano correspondiente. El fragmento PCR final se clonó en el sitio XbaI de pEE6.1CH, se controló su orientación y se verificó la secuencia completa del inserto. La secuencia nucleotídica para la cadena pesada de 6.67.1 modificada se encuentra en SEQ ID NO: 59 y la secuencia de aminoácidos correspondiente en SEQ ID NO: 60. Se indican los cambios en las secuencias nucleotídica y de aminoácidos en comparación con la línea parental.

[0270] Cadena liviana kappa de 6.67.1: Se usaron los conjuntos de cebadores PCR 6.67.1_VK_F1 y revKappa (1) y B3 y 6.67.1_VK_R1 (2) para generar los productos PCR separados (1) y (2), usando una *Taq* polimerasa Expand y un molde de cDNA pCR2.1 TOPO-TA (100 ng) representado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 23. Los productos (1) y (2) se purificaron y combinaron en una tercer etapa PCR (*aproximadamente* 50 ng cada uno) conjuntamente con cebadores B3 y revKappa, para generar el dominio V modificado de la cadena liviana kappa de 6.67.1. Esta versión modifica contiene un cambio Thr/Asn en CDR1 y un cambio Arg/Gly en FR2. El producto PCR resultante se clonó en pEE12.1 usando sitios HindIII/EcoR1 y se verificó la secuencia completamente. La secuencia nucleotídica para la cadena liviana kappa de 6.67.1 modificada se encuentra en SEQ ID NO: 61 y la secuencia de aminoácidos correspondiente en SEQ ID NO: 62. Se indican los cambios en las secuencias nucleotídica y de aminoácidos en comparación con la línea parental.

[0271] Cadena pesada de 6.77.1: Se usaron los conjuntos de cebadores PCR VH 3-21 y 6.22.2VH_CS* para generar un producto PCR simple usando *Taq* polimerasa Expand y un molde de cDNA pCR2.1 TOPO-TA (100 ng) representado por la

secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 29. Los productos PCR se digirieron con XbaI, se purificaron en gel y se clonaron en el sitio XbaI de pEE6.1CH, controlando la orientación. Se verificó la secuencia completa del inserto. La secuencia nucleotídica para la cadena pesada de 6.77.1 modificada se encuentra en SEQ ID NO: 63 y la secuencia de aminoácidos correspondiente en SEQ ID NO: 64. Se indican los cambios en las secuencias nucleotídica y de aminoácidos en comparación con la línea parental.

[0272] Cadena liviana kappa de 6.77.1: Se usaron los conjuntos de cebadores PCR A2 y 6.77.1_VK_R1 (1), 6.77.1_VK_VK_F1 y 6.77.1_R2 (2), como así también 6.77.1_VK_F2 y revKappa (3) para generar los productos PCR separados (1), (2) y (3), usando una *Taq* polimerasa Expand y un molde de cDNA pCR2.1 TOPO-TA (100 ng) representado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 31. Los productos (1), (2) y (3) se purificaron y (1) y (2) se combinaron en una tercer etapa PCR (*aproximadamente* 50 ng cada uno), conjuntamente con los cebadores A2 y 6.77.1_VK_R2, para generar el producto PCR (4). Los productos PCR (2) y (3) se combinaron en una cuarta etapa PCR (*aproximadamente* 50 ng cada uno), conjuntamente con los cebadores 6.77.1_VK_F1 y revKappa, para generar los productos PCR (5). Los productos PCR (4) y (5) se purificaron y combinaron conjuntamente (*aproximadamente* 50 ng cada uno) con cebadores A2 y JK2 para generar el dominio V modificado de la cadena liviana kappa de 6.77.1. Esta versión modificada contiene un cambio Asn/Lys en CDR1, un cambio Ser/Tyr en FR3 y un cambio del residuo Cys/Ser en la secuencia CDR3. El producto PCR resultante se clonó en pEE12.1 usando sitios HindIII/EcoR1 y se verificó la secuencia completamente. La secuencia nucleotídica para la cadena liviana kappa de 6.77.1 modificada se encuentra en SEQ ID NO: 65 y la secuencia de aminoácidos correspondiente en SEQ ID NO: 66. Se indican los cambios en las secuencias nucleotídica y de aminoácidos en comparación con la línea parental.

[0273] Cadena liviana kappa de 7.26.4: Se usaron los conjuntos de cebadores PCR 7.26.4_VK_F1 y revKappa (1) y A2 y 7.26.4_VK_R1 (2) para generar los productos PCR separados (1) y (2), usando una *Taq* polimerasa Expand y un molde de cDNA pCR2.1 TOPO-TA (100 ng) representado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 43. Los productos (1) y (2) se purificaron y combinaron en una tercer etapa PCR (*aproximadamente* 50 ng cada uno) conjuntamente con cebadores A2 y revKappa, para generar el dominio V modificado de la cadena liviana kappa de 7.26.4. Esta versión modificada contiene un cambio Asn/Ser en CDR1. El producto PCR resultante se clonó en pEE12.1 usando sitios HindIII/EcoR1 y se verificó la secuencia completamente. La secuencia nucleotídica para la cadena liviana kappa de 7.26.4

modificada se encuentra en SEQ ID NO: 67 y la secuencia de aminoácidos correspondiente en SEQ ID NO: 68. Se indican los cambios en las secuencias nucleotídica y de aminoácidos en comparación con la línea parental.

[0274] Se ensambló un vector de expresión eucariótico funcional para cada una de las versiones modificadas de 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1 y 7.26.4, a las cuales se hace referencia como 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod y 7.26.4-mod, y que representan respectivamente las secuencias nucleotídicas de cadena pesada SEQ ID NOS: 51, 55, 59, 63 y 41, y las secuencias de aminoácidos correspondientes SEQ ID NOS: 52, 56, 60, 64 y 42, como así también las secuencias nucleotídicas de cadena liviana kappa SEQ ID NOS: 53, 57, 61, 65 y 67, y las secuencias de aminoácidos correspondientes SEQ ID NOS: 54, 58, 62, 66 y 68 como sigue: Los insertos de cDNA de la cadena pesada correspondiente a 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod y 6.77.1-mod se cortaron a partir del vector pEE6.1CH con NotI/Sall, la versión parental de las cadenas pesadas de 7.26.4 se cortaron a partir del vector pEE6.1 con NotI/Sall, y los fragmentos purificados se clonaron en sitios idénticos en el vector pEE12.1 correspondiente que contiene las versiones modificadas de las secuencias de cadena liviana kappa de 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod y 7.26.4-mod. Se confirmaron las secuencias de los vectores y se usaron cantidades purificadas en transfecciones transientes con células HEK 293T. Brevemente, 9×10^6 células HEK 293T, sembradas en un frasco T165 el día antes de la transfección y lavadas en Optimem, se transfectaron transientemente con vectores cDNAs correspondientes a 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod y 7.26.4-mod (40 μ g) usando Lipofectamina PLUS (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron durante 3 horas, luego se reemplazó el medio de transfección con medio DMEM (Invitrogen 21969-035) que contiene 10% de suero de ternero fetal IgG ultra low (Invitrogen 16250-078) y L-glutamina (50 mL). Después de 5 días se cosechó el sobrenadante del medio, se esterilizó por filtración y se purificó el anticuerpo anti-MAdCAM usando cromatografía por afinidad con proteína G sefarosa, de un modo similar al descrito precedentemente. La cantidad del anticuerpo recuperado (20-100 μ g) se cuantificó mediante un ensayo Bradford.

[0275] La actividad anti-MAdCAM del anticuerpo purificado por afinidad correspondiente a 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod y 7.26.4-mod se evaluó con el ensayo con proteína de fusión MAdCAM-IgG1-Fc según lo descrito previamente. La Tabla 13 presenta los valores IC_{50} de estos anticuerpos anti-MAdCAM en comparación con los anticuerpos anti-MAdCAM parentales de los cuales han sido derivados. Las substituciones con aminoácidos descritas precedentemente tuvieron un efecto mínimo sobre la actividad de los anticuerpos anti-

MAdCAM modificados en comparación con sus anticuerpos parentales. Los anticuerpos también mantuvieron su ligadura a células CHO que expresan MAdCAM humano recombinante o al MAdCAM quimérico de cynomolgus/humano.

Tabla 13. Actividad de versiones modificadas de anticuerpos anti-MAdCAM, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod y 7.26.4-mod, en comparación con sus anticuerpos parentales.

CLON	Ensayo con proteína de fusión MAdCAM IgG1 Fc IC50 promedio (µg/mL)	
	Parental	Modificado
6.22.2	0,018	0,058
6.34.2	0,013	0,049
6.67.1	0,013	0,037
6.77.1	0,022	0,077
7.26.4	0,021	0,033

EJEMPLO VI

Aumento de linfocitos β_7^+ en la circulación periférica por anticuerpos anti-MAdCAM bloqueantes

[0276] Se desarrolló un ensayo para identificar y correlacionar un efecto mecánico de un anticuerpo anti-MAdCAM y su nivel de circulación en la sangre. Un anticuerpo anti-MAdCAM inhibitorio debería tener el efecto de inhibir el reclutamiento de leucocitos que expresan la integrina $\alpha_4\beta_7$ al tracto gastrointestinal. Por lo tanto, las clases de leucocitos que llevan integrina $\alpha_4\beta_7$ deberían estar restringidas a la circulación periférica.

[0277] Esto se demostró con un anticuerpo monoclonal MAdCAM anti-humano completamente humano 7.16.6 en cynomolgus.

[0278] Un anticuerpo monoclonal MAdCAM anti-humano 7.16.6 purificado (1 mg/kg) o vehículo (acetato de Na 20 mM, 0,2 mg/mL de polisorbato 80, 45 mg/mL de manitol y 0,02 mg/mL de EDTA a pH 5,5) se evaluó de un modo similar mediante administración intravenosa vía la vena safena a dos grupos de monos cynomolgus (n = 4/grupo). El tercer día después de la administración de la dosis se recolectaron muestras de sangre en tubos con EDTA mediante la punción de la vena femoral. Anticuerpos específicos para LPAM, que reaccionan en forma cruzada con la integrina

$\alpha_4\beta_7$ de cynomolgus, no están disponibles comercialmente, de modo que se utilizó, en cambio, un anticuerpo anti- β_7 (que reconoce integrina $\alpha_4\beta_7$ y $\alpha_E\beta_7$). Los anticuerpos (30 μ L) de acuerdo con la tabla siguiente, Tabla 15, se agregaron a tubos que contienen 100 μ L de sangre cynomolgus, se mezcló mediante agitación suave con formación de vórtice y se incubó durante 20-30 minutos a 4°C.

Tabla 15. Anticuerpos (BD Pharmingen) utilizados para determinar el fenotipo inmunológico de sangre de cynomologus

Número de catálogo	Anticuerpo o isotipo
555748	mIgG1, k-FITC
555844	mIgG2a, k-PE
559425	mIgG1 - PerCP
555751	mIgG1, k-APC
555728	CD 28-FITC
555945	β_7 -PE
558814	CD 95-APC
550631	CD 4-PerCP

[0279] A cada tubo se agregó 1 mL de solución FACSlyse 1:10 (BD # 349202), se mezcló mediante agitación suave con formación de vórtice y se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 12 minutos en la oscuridad hasta que la lisis de los eritrocitos se había completado. Luego se agregaron a cada tubo 2 mL de buffer de coloración BD (# 554656), se mezcló y se centrifugó a 250 x g durante 6-7 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó y la pella se resuspendió en 3 mL de buffer de coloración, se mezcló nuevamente y se centrifugó a 250 x g durante 6-7 minutos a temperatura ambiente. Se agregó buffer Cytofix (BD # 554655) que contiene paraformaldehído (100 μ L) a las pellas de células de sangre periférica de mono y se mezcló cuidadosamente con turbo mezclador (vortexer) a velocidad baja/moderada. Las muestras se mantuvieron a 4°C en la oscuridad hasta la determinación con el FACSCalibur. Inmediatamente antes de la determinación se agregó PBS (100 μ L) a todos los tubos. Se determinaron los números celulares absolutos de $CD4^+\beta_7^+CD95^{lo}CD28^+$ (naive), $CD4^+\beta_7^+CD95^{hi}CD28^+$ (memoria central), $CD4^+\beta_7^-CD95^{hi}CD28^+$ (memoria central), $CD4^+\beta_7^+CD95^{hi}CD28^-$ (memoria efectora) mediante selección celular y análisis de cuadrante (gating and quadrant analyses) apropiados. Este método también permite analizar otros subconjuntos de células T, por ejemplo, células T $CD8^+$ de memoria central ($\beta_7^+CD8^+CD28^+CD95^+$) y otros leucocitos cualesquiera que llevan un ligando MAdCAM, con los anticuerpos apropiados. En comparación con el vehículo de control, el anticuerpo monoclonal anti-MAdCAM 7.16.6 causó un incremento de aproximadamente 3 veces en los niveles de circulación de células T de memoria central $CD4^+\beta_7^+CD95^{hi}CD28^+$ según

lo mostrado en la Figura 7. No se produjo ningún efecto sobre la población de células T de memoria central en circulación $CD4^+ \beta_7^- CD95^hi CD28^+$ lo que indica que el efecto del anticuerpo monoclonal anti-MAdCAM 7.16.6 es específico para células T que recalcan en el intestino. Los efectos del anticuerpo monoclonal anti-MAdCAM 7.16.6, en cynomolgus, sobre poblaciones de linfocitos $(\alpha_4) \beta_7^+$ circulantes indica que esto constituye una fuerte prueba sustituto de un mecanismo biomarcador, particularmente en el contexto de una aplicación práctica de regulación clínica.

Secuencias

[0280] Los SEQ ID NO: 1-48 y 51-68 proveen secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de las cadenas pesada y liviana kappa para doce anticuerpos anti-MAdCAM humanos, secuencias nucleotídicas y de aminoácidos del dominio que liga $\alpha_4 \beta_7$ a MAdCAM de cynomolgus y secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de cinco anticuerpos anti-MAdCAM humanos modificados.

[0281] Los SEQ ID NO: 1-48 proveen las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de la cadena pesada y liviana kappa de doce anticuerpos monoclonales anti-MAdCAM humanos: 1.7.2 (SEQ ID NO: 1-4), 1.8.2 (SEQ ID NO: 5-8), 6.14.2 (SEQ ID NO: 9-12), 6.22.2 (SEQ ID NO: 13-16), 6.34.2 (SEQ ID NO: 17-20), 6.67.1 (SEQ ID NO: 21-24), 6.73.2 (SEQ ID NO: 25-28), 6.77.1 (SEQ ID NO: 29-32), 7.16.6 (SEQ ID NO: 33-36), 7.20.5 (SEQ ID NO: 37-40), 7.26.4 (SEQ ID NO: 41-44), y 9.8.2 (SEQ ID NO: 45-48).

[0282] Los SEQ ID NO: 49-50 proveen las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de un dominio que liga $\alpha_4 \beta_7$ a MAdCAM de cynomolgus.

[0283] Los SEQ ID NO: 51-68 proveen las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de la cadena pesada y liviana kappa para los anticuerpos anti-MAdCAM monoclonales modificados: 6.22.2 (SEQ ID NO: 51-54), 6.34.2 modificado (SEQ ID NO: 55-58), 6.67.1 modificado (SEQ ID NO: 59-62), 6.77.1 modificado (SEQ ID NO: 63-66) y las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de la cadena liviana kappa del anticuerpo anti-MAdCAM monoclonal modificado: 7.26.4 modificado (SEQ ID NO: 67-68).

Los SEQ ID NOS: 70-106 y 108-110 proveen varias secuencias de cebadores.

Clave:
Secuencia señal: minúsculas subrayadas

Cambios de aminoácidos en secuencias de anticuerpos anti-MAdCAM modificados en comparación con la secuencia parental: mayúsculas subrayadas

SEQ ID NO. 1
Secuencia nucleotídica de la cadena pesada de 1.7.2

1	<u>atggagtttg</u>	<u>ggctgagctg</u>	<u>gatttttcctt</u>	<u>gctgctatatt</u>	<u>taaaaggtgt</u>
51	<u>ccagtgt</u> GAG	GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGGCTTG	GTGAAGCCTG
101	GGGGGTCCCT	TAGACTCTCC	TGTGTAGCCT	CTGGATTAC	TTTCACTAAC
151	GCCTGGATGA	TCTGGGTCCG	CCAGGCTCCA	GGGAAGGGGC	TGGAGTGGGT
201	TGGCCGTATT	AAAAGGAAAA	CTGATGGTGG	GACAACAGAC	TACGCTGCAC
251	CCGTGAAAGG	CAGATTCAAC	ATCTCAAGAG	ATGATTCAAA	AAACACGCTG
301	TATCTGCAAA	TGAACAGCCT	GAAAACCGAG	GACACAGCCG	TGTATTACTG
351	TACCACAGGG	GGAGTGGCTG	AGGACTACTG	GGGCCAGGGA	ACCCTGGTCA
401	CCGTCTCCTC	AGCCTCCACC	AAGGGCCCAT	CGGTCTTCCC	CCTGGCGCCC
451	TGCTCCAGGA	GCACCTCCGA	GAGCACAGCG	GCCCTGGGCT	GCCTGGTCAA
501	GGACTACTTC	CCCGAACCGG	TGACGGTGTC	GTGGAActCA	GGCGCTCTGA
551	CCAGCGGCGT	GCACACCTTC	CCAGCTGTCC	TACAGTCCTC	AGGACTCTAC
601	TCCCTCAGCA	GCGTGGTGAC	CGTGCCCTCC	AGCAACTTCG	GCACCCAGAC
651	CTACACCTGC	AACGTAGATC	ACAAGCCCAG	CAACACCAAG	GTGGACAAGA
701	CAGTTGAGCG	CAAATGTTGT	GTCGAGTGCC	CACCGTGCCC	AGCACCACCT
751	GTGGCAGGAC	CGTCAGTCTT	CCTCTTCCCC	CCAAAACCCA	AGGACACCCT
801	CATGATCTCC	CGGACCCCTG	AGGTCACGTG	CGTGGTGGTG	GACGTGAGCC
851	ACGAAGACCC	CGAGGTCCAG	TTCAACTGGT	ACGTGGACGG	CGTGGAGGTG
901	CATAATGCCA	AGACAAAGCC	ACGGGAGGAG	CAGTTCAACA	GCACGTTCCG
951	TGTGGTCAGC	GTCCTCACCG	TTGTGCACCA	GGACTGGCTG	AACGGCAAGG
1001	AGTACAAGTG	CAAGGTCTCC	AACAAAGGCC	TCCCAGCCCC	CATCGAGAAA
1051	ACCATCTCCA	AAACCAAAGG	GCAGCCCCGA	GAACCACAGG	TGTACACCCT
1101	GCCCCCATCC	CGGGAGGAGA	TGACCAAGAA	CCAGGTCAGC	CTGACCTGCC
1151	TGGTCAAAGG	CTTCTACCCC	AGCGACATCG	CCGTGGAGTG	GGAGAGCAAT
1201	GGGCAGCCGG	AGAACAActA	CAAGACCACA	CCTCCCATGC	TGGACTCCGA
1251	CGGCTCCTTC	TTCCTCTACA	GCAAGCTCAC	CGTGGACAAG	AGCAGGTGGC
1301	AGCAGGGGAA	CGTCTTCTCA	TGCTCCGTGA	TGCATGAGGC	TCTGCACAAC
1351	CACTACACGC	AGAAGAGCCT	CTCCCTGTCT	CCGGGTAAAT	GA

SEQ ID NO. 2
Secuencia proteica pronosticada de la cadena pesada de 1.7.2

1	<u>mefglswifl</u>	<u>aailkgvqcE</u>	<u>VQLVESGGGL</u>	<u>VKPGGSLRLS</u>	<u>CVASGFTFTN</u>
51	AWMIWVRQAP	GKGLEWVGRI	KRKTDGGTTD	YAAPVKGRFT	ISRDDSKNTL
101	YLQMNSLKTE	DTAVYYCTTG	GVAEDYWGQG	TLVTVSSAST	KGPSVFPLAP
151	CSRSTSESTA	ALGCLVKDYF	PEPVTVSWNS	GALTSGVHTF	PAVLQSSGLY
201	SLSSVVTVPS	SNFGTQTYTC	NVDHKPSNTK	VDKTVERKCC	VECPPCPAPP
251	VAGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVQ	FNWYVDGVEV
301	HNAKTKPREE	QFNSTFRVVS	VLTVVHQDWL	NGKEYKCKVS	NKGLPAPIEK
351	TISKTKGQPR	EPQVYTLPPS	REEMTKNQVS	LTCLVKGFYP	SDIAVEWESN
401	GQPENNYKTT	PPMLDSGGSF	FLYSKLTVDK	SRWQQGNVFS	CSVMHEALHN
451	HYTQKSLSLS	PGK			

SEQ ID NO. 3
Secuencia nucleotídica de la cadena liviana kappa de 1.7.2

1	<u>atgaggctcc</u>	<u>ctgctcagct</u>	<u>cctggggctg</u>	<u>ctaagtctct</u>	<u>gggtctctgg</u>
51	<u>atccagtggg</u>	<u>GATATTGTGA</u>	<u>TGACTCAGTC</u>	<u>TCCACTCTCC</u>	<u>CTGCCCCTCA</u>
101	CCCCTGGAGA	GCCGGCCTCC	ATCTCCTGCA	GGTCTAGTCA	GAGCCTCCTG
151	CAAAGTAATG	GATACAATA	TTTGGATTGG	TACCTGCAGA	AGCCAGGGCA
201	GTCTCCACAG	CTCCTGATCT	ATTTGGGTTC	TAATCGGGCC	TCCGGGGTCC
251	CTGACAGGTT	CAGTGGCAGT	GGATCAGGCA	CAGATTTTAC	ACTGAAAATC
301	AGCAGAGTGG	AGGCTGAGGA	TGTTGGGGTT	TATTACTGCA	TGCAAGCTCT
351	ACAAACTATC	ACCTTCGGCC	AAGGGACACG	ACTGGAGATT	AAACGAACTG
401	TGGCTGCACC	ATCTGTCTTC	ATCTTCCCGC	CATCTGATGA	GCAGTTGAAA
451	TCTGGAAGTG	CCTCTGTTGT	GTGCCTGCTG	AATAACTTCT	ATCCAGAGA
501	GGCCAAAGTA	CAGTGGAAGG	TGGATAACGC	CCTCCAATCG	GGTAACTCCC
551	AGGAGAGTGT	CACAGAGCAG	GACAGCAAGG	ACAGCACCTA	CAGCCTCAGC
601	AGCACCTCTG	CGCTGAGCAA	AGCAGACTAC	GAGAAACACA	AAGTCTACGC
651	CTGCGAAGTC	ACCCATCAGG	GCCTGAGCTC	GCCCGTCACA	AAGAGCTTCA
701	ACAGGGGAGA	GTGTTAGTGA			

SEQ ID NO. 4
Secuencia proteica de la cadena liviana kappa pronosticada de 1.7.2

1	<u>mrlpaqlllgl</u>	<u>lmlwvsgssg</u>	<u>DIVMTQSPLS</u>	<u>LPVTPGEPAS</u>	<u>ISCRSSQSLL</u>
51	QSNGYNYLDW	YLQKPGQSPQ	LLIYLGSNRA	SGVPDRFSGS	GSGETDFTLKI
101	SRVEAEDVGV	YYCMQALQTI	TFGQGRLEI	KRTVAAPSVF	IFPPSDEQLK
151	SGTASVVCLL	NNFYPPREKV	QWKVDNALQS	GNSQESVTEQ	DSKDSTYSLS
202	STLTLSKADY	EKHKVYACEV	THQGLSSPVT	KSFNRGEC	

SEQ ID NO. 5
Secuencia nucleotídica de la cadena pesada de 1.8.2

1	<u>atggagtttg</u>	ggctgagctg	gatttttcctt	gctgctatatt	taaaaggtgt
51	<u>ccagtgtGAG</u>	GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGGCTTG	GTGAAGCCTG
101	GGGGGTCCCT	TAGACTCTCC	TGTGTAGTCT	CTGGATTAC	TTTCACTAAC
151	GCCTGGATGA	TCTGGGTCCG	CCAGGCTCCA	GGGAAGGGGC	TGGAGTGGGT
201	TGGCCGTATT	AAAAGGAAAA	CTGATGGTGG	GACAACAGAC	TACGCTGCAC
251	CCGTGAAAGG	CAGATTACAC	ATCTCAAGAG	ATGATTCAAA	AAACACGCTG
301	TATCTGCAAA	TGAACAGCCT	GAAAACCGAG	GACACAGCCG	TGTATTACTG
351	TACCACAGGG	GGAGTGGCTG	AGGACTACTG	GGGCCAGGGA	ACCCTGGTCA
401	CCGTCTCCTC	AGCCTCCACC	AAGGGCCCAT	CGGTCTTCCC	CCTGGCGCCC
451	TGCTCCAGGA	GCACCTCCGA	GAGCACAGCG	GCCCTGGGCT	GCCTGGTCAA
501	GGACTACTTC	CCCGAACCGG	TGACGGTGTC	GTGGAActCA	GGCGCTCTGA
551	CCAGCGGCGT	GCACACCTTC	CCAGCTGTCC	TACAGTCCTC	AGGACTCTAC
601	TCCCTCAGCA	GCGTGGTGAC	CGTGCCCTCC	AGCAACTTCG	GCACCCAGAC
651	CTACACCTGC	AACGTAGATC	ACAAGCCCAG	CAACACCAAG	GTGGACAAGA
701	CAGTTGAGCG	CAAATGTTGT	GTCGAGTGCC	CACCGTGCCC	AGCACCACCT
751	GTGGCAGGAC	CGTCAGTCTT	CCTCTTCCCC	CCAAAACCCA	AGGACACCCT
801	CATGATCTCC	CGGACCCCTG	AGGTCACGTG	CGTGGTGGTG	GACGTGAGCC
851	ACGAAGACCC	CGAGGTCCAG	TTCAACTGGT	ACGTGGACGG	CGTGGAGGTG
901	CATAATGCCA	AGACAAAGCC	ACGGGAGGAG	CAGTTCAACA	GCACGTTCCG
951	TGTGGTCAGC	GTCTCTACCG	TTGTGCACCA	GGACTGGCTG	AACGGCAAGG
1001	AGTACAAGTG	CAAGGTCTCC	AACAAAGGCC	TCCCAGCCCC	CATCGAGAAA
1051	ACCATCTCCA	AAACCAAAGG	GCAGCCCCGA	GAACCACAGG	TGTACACCCT
1101	GCCCCCATCC	CGGGAGGAGA	TGACCAAGAA	CCAGGTCAGC	CTGACCTGCC
1151	TGGTCAAAGG	CTTCTACCCC	AGCGACATCG	CCGTGGAGTG	GGAGAGCAAT
1201	GGGCAGCCGG	AGAACAATA	CAAGACCACA	CCTCCCATGC	TGGACTCCGA
1251	CGGCTCCTTC	TTCTCTACA	GCAAGCTCAC	CGTGGACAAG	AGCAGGTGGC
1301	AGCAGGGGAA	CGTCTTCTCA	TGCTCCGTGA	TGCATGAGGC	TCTGCACAAC
1351	CACTACACGC	AGAAGAGCCT	CTCCCTGTCT	CCGGGTAAAT	GA

SEQ ID NO. 6
Secuencia proteica de la cadena pesada pronosticada de 1.8.2

1	<u>mefglswifl</u>	<u>aailkgvqcE</u>	VQLVESGGGL	VKPGGSLRLS	CVVSGFTFTN
51	AWMIWVRQAP	GKGLEWVGRI	KRKTDGGTTD	YAAPVKGRFT	ISRDDSKNTL
101	YLQMNSLKTE	DTAVYYCTTG	GVAEDYWGQG	TLVTVSSAST	KGPSVFPLAP
151	CSRSTSESTA	ALGCLVKDYF	PEPVTVSWNS	GALTSGVHTF	PAVLQSSGLY
201	SLSSVVTVPS	SNFGTQTYTC	NVDHKPSNTK	VDKTVERKCC	VECPPCPAPP
251	VAGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVQ	FNWYVDGVEV
301	HNAKTKPREE	QFNSTFRVVS	VLTVVHQDWL	NGKEYKCKVS	NKGLPAPIEK
351	TISKTKGQPR	EPQVYTLPPS	REEMTKNQVS	LTCLVKGFYP	SDIAVEWESN
401	GQPENNYKTT	PPMLDSGGSF	FLYSKLTVDK	SRWQQGNVFS	CSVMHEALHN
451	HYTQKSLSL	PGK			

SEQ ID NO. 7
Secuencia nucleotídica de la cadena liviana kappa de 1.8.2

1	<u>atgaggctcc</u>	<u>ctgctcagct</u>	<u>cctggggctg</u>	<u>ctaagtctct</u>	<u>gggtctctgg</u>
51	<u>atccagtg</u>	<u>ggg</u>	GATATTGTGA	TGACTCAGTC	TCCACTCTCC
101	CCCCTGGAGA	GCCGGCCTCC	ATCTCCTGCA	GGTCTAGTCA	GAGCCTCCTG
151	CAAAGTAATG	GATTCAACTA	TTTGGATTGG	TACCTGCAGA	AGCCAGGGCA
201	GTCTCCACAG	CTCCTGATCT	ATTTGGGTTC	TAATCGGGCC	TCCGGGGTCC
251	CTGACAGGTT	CAGTGGCAGT	GGGTCAGGCA	CAGATTTTAC	ACTGAAAATC
301	AGCAGAGTGG	AGGCTGAGGA	TGTTGGGGTT	TATTACTGCA	TGCAAGCTCT
351	ACAACTATC	ACCTTCGGCC	AAGGGACACG	ACTGGAGATT	AAACGAACTG
401	TGGCTGCACC	ATCTGTCTTC	ATCTTCCCGC	CATCTGATGA	GCAGTTGAAA
451	TCTGGAAGT	G	CCTCTGTTGT	GTGCCTGCTG	AATAACTTCT
501	GGCCAAAGTA	CAGTGGAAGG	TGGATAACGC	CCTCCAATCG	GGTAACTCCC
551	AGGAGAGTGT	CACAGAGCAG	GACAGCAAGG	ACAGCACCTA	CAGCCTCAGC
601	AGCACCTGA	CGCTGAGCAA	AGCAGACTAC	GAGAAACACA	AAGTCTACGC
651	CTGCGAAGTC	ACCCATCAGG	GCCTGAGCTC	GCCCGTCACA	AAGAGCTTCA
701	ACAGGGGAGA	GTGTTAGTGA			

SEQ ID NO. 8
Secuencia proteica de la cadena liviana kappa pronosticada de 1.8.2

1	<u>mrlpaql</u>	<u>llgl</u>	<u>lmlwvsgssg</u>	DIVMTQSPLS	LPVTPGEPAS	ISCRSSQSLL
51	QSNGFNYLDW	YLQKPGQSPQ	LLIYLGSNRA	SGVPDRFSGS	GSGTDFTLKI	
101	SRVEAEDVGV	YYCMQALQTI	TFGQGRLEI	KRTVAAPSVF	IFPPSDEQLK	
151	SGTASVVCLL	NNFYPREAKV	QWKVDNALQS	GNSQESVTEQ	DSKDSTYSLS	
202	STLTLSKADY	EKHKVYACEV	THQGLSSPVT	KSFNRGEC		

SEQ ID NO. 9
Secuencia nucleotídica de la cadena pesada de 6.14.2

```
1   atggagtttg ggctgagctg gcttttttctt gtggctatatt taaaaggtgt
51  ccagtgtGAG GTGCAGCTGT TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTACAGCCTG
101 GGGGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGACTCAC CTTTAACAAT
151 TCTGCCATGA CCTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 CTCAACTACT AGTGGAAGTG GTGGTACCAC ATACTACGCA GACTCCGTGA
251 AGGGCCGGTT CACCATCTCC AGAGACTCTC CCAAGAACAC GCTCTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCCGTATATT ACTGTGCGGC
351 CCGTGGATAC AGCTATGGTA CGACCCCTA TGAGTACTGG GGCCAGGGAA
401 CCCTGGTCAC CGTCTCCTCA GCTTCCACCA AGGGCCCATC CGTCTTCCCC
451 CTGGCGCCCT GTTCCAGGAG CACCTCCGAG AGCACAGCCG CCCTGGGCTG
501 CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCTG TGGAACTCAG
551 GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA
601 GGA CTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG
651 CACGAAGACC TACACCTGCA ACGTAGATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG
701 TGGACAAGAG AGTTGAGTCC AAATATGGTC CCCCATGCCC ATCATGCCCC
751 GCACCTGAGT TCCTGGGGGG ACCATCAGTC TTCCTGTTCC CCCCAAAACC
801 CAAGGACACT CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACG TCGTGGTGG
851 TGGACGTGAG CCAGGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAT
901 GGC GTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA
951 CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC
1001 TGAACGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCCGTCC
1051 TCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAGCCACA
1101 GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCAGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA
1151 GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTACC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG
1201 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT
1251 GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAGGCTA ACCGTGGACA
1301 AGACAGGTG GCAGGAGGGG AATGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG
1351 GCTCTGCACA ACCACTACAC ACAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCTGGGTAA
1401 ATGA
```

SEQ ID NO. 10
Secuencia proteica de la cadena pesada pronosticada de 6.14.2

```
1   mefglswlfl vailkgvqcE VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGLTFNN
51  SAMTWVRQAP GKGLEWVSTT SGSGGTTYIA DSVKGRFTIS RDSPKNLTLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCAARGY SYGTPYEYW GQGLVTVSS ASTKGPSVFP
151 LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
201 GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP
251 APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
301 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
351 SIEKTISKAK QPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
401 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE
451 ALHNHYTQKS LSLSLGK
```

SEQ ID NO. 11
Secuencia nucleotídica de la cadena liviana kappa de 6.14.2

```
1   atggacatga gggccccgc tcagtcctg gggctcctgc tactctggct
51  ccgagggggcc agatgtGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT
101 CTGCATCTGT AGGAGACAGA GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCGGAGC
151 ATTAGCAGCT ATTTAAATTG GTATCAGCAG AAACCAGGGA AAGCCCCTAA
201 AGTCCTGATC TTTTTTGTGT CCAGTTTGCA AAGTGGGGTC CCATCAAGGT
251 TCAGTGGCAG TGGCTCTGGG ACAGATTTC CTCTCACCAT CAGCAGTCTG
301 CAACCTGAAG ATTTTGCAAC TTACTACTGT CAACAGAATT ACATTCCCCC
351 TATTACCTTC GGCCAGGGGA CACGACTGGA GATCAGACGA ACTGTGGCTG
401 CACCATCTGT CTTCATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
451 ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
551 GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
601 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
701 GAGAGTGTTA G
```

SEQ ID NO. 12
Secuencia proteica de la cadena liviana kappa pronosticada de 6.14.2

```
1   mdmrvpaql l gllllwlrga rcDIQMTQSP SSLSASVGDR VTITCRASRS
51  ISSYLNWYQQ KPGKAPKVL I FVSSLQSGV PSRFSGSGSG TDFTLTISL
101 QPEDFATYYC QQNYIPPITF GQTRLEIRR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
151 TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST
202 LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
```

SEQ ID NO. 13
Secuencia nucleotídica de la cadena pesada de 6.22.2

1	atggagtttg	ggctgagctg	ggtttttcctc	gttgctctttt	taagaggtgt
51	ccagtgtCAG	GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGGCGTG	GTCCAGCCTG
101	GGAGGTCCCT	GAGACTCTCC	TGTGCAGCGT	CTGGACACAC	CTTCAGTAGC
151	GATGGCATGC	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA	GGCAAGGGGC	TGGAGTGGGT
201	GGCAATTATA	TGGTATGATG	GAAGTAATAA	ATATTATGCA	GACTCCGTGA
251	AGGGCCGATT	CACCATCTCC	AGAGACAATT	CCAAGAACAC	GCTGTATCTG
301	CAAATGAACA	GCCTGAGAGC	CGAGGACACG	GCTGTATATT	ACTGTGCGAG
351	AGATCCCGGC	TACTATTACG	GTATGGACGT	CTGGGGCCAA	GGGACCACGG
401	TCACCGTCTC	CTCAGCTTCC	ACCAAGGGCC	CATCCGTCTT	CCCCCTGGCG
451	CCCTGCTCCA	GGAGCACCTC	CGAGAGCACA	GCCGCCCTGG	GCTGCCTGGT
501	CAAGGACTAC	TTCCCCGAAC	CGGTGACGGT	GTCGTGGAAC	TCAGGCGCCC
551	TGACCAGCGG	CGTGCACACC	TTCCCGGCTG	TCCTACAGTC	CTCAGGACTC
601	TACTCCCTCA	GCAGCGTGGT	GACCGTGCCC	TCCAGCAGCT	TGGGCACGAA
651	GACCTACACC	TGCAACGTAG	ATCACAAGCC	CAGCAACACC	AAGGTGGACA
701	AGAGAGTTGA	GTCCAAATAT	GGTCCCCCAT	GCCCATCATG	CCCAGCACCT
751	GAGTTCCTGG	GGGGACCATC	AGTCTTCCTG	TTCCCCCCTA	AACCCAAGGA
801	CACTCTCATG	ATCTCCCGGA	CCCCTGAGGT	CACGTGCGTG	GTGGTGGACG
851	TGAGCCAGGA	AGACCCCGAG	GTCCAGTTCA	ACTGGTACGT	GGATGGCGTG
901	GAGGTGCATA	ATGCCAAGAC	AAAGCCGCGG	GAGGAGCAGT	TCAACAGCAC
951	GTACCGTGTG	GTCAGCGTCC	TCACCGTCCT	GCACCAGGAC	TGGCTGAACG
1001	GCAAGGAGTA	CAAGTGCAAG	GTCTCCAACA	AAGGCCTCCC	GTCCTCCATC
1051	GAGAAAACCA	TCTCCAAAGC	CAAAGGGCAG	CCCCGAGAGC	CACAGGTGTA
1101	CACCCCTGCCC	CCATCCCAGG	AGGAGATGAC	CAAGAACCAG	GTCAGCCTGA
1151	CCTGCCTGGT	CAAAGGCTTC	TACCCCAGCG	ACATCGCCGT	GGAGTGGGAG
1201	AGCAATGGGC	AGCCGGAGAA	CAACTACAAG	ACCGCGCCTC	CCGTGCTGGA
1251	CTCCGACGGC	TCCTTCTTCC	TCTACAGCAG	GCTAACCGTG	GACAAGAGCA
1301	GGTGGCAGGA	GGGGAATGTC	TTCTCATGCT	CCGTGATGCA	TGAGGCTCTG
1351	CACAACCACT	ACACACAGAA	GAGCCTCTCC	CTGTCTCTGG	GTAAATGA

SEQ ID NO. 14
Secuencia proteica de la cadena pesada pronosticada de 6.22.2

1	mefqlswvfl	vallrgvqcQ	VQLVESGGGV	VQPGRSLRLS	CAASGHTFSS
51	DGMHWVRQAP	GKGLEWVAII	WYDGSNKYYA	DSVKGRFTIS	RDNSKNTLYL
101	QMNSLRAEDT	AVYYCARDPG	YYYGMDVWGQ	GTTVTVSSAS	TKGPSVFPLA
151	PCSRSTSEST	AALGCLVKDY	FPEPVTVSWN	SGALTSGVHT	FPAVLQSSGL
201	YSLSSVVTVP	SSSLGTKTYT	CNVDHKPSNT	KVDKRVESKY	GPPCPSCPAP
251	EFLGGPSVFL	FPPKPKDTLM	ISRTPEVTCV	VVDVSQEDPE	VQFNWYVDGV
301	EVHNAKTKPR	EEQFNSTYRV	VSVLTVLHQD	WLNGKEYKCK	VSNKGLPSSI
351	EKTISKAKGQ	PREPQVYTLF	PSQEEMTKNQ	VSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE
401	SNGQPENNYK	TAPPVLDSDG	SFFLYSRLTV	DKSRWQEGNV	FSCSVMEAL
451	HNHYTQKSLS	LSLGK			

140 127
131

SEQ ID NO. 15
Secuencia nucleotídica de la cadena liviana kappa de 6.22.2

```
1   atgttgccat cacaactcat tgggttttctg ctgctctggg ttccagcttc
51  caggggtGAA ATTGTGCTGA CTCAGTCTCC AGACTTTCAG TCTGTGACTC
101 CAAAAGAGAA AGTCACCATC ACCTGCCGGG CCAGTCAGAG AATTGGTAGT
151 AGCTTACACT GGTACCAGCA GAAACCAGAT CAGTCTCCAA AACTCCTCAT
201 CAAGTATGCT TCCCAGTCCT TCTCAGGGGT CCCCTCGAGG TTCAGTGGCA
251 GTGGATCTGG GACAAATTTT ACCCTCACCA TCAATGGCCT GGAAGCTGAA
301 GATGCTGCAA CTTATTACTG TCATCAGAGT GGTCGTTTAC CGCTCACTTT
351 CGGCGGAGGG ACCAAGGTGG AGATCAAACG AACTGTGGCT GCACCATCTG
401 TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG AACTGCCTCT
451 GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG
501 GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG AGTGTACACAG
551 AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG
601 AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA
651 TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG CTTCAACAGG GGAGAGTGTT
701 AGTGA
```

SEQ ID NO. 16
Secuencia proteica de la cadena liviana kappa pronosticada de 6.22.2

```
1   mlpsqligfl llwvpasrgE IVLTQSPDFQ SVTPKEKVTI TCRASQRIGS
51  SLHWYQQKPD QSPKLLIKYA SQSFSGVPSR FSGSGSGTNF TLTINGLEAE
101 DAATYYCHQS GRLPLTFGGG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS
151 VVCLLNNFYF REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL
201 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC
```

SEQ ID NO. 17
Secuencia nucleotídica de la cadena pesada de 6.34.2

1	atggagtttg	ggctgagctg	ggtttttcctc	gttgctcttt	taagaggtgt
51	ccagtgtCAG	GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGGCGTG	GTCCAGCCTG
101	GGAGGTCCCT	GAGACTCTCC	TGTGCAGCCT	CTGGATTACAC	CTTCAGTAGC
151	TATGGCATGC	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA	GGCAAGGGGC	TGGAGTGGGT
201	GGCAGTTATA	TCAAATGATG	GAAATAATAA	ATACTATGCA	GACTCCGTGA
251	AGGGCCGATT	CACCATCTCC	AGAGACAATT	CCAAAAACAC	GCTGTATCTG
301	CAAATGAACA	GCCTGAGCGC	TGAGGACACG	GCTGTGTATT	ACTGTGCGAG
351	AGATAGTACG	GCGATAACCT	ACTACTACTA	CGGAATGGAC	GTCTGGGGCC
401	AAGGGACCAC	GGTCACCGTC	TCCTCAGCTT	CCACCAAGGG	CCCATCCGTC
451	TTCCCCCTGG	CGCCCTGCTC	CAGGAGCACC	TCCGAGAGCA	CAGCCGCCCT
501	GGGCTGCCTG	GTCAAGGACT	ACTTCCCCGA	ACCGGTGACG	GTGTCGTGGA
551	ACTCAGGCGC	CCTGACCAGC	GGCGTGACA	CCTTCCCGGC	TGTCCTACAG
601	TCCTCAGGAC	TCTACTCCCT	CAGCAGCGTG	GTGACCGTGC	CCTCCAGCAG
651	CTTGGGCACG	AAGACCTACA	CCTGCAACGT	AGATCACAAG	CCCAGCAACA
701	CCAAGGTGGA	CAAGAGAGTT	GAGTCCAAAT	ATGGTCCCCC	ATGCCCATCA
751	TGCCCAGCAC	CTGAGTTCCT	GGGGGGACCA	TCAGTCTTCC	TGTTCCCCCC
801	AAAACCCAAG	GACACTCTCA	TGATCTCCCG	GACCCCTGAG	GTCACGTGCG
851	TGGTGGTGGA	CGTGAGCCAG	GAAGACCCCG	AGGTCCAGTT	CAACTGGTAC
901	GTGGATGGCG	TGGAGGTGCA	TAATGCCAAG	ACAAAGCCGC	GGGAGGAGCA
951	GTTCAACAGC	ACGTACCGTG	TGGTCAGCGT	CCTCACCGTC	CTGCACCAGG
1001	ACTGGCTGAA	CGGCAAGGAG	TACAAGTGCA	AGGTCTCCAA	CAAAGGCCTC
1051	CCGTCTCTCA	TCGAGAAAAC	CATCTCCAAA	GCCAAAGGGC	AGCCCCGAGA
1101	GCCACAGGTG	TACACCCTGC	CCCCATCCCA	GGAGGAGATG	ACCAAGAACC
1151	AGGTCAGCCT	GACCTGCCTG	GTCAAAGGCT	TCTACCCAG	CGACATCGCC
1201	GTGGAGTGGG	AGAGCAATGG	ACAGCCGGAG	AACAACCTACA	AGACCACGCC
1251	TCCCGTGCTG	GACTCCGACG	GCTCCTTCTT	CCTCTACAGC	AGGCTAACCG
1301	TGGACAAGAG	CAGGTGGCAG	GAGGGGAATG	TCTTCTCATG	CTCCGTGATG
1351	CATGAGGCTC	TGCACAACCA	CTACACACAG	AAGAGCCTCT	CCCTGTCTCT
1401	GGGTAAATGA				

SEQ ID NO. 18
Secuencia proteica de la cadena pesada pronosticada de 6.34.2

1	mefglswvfl	vallrgvqcQ	VQLVESGGGV	VQPGRSLRLS	CAASGFTFSS
51	YGMHWVRQAP	GKGLEWVAVI	SNDGNNKYIA	DSVKGRFTIS	RDNSKNTLYL
101	QMNSLSAEDT	AVYYCARDST	AITYYYYGMD	VWGQGTTVTV	SSASTKGPSV
151	FPLAPCSRST	SESTAALGCL	VKDYFPEPVT	VSWNSGALTS	GVHTFPAVLQ
201	SSGLYSLSSV	VTVPSSSLGT	KTYTCNVDHK	PSNTKVDKRV	ESKYGPPCPS
251	CPAPEFLGGP	SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE	VTCVVVDVSQ	EDPEVQFNWY
301	VDGVEVHNAK	TKPREEQFNS	TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKGL
351	PSSIEKTISK	AKGQPREPQV	YTLPPSQEEM	TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA
401	VEWESNGQPE	NNYKTTPPVL	DSDGSFFLYS	RLTVDKSRWQ	EGNVFSCSVM
451	HEALHNHYTQ	KSLSLSLGK			

SEQ ID NO. 19
Secuencia nucleotídica de la cadena liviana kappa de 6.34.2

1	atggacatga	gggtccccgc	tcagctcctg	gggctcctgc	tactctggct
51	ccgaggtgcc	agatgtGACA	TCCAGATGAC	CCAGTCTCCA	TCCTCCCTGT
101	CTGCATCTGT	CGGAGACAGA	GTCACCATCA	CTTGCCGGGC	AAGTCAGAAT
151	ATTAGTAGCT	ATTTAAATTG	GTTTCAGCAG	AAACCAGGGA	AAGCCCCTAA
201	GCTCCTGATC	TATGCTGCAT	CCGGTTTGAA	GCGTGGGGTC	CCATCACGGT
251	TCAGTGGTAG	TGGATCTGGG	ACAGATTTC	CTCTCACC	ATCAGTCTCC
301	CAACCTGATG	ATTTTGCAAC	TTACTCCTGT	CACCAGAGTT	ACAGTCTCCC
351	ATTCACCTTC	GGCCCTGGGA	CCAAAGTGGA	TATCAAACGA	ACTGTGGCTG
401	CACCATCTGT	CTTCATCTTC	CCGCCATCTG	ATGAGCAGTT	GAAATCTGGA
451	ACTGCCTCTG	TTGTGTGCCT	GCTGAATAAC	TTCTATCCCA	GAGAGGCCAA
501	AGTACAGTGG	AAGGTGGATA	ACGCCCTCCA	ATCGGGTAAC	TCCCAGGAGA
551	GTGTCACAGA	GCAGGACAGC	AAGGACAGCA	CCTACAGCCT	CAGCAGCACC
601	CTGACGCTGA	GCAAAGCAGA	CTACGAGAAA	CACAAAGTCT	ACGCCTGCGA
651	AGTCACCCAT	CAGGGCCTGA	GCTCGCCCGT	CACAAAGAGC	TTCAACAGGG
701	GAGAGTGTTA	GTGA			

SEQ ID NO. 20
Secuencia proteica de la cadena liviana kappa pronosticada de 6.34.2

1	mdmrvpaql	gl	llllwlr	ga	rc	DIQMTQSP	SSLSASVGDR	VTITCRASQN
51	ISSYLNWFQQ	KPGKAPKLLI	YAASGLKRGV	PSRFSGSGSG	TDFTLTIRTL			
101	QPDDFATYSC	HQSYSLPFTF	GPGTKVDIKR	TVAAPSVFIF	PPSDEQLKSG			
151	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYLSST			
201	LTLKADYEK	HKVYACEVTH	QGLSSPVTKS	FNRGEC				

143 132
134

SEQ ID NO. 21
Secuencia nucleotídica de la cadena pesada de 6.67.1

1	atgaaacacc	tgtggttctt	cctcctgctg	gtggcagctc	ccagatgggt
51	cctgtcccCAG	GTGCAGCTGC	AGGAGTCGGG	CCCAGGACTG	GTGAAGCCTT
101	CGGAGACCCT	GTCCCTCACC	TGCACTGTCT	CTGGTGACTC	CATCAGTAGT
151	AACTATTGGA	GCTGGATCCG	GCAGCCCGCC	GGGAAGGGAC	TGGAGTGGAT
201	TGGGCGTATC	TATACCACTG	GGGGCACCAA	CTCCAACCCC	TCCCTCAGGG
251	GTCGAGTCAC	CATTTTAGCA	GACACGTCCA	AGAACCAGTT	CTCTCTGAAA
301	CTGAGTTCTG	TGACCGCCGC	GGACACGGCC	GTGTATTACT	GTGCGAGAGA
351	TCGTATTACT	ATAATTCGGG	GACTTATTCC	ATCCTTCTTT	GACTACTGGG
401	GCCAGGGAAC	CCTGGTCACC	GTCTCCTCAG	CTTCCACCAA	GGGCCCATCC
451	GTCTTCCCC	TGGCGCCCTG	CTCCAGGAGC	ACCTCCGAGA	GCACAGCCGC
501	CCTGGGCTGC	CTGGTCAAGG	ACTACTTCCC	CGAACCGGTG	ACGGTGTTCGT
551	GGAACTCAGG	CGCCCTGACC	AGCGGCGTGC	ACACCTTCCC	GGCTGTCTTA
601	CAGTCCTCAG	GACTCTACTC	CCTCAGCAGC	GTGGTGACCG	TGCCCTCCAG
651	CAGCTTGGGC	ACGAAGACCT	ACACCTGCAA	CGTAGATCAC	AAGCCCAGCA
701	ACACCAAGGT	GGACAAGAGA	GTTGAGTCCA	AATATGGTCC	CCCATGCCCA
751	TCATGCCCAG	CACCTGAGTT	CCTGGGGGGA	CCATCAGTCT	TCCTGTTCCC
801	CCCAAACCC	AAGGACACTC	TCATGATCTC	CCGACCCCT	GAGGTCACGT
851	GCGTGGTGGT	GGACGTGAGC	CAGGAAGACC	CCGAGGTCCA	GTTCAACTGG
901	TACGTGGATG	GCGTGGAGGT	GCATAATGCC	AAGACAAAGC	CGCGGGAGGA
951	GCAGTTCAAC	AGCACGTACC	GTGTGGTCAG	CGTCCTCACC	GTCCTGCACC
1001	AGGACTGGCT	GAACGGCAAG	GAGTACAAGT	GCAAGGTCTC	CAACAAAGGC
1051	CTCCCGTCCT	CCATCGAGAA	AACCATCTCC	AAAGCCAAAG	GGCAGCCCCG
1101	AGAGCCACAG	GTGTACACCC	TGCCCCCATC	CCAGGAGGAG	ATGACCAAGA
1151	ACCAGGTCAG	CCTGACCTGC	CTGGTCAAAG	GCTTCTACCC	CAGCGACATC
1201	GCCGTGGAGT	GGGAGAGCAA	TGGGCAGCCG	GAGAACAAC	ACAAGACCAC
1251	CCCTCCCGTG	CTGGACTCCG	ACGGCTCCTT	CTTCCTCTAC	AGCAGGCTAA
1301	CCGTGGACAA	GAGCAGGTGG	CAGGAGGGGA	ATGTCTTCTC	ATGCTCCGTG
1351	ATGCATGAGG	CTCTGCACAA	CCACTACACA	CAGAAGAGCC	TCTCCCTGTC
1401	TCTGGGTAAA	TGA			

SEQ ID NO. 22
Secuencia proteica de la cadena pesada pronosticada de 6.67.1

1	mkhlwfflll	vaaprwlsQ	VQLQESGPGL	VKPSETLSLT	CTVSGDSISS
51	NYWSWIRQPA	GKGLEWIGRI	YTSGGTNSNP	SLRGRVTILA	DTSKNQFSLK
101	LSSVTAADTA	VYYCARDRIT	IIRGLIPSFF	DYWGQGLVT	VSSASTKGPS
151	VFPLAPCSRS	TSESTAALGC	LVKDYFPEPV	TVSWNSGALT	SGVHTFPAVL
201	QSSGLYSLSS	VVTVPSSSLG	TKTYTCNVDH	KPSNTKVDKR	VESKYGPPCP
251	SCPAPEFLGG	PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCTVVVDVS	QEDPEVQFNW
301	YVDGVEVHNA	KTKPREEQFN	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKG
351	LPSSIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSQEE	MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI
401	AVEWESNGQP	ENNYKTPPV	LDSDGSFFLY	SRLTVDKSRW	QEGNVFSCSV
451	MHEALHNHYT	QKSLSLSLGK			

SEQ ID NO. 23
Secuencia nucleotídica de la cadena liviana kappa de 6.67.1

1	<u>atggtgttgc</u>	<u>agacccaggt</u>	<u>cttcatttct</u>	<u>ctgttgctct</u>	<u>ggatctctgg</u>
51	<u>tgcctacggg</u>	GACATCGTGA	TGACCCAGTC	TCCAGACTCC	CTGGCTGTGT
101	CTCTGGGCGA	GAGGGCCACC	ATCAACTGCA	AGTCCAGCCA	GAGTGTTTTA
151	TACAGCTCCA	ACAATAAGAC	CTACTTAGCT	TGGTACCAAC	AGAAACCAAG
201	ACAGCCTCCT	AAATTGCTCA	TTTACTGGGC	ATCTATACGG	GAATATGGGG
251	TCCCTGACCG	ATTCAGTGGC	AGCGGGTCTG	GGACAGATTT	CACTCTCACC
301	ATCAGCAGCC	TGCAGGCTGA	AGATGTGGCA	GTTTATTTCT	GTCAACAATA
351	TTATAGTATT	CCTCCCCTCA	CTTTCGGCGG	AGGGACCAAG	GTGGAGATCA
401	AACGAACTGT	GGCTGCACCA	TCTGTCTTCA	TCTTCCCGCC	ATCTGATGAG
451	CAGTTGAAAT	CTGGAAGTGC	CTCTGTTGTG	TGCCTGCTGA	ATAACTTCTA
501	TCCCAGAGAG	GCCAAAGTAC	AGTGGAAGGT	GGATAACGCC	CTCCAATCGG
551	GTAAGTCCCA	GGAGAGTGTC	ACAGAGCAGG	ACAGCAAGGA	CAGCACCTAC
601	AGCCTCAGCA	GCACCCTGAC	GCTGAGCAAA	GCAGACTACG	AGAAACACAA
651	AGTCTACGCC	TGCGAAGTCA	CCCATCAGGG	CCTGAGCTCG	CCCGTCACAA
701	AGAGCTTCAA	CAGGGGAGAG	TGTTAGTGA		

SEQ ID NO. 24
Secuencia proteica de la cadena liviana kappa pronosticada de 6.67.1

1	<u>mvlqtqvfis</u>	<u>lllwisgayg</u>	DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSVL
51	YSSNNKTYLA	WYQQKPRQPP	KLLIYWASIR	EYGVPRDFSG	SGSGTDFTLT
101	ISSLQAEDVA	VYFCQQYYSI	PPLTFGGGTK	VEIKRTVAAP	SVFIFPPSDE
151	QLKSGTASVV	CLLNNFYPRE	AKVQWKVDNA	LQSGNSQESV	TEQDSKDSTY
201	SLSSTLTLSK	ADYEKHKVYA	CEVTHQGLSS	PVTKSFNERGE	C

SEQ ID NO. 25
Secuencia nucleotídica de la cadena pesada de 6.73.2

1	atggagtttg	ggctgagctg	gcttttttctt	gtggctatatt	taaaaggtgt
51	ccagtgtGAG	GTGCAGCTGT	TGGAGTCTGG	GGGAGACTTG	GTCCAGCCTG
101	GGGGGTCCCT	GAGACTCTCC	TGTGCAGCCT	CTGGATTAC	CTTTAGAAGT
151	TATGCCATGA	ACTGGGTCCG	ACAGGCTCCA	GGGAAGGGGC	TGGAGTGGGT
201	CTCAGTTATT	AGTGGTCGTG	GTGGTACTAC	ATACTACGCA	GACTCCGTGA
251	AGGGCCGGTT	CACCATCTCC	AGAGACAATT	CCAAGAACAC	GCTGTATCTG
301	CAAATGAACA	GCCTGAGAGC	CGAGGACGCG	GCCGTATATT	ACTGTGCGAA
351	GATAGCAGTG	GCTGGAGAGG	GGCTCTACTA	CTACTACGGT	ATGGACGTCT
401	GGGGCCAAGG	GACCACGGTC	ACCGTCTCCT	CAGCTTCCAC	CAAGGGCCCA
451	TCCGTCTTCC	CCCTGGCGCC	CTGCTCCAGG	AGCACCTCCG	AGAACACAGC
501	CGCCCTGGGC	TGCCTGGTCA	AGGACTACTT	CCCCGAACCG	GTGACGGTGT
551	CGTGGAATC	AGGCGCCCTG	ACCAGCGGCG	TGCACACCTT	CCCGGCTGTC
601	CTACAGTCCT	CAGGACTCTA	CTCCCTCAGC	AGCGTGGTGA	CCGTGCCCTC
651	TAGCAGCTTG	GGCACGAAGA	CCTACACCTG	CAACGTAGAT	CACAAGCCCA
701	GCAACACCAA	GGTGGACAAG	AGAGTTGAGT	CCAAATATGG	TCCCCCATGC
751	CCATCATGCC	CAGCACCTGA	GTTCTCTGGG	GGACCATCAG	TCTTCCTGTT
801	CCCCCCAAAA	CCCAAGGACA	CTCTCATGAT	CTCCCGGACC	CCTGAGGTCA
851	CGTGCGTGGT	GGTGGACGTG	AGCCAGGAAG	ACCCCGAGGT	CCAGTTCAAC
901	TGGTACGTGG	ATGGCGTGGA	GGTGCATAAT	GCCAAGACAA	AGCCGCGGGA
951	GGAGCAGTTC	AACAGCACGT	ACCGTGTGGT	CAGCGTCCTC	ACCGTCCTGC
1001	ACCAGGACTG	GCTGAACGGC	AAGGAGTACA	AGTGCAAGGT	CTCCAACAAA
1051	GGCCTCCCGT	CCTCCATCGA	GAAAACCATC	TCCAAAGCCA	AAGGGCAGCC
1101	CCGAGAGCCA	CAGGTGTACA	CCCTGCCCCC	ATCCCAGGAG	GAGATGACCA
1151	AGAACCAGGT	CAGCCTGACC	TGCCTGGTCA	AAGGCTTCTA	CCCCAGCGAC
1201	ATCGCCGTGG	AGTGGGAGAG	CAATGGGCAG	CCGAGAACA	ACTACAAGAC
1251	CACGCCTCCC	GTGCTGGACT	CCGACGGCTC	CTTCTTCCTC	TACAGCAGGC
1301	TAACCGTGGA	CAAGAGCAGG	TGGCAGGAGG	GGAATGTCTT	CTCATGCTCC
1351	GTGATGCATG	AGGCTCTGCA	CAACCACTAC	ACACAGAAGA	GCCTCTCCCT
1401	GTCTCTGGGT	AAATGATAG			

SEQ ID NO. 26
Secuencia proteica de la cadena pesada pronosticada de 6.73.2

1	mefglswlfl	vailkgvqcE	VQLLESGGDL	VQPGGSLRLS	CAASGFTFRS
51	YAMNWVRQAP	GKGLEWVSVI	SGRGGTTYIA	DSVKGRFTIS	RDNSKNTLYL
101	QMNSLRAEDA	AVYYCAKIAV	AGEGLYYYYG	MDVWGQGTTV	TVSSASTKGP
151	SVFPLAPCSR	STSENTAALG	CLVKDYFPEP	VTVSWNSGAL	TSGVHTFPAV
201	LQSSGLYSL	SVVTVPSSSL	GTKTYTCNVD	HKPSNTKVVK	RVESKYGPPC
251	PSCPAPPEFLG	GPSVFLFPPK	PKDTLMISRT	PEVTCVVVDV	SQEDPEVQFN
301	WYVDGVEVHN	AKTKPREEQF	NSTYRVVSVL	TVLHQDWLNG	KEYKCKVSNK
351	GLPSSIEKTI	SKAKGQPREP	QVYTLPPSQE	EMTKNQVSLT	CLVKGFYPSD
401	IAVEWESNGQ	PENNYKTPPP	VLDSDGSFFL	YSRLTVDKSR	WQEGNVFSCS
451	VMHEALHNHY	TQKSLSLSLG	K		

SEQ ID NO. 27

Secuencia nucleotídica de la cadena liviana kappa de 6.73.2

1	atggacatga	gggtccccgc	tcagctcctg	gggctcctgc	tactctggct
51	ccgaggtgcc	agatgtGACA	TCCAGATGAC	CCAGTCTCCA	TCCTCCCTGT
101	CTGCATCTGT	AGGTGACAGA	GTCACCTTCA	CTTGCCGGGC	AAGTCAGAAC
151	ATTACCAACT	ATTTAAATTG	GTATCAGCAG	AAACCAGGGA	AGGCCCCTAA
201	GCTCCTGATC	TATGCTGCGT	CCAGTTTGCC	AAGAGGGGTC	CCATCAAGGT
251	TCCGTGGCAG	TGGATCTGGG	ACAGATTTCA	CTCTCACCAT	CAGCAGTCTG
301	CAACCTGAAG	ATTTTGCAAC	TTACTACTGT	CAACAGAGTT	ACAGTAATCC
351	TCCGGAGTGC	GGTTTTGGCC	AGGGGACCAC	GCTGGATATC	AAACGAACTG
401	TGGCTGCACC	ATCTGTCTTC	ATCTTCCCGC	CATCTGATGA	GCAGTTGAAA
451	TCTGGAAGTG	CCTCTGTTGT	GTGCCTGCTG	AATAACTTCT	ATCCAGAGA
501	GGCCAAAGTA	CAGTGGAAGG	TGGATAACGC	CCTCCAATCG	GGTAACTCCC
551	AGGAGAGTGT	CACAGAGCAG	GACAGCAAGG	ACAGCACCTA	CAGCCTCAGC
601	AGCACCCCTGA	CGCTGAGCAA	AGCAGACTAC	GAGAAACACA	AAGTCTACGC
651	CTGCGAAGTC	ACCCATCAGG	GCCTGAGCTC	GCCCGTCACA	AAGAGCTTCA
701	ACAGGGGAGA	GTGTTAGTGA			

SEQ ID NO. 28

Secuencia proteica de la cadena liviana kappa pronosticada de 6.73.2

1	mdmrvpaql	l gllllwlrga	rcDIQMTQSP	SSLASVGDR	VTFTCRASQN
51	ITNYLNWYQQ	KPGKAPKLLI	YAASSLPRGV	PSRFRGSGSG	TDFTLTISL
101	QPEDFATYYC	QSYSNPPEC	GFGQGTTLDI	KRTVAAPSVF	IFPPSDEQLK
151	SGTASVVCLL	NNFYPREAKV	QWKVDNALQS	GNSQESVTEQ	DSKDSTYSL
201	STLTLSKADY	ECHKVYACEV	THQGLSSPVT	KSFNRGEC	

SEQ ID NO. 29
Secuencia nucleotídica de la cadena pesada de 6.77.1

1	atggaactgg	ggctccgctg	ggtttttcctt	gttgctatatt	tagaaggtgt
51	ccagtgtGAG	GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGGCCTG	GTCAAGCCTG
101	GGGGGTCCCT	GAGACTCTCC	TGTGCAGCCT	CTGGATTAC	CTTCAGTAGC
151	TATAGCATGA	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA	GGGAAGGGGC	TGGAGTGGGT
201	CTCATCCATT	AGTAGTAGTA	GTAGTTACAT	ATACTACGCA	GACTCAGTGA
251	AGGGCCGATT	CACCATCTCC	AGAGACAACG	CCAAGAACTC	ACTGTATCTG
301	CAAATGAACA	GCCTGAGAGC	CGAGGACACG	GCTGTGTATT	ACTGTGCGAG
351	AGATGGGTAT	AGCAGTGGCT	GGTCCTACTA	CTACTACTAC	GGTATGGACG
401	TCTGGGGCCA	AGGGACCACG	GTCACCGTCT	CCTCAGCTTC	CACCAAGGGC
451	CCATCCGTCT	TCCCCCTGGC	GCCCTGCTCC	AGGAGCACCT	CCGAGAGCAC
501	AGCCGCCCTG	GGCTGCCTGG	TCAAGGACTA	CTTCCCCGAA	CCGGTGACGG
551	TGTCGTGGAA	CTCAGGCGCC	CTGACCAGCG	GCGTGACAC	CTTCCCGGCT
601	GTCCTACAGT	CCTCAGGACT	CTACTCCCTC	AGCAGCGTGG	TGACCGTGCC
651	CTCCAGCAGC	TTGGGCACGA	AGACCTACAC	CTGCAACGTA	GATCACAAGC
701	CCAGCAACAC	CAAGGTGGAC	AAGAGAGTTG	AGTCCAAATA	TGGTCCCCCA
751	TGCCCATCAT	GCCCAGCACC	TGAGTTCCTG	GGGGGACCAT	CAGTCTTCCT
801	GTTCCCCCCA	AAACCCAAGG	ACACTCTCAT	GATCTCCCGG	ACCCCTGAGG
851	TCACGTGCGT	GGTGGTGGAC	GTGAGCCAGG	AAGACCCCGA	GGTCCAGTTC
901	AACTGGTACG	TGGATGGCGT	GGAGGTGCAT	AATGCCAAGA	CAAAGCCGCG
951	GGAGGAGCAG	TTCAACAGCA	CGTACCGTGT	GGTCAGCGTC	CTCACCGTCC
1001	TGCACCAGGA	CTGGCTGAAC	GGCAAGGAGT	ACAAGTGCAA	GGTCTCCAAC
1051	AAAGGCCTCC	CGTCCTCCAT	CGAGAAAACC	ATCTCCAAAG	CCAAAGGGCA
1101	GCCCCGAGAG	CCACAGGTGT	ACACCCTGCC	CCCATCCCAG	GAGGAGATGA
1151	CCAAGAACCA	GGTCAGCCTG	ACCTGCCTGG	TCAAAGGCTT	CTACCCCAGC
1201	GACATCGCCG	TGGAGTGGGA	GAGCAATGGG	CAGCCGGAGA	ACAACACAA
1251	GACCACGCCT	CCCGTGCTGG	ACTCCGACGG	CTCCTTCTTC	CTCTACAGCA
1301	GGCTAACCGT	GGACAAGAGC	AGGTGGCAGG	AGGGGAATGT	CTTTTCACGC
1351	TCCGTGATGC	ATGAGGCTCT	GCACAACCAC	TACACACAGA	AGAGCCTCTC
1401	CCTGTCTCTG	GGTAAATGAT	AGGAATTCTG	ATGA	

SEQ ID NO. 30
Secuencia proteica de la cadena pesada pronosticada de 6.77.1

1	melglrwvfl	vailegvqcE	VQLVESGGGL	VKPGGSLRLS	CAASGFTFSS
51	YSMNWVRQAP	GKGLEWVSSI	SSSSSYIYYA	DSVKGRFTIS	RDNAKNSLYL
101	QMNSLRAEDT	AVYYCARDGY	SSGWSYYYYY	GMDVWQGTT	VTVSSASTKG
151	PSVFPLAPCS	RSTSESTAAL	GCLVKDYFPE	PVTVSWNSGA	LTSGVHTFPA
201	VLQSSGLYSL	SSVVTVPSSS	LGTKTYTCNV	DHKPSNTKVD	KRVESKYGPP
251	CPSCPAPEFL	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSQEDPEVQF
301	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	FNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN
351	KGLPSSIEKT	ISKAKQPRE	PQVYTLPPSQ	EEMTKNQVSL	TCLVKGFYPS
401	DIAVEWESNG	QPENNYKTP	PVLDSGDSFF	LYSRLTVDKS	RWQEGNVFSR
451	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSL	GK		

SEQ ID NO. 31
Secuencia nucleotídica de la cadena liviana kappa de 6.77.1

1	<u>atgaggctcc</u>	<u>ctgctcagct</u>	<u>cctggggctg</u>	<u>ctaattgctct</u>	<u>ggataacctgg</u>
51	<u>atccagtgca</u>	GATATTGTGA	TGACCCAGAC	TCCACTCTCT	CTGTCCGTCA
101	CTCCTGGACA	GCCGGCCTCC	ATCTCCTGCA	ACTCTAGTCA	GAGCCTCCTG
151	CTTAGTGATG	GAAAGACCTA	TTTGAATTGG	TACCTGCAGA	AGCCCGGCCA
201	GCCTCCACAG	CTCCTGATCT	ATGAAGTTTC	CAACCGGTTC	TCTGGAGTGC
251	CAGACAGGTT	CAGTGGCAGC	GGGTCAGGGA	CAGATTTTCA	ACTGAAAATC
301	AGCCGGGTGG	AGGCTGAGGA	TGTTGGGGTT	TATTCCTGCA	TGCAAAGTAT
351	ACAGCTTATG	TGCAGTTTTG	GCCAGGGGAC	CAAGCTGGAG	ATCAAACGAA
401	CTGTGGCTGC	ACCATCTGTC	TTCATCTTCC	CGCCATCTGA	TGAGCAGTTG
451	AAATCTGGAA	CTGCCTCTGT	TGTGTGCCTG	CTGAATAACT	TCTATCCCAG
501	AGAGGCCAAA	GTACAGTGGA	AGGTGGATAA	CGCCCTCCAA	TCGGGTAACT
551	CCCAGGAGAG	TGTCACAGAG	CAGGACAGCA	AGGACAGCAC	CTACAGCCTC
601	AGCAGCACCC	TGACGCTGAG	CAAAGCAGAC	TACGAGAAAC	ACAAAGTCTA
651	CGCCTGCGAA	GTCACCCATC	AGGGCCTGAG	CTCGCCCGTC	ACAAAGAGCT
701	TCAACAGGGG	AGAGTGTTAG	TGA		

SEQ ID NO. 32
Secuencia proteica de la cadena liviana kappa pronosticada de 6.77.1

1	<u>mrlpaqlllgl</u>	<u>lmlwipgssa</u>	DIVMTQTPLS	LSVTPGQPAS	ISCNSSQSLL
51	LSDGKTYLNW	YLQKPGQPPQ	LLIYEVSNRF	SGVPDRFSGS	SGGTDFTLKI
101	SRVEAEDVG	YSCMQSIQLM	CSFGQGTKLE	IKRTVAAPSV	FIFPPSDEQL
151	KSGTASVVCL	LNNFYPREAK	VQWKVDNALQ	SGNSQESVTE	QDSKDSTYSL
201	SSTLTLSKAD	YEKHKVYACE	VTHQGLSSPV	TKSFNRGEC	

SEQ ID NO. 33
Secuencia nucleotídica de la cadena pesada de 7.16.6

1	atggactgga	cctggagcat	ccttttcttg	gtggcagcag	caacaggtgc
51	ccactccCAG	GTTCAGCTGG	TGCAGTCTGG	AGCTGAGGTG	AAGAAGCCTG
101	GGGCCTCAGT	GAAGGTCTCC	TGCAAGGCTT	CTGGTTACAC	CTTTACCAGC
151	TATGGTATCA	ACTGGGTGCG	ACAGGCCCTT	GGACAAGGGC	TTGAGTGGAT
201	GGGATGGATC	AGCGTTTACA	GTGGTAACAC	AAACTATGCA	CAGAAGGTCC
251	AGGGCAGAGT	CACCATGACC	GCAGACACAT	CCACGAGCAC	AGCCTACATG
301	GACCTGAGGA	GCCTGAGATC	TGACGACACG	GCCGTGTATT	ACTGTGCGAG
351	AGAGGGTAGC	AGCTCGTCCG	GAGACTACTA	TTACGGTATG	GACGTCTGGG
401	GCCAAGGGAC	CACGGTCACC	GTCTCCTCAG	CCTCCACCAA	GGGCCCATCG
451	GTCTTCCCCC	TGGCGCCCTG	CTCCAGGAGC	ACCTCCGAGA	GCACAGCGGC
501	CCTGGGCTGC	CTGGTCAAGG	ACTACTTCCC	CGAACCGGTG	ACGGTGTTCGT
551	GGAACTCAGG	CGCTCTGACC	AGCGGCGTGC	ACACCTTCCC	AGCTGTCTTA
601	CAGTCCTCAG	GACTCTACTC	CCTCAGCAGC	GTGGTGACCG	TGCCCTCCAG
651	CAACTTCGGC	ACCCAGACCT	ACACCTGCAA	CGTAGATCAC	AAGCCCAGCA
701	ACACCAAGGT	GGACAAGACA	GTTGAGCGCA	AATGTTGTGT	CGAGTGCCCA
751	CCGTGCCCAG	CACCACCTGT	GGCAGGACCG	TCAGTCTTCC	TCTTCCCCCC
801	AAAACCCAAG	GACACCCTCA	TGATCTCCCG	GACCCCTGAG	GTCACGTGCG
851	TGGTGGTGGA	CGTGAGCCAC	GAAGACCCCG	AGGTCCAGTT	CAACTGGTAC
901	GTGGACGGCG	TGGAGGTGCA	TAATGCCAAG	ACAAAGCCAC	GGGAGGAGCA
951	GTTCAACAGC	ACGTTCCGTG	TGGTCAGCGT	CCTCACCGTT	GTGCACCAGG
1001	ACTGGCTGAA	CGGCAAGGAG	TACAAGTGCA	AGGTCTCCAA	CAAAGGCCTC
1051	CCAGCCCCCA	TCGAGAAAAC	CATCTCCAAA	ACCAAAGGGC	AGCCCCGAGA
1101	ACCACAGGTG	TACACCCTGC	CCCCATCCCG	GGAGGAGATG	ACCAAGAACC
1151	AGGTCAGCCT	GACCTGCCTG	GTCAAAGGCT	TCTACCCAG	CGACATCGCC
1201	GTGGAGTGGG	AGAGCAATGG	GCAGCCGGAG	AACAACACTA	AGACCACACC
1251	TCCCATGCTG	GACTCCGACG	GCTCCTTCTT	CCTCTACAGC	AAGCTCACCG
1301	TGGACAAGAG	CAGGTGGCAG	CAGGGGAACG	TCTTCTCATG	CTCCGTGATG
1351	CATGAGGCTC	TGCACAACCA	CTACACGCAG	AAGAGCCTCT	CCCTGTCTCC
1401	GGGTAAATGA				

SEQ ID NO. 34
Secuencia proteica de la cadena pesada pronosticada de 7.16.6

1	mdwtwsilfl	vaaatgahsQ	VQLVQSGAEV	KKPGASVKVS	CKASGYTFTS
51	YGINWVRQAP	GQGLEWMGWI	SVYSGNTNYA	QKVQGRVTMT	ADTSTSTAYM
101	DLRSLRSDDT	AVYYCAREGS	SSSGDYYYGM	DVWGQGTTVT	VSSASTKGPS
151	VFPLAPCSRS	TSESTAALGC	LVKDYFPEPV	TVSWNSGALT	SGVHTFPAVL
201	QSSGLYSLSS	VVTVPSSNFG	TQTYTCNVDH	KPSNTKVDKT	VERKCCVECP
251	PCPAPPVAGP	SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE	VTCVVVDVSH	EDPEVQFNWY
301	VDGVEVHNAK	TKPREEQFNS	TFRVVSVLTV	VHQDWLNGKE	YKCKVSNKGL
351	PAPIEKTISK	TKGQPREPQV	YTLPPSREEM	TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA
401	VEWESNGQPE	NNYKTTTPML	DSDGSFFFLYS	KLTVDKSRWQ	QGNVFSCSVM
451	HEALHNHYTQ	KSLSLSPGK			

SEQ ID NO. 35
Secuencia nucleotídica de la cadena liviana kappa de 7.16.6

1	<u>atgaggctcc</u>	<u>ctgctcagct</u>	<u>cctgggggctg</u>	<u>ctaatgctct</u>	<u>ggatacctgg</u>
51	<u>atccagtgca</u>	GATATTGTGA	TGACCCAGAC	TCCACTCTCT	CTGTCCGTCA
101	CCCCTGGACA	GCCGGCCTCC	ATCTCCTGCA	AGTCTAGTCA	GAGCCTCCTG
151	CATACTGATG	GAACGACCTA	TTTGTATTGG	TACCTGCAGA	AGCCAGGCCA
201	GCCTCCACAG	CTCCTGATCT	ATGAAGTTTC	CAACCGGTTC	TCTGGAGTGC
251	CAGATAGGTT	CAGTGGCAGC	GGGTCAGGGA	CAGATTTTCA	CTGAAAATC
301	AGCCGGGTGG	AGGCTGAGGA	TGTTGGGATT	TATTACTGCA	TGCAAAATAT
351	ACAGCTTCCG	TGGACGTTCC	GCCAAGGGAC	CAAGGTGGAA	ATCAAACGAA
401	CTGTGGCTGC	ACCATCTGTC	TTCATCTTCC	CGCCATCTGA	TGAGCAGTTG
451	AAATCTGGAA	CTGCCTCTGT	TGTGTGCCTG	CTGAATAACT	TCTATCCCAG
501	AGAGGCCAAA	GTACAGTGGA	AGGTGGATAA	CGCCCTCCAA	TCGGGTAACT
551	CCCAGGAGAG	TGTCACAGAG	CAGGACAGCA	AGGACAGCAC	CTACAGCCTC
601	AGCAGCACCC	TGACGCTGAG	CAAAGCAGAC	TACGAGAAAC	ACAAAGTCTA
651	CGCCTGCGAA	GTCACCCATC	AGGGCCTGAG	CTCGCCCGTC	ACAAAGAGCT
701	TCAACAGGGG	AGAGTGTTAG	TGA		

SEQ ID NO. 36
Secuencia proteica de la cadena liviana kappa de 7.16.6

1	<u>mrlpaqlllgl</u>	<u>lmlwipgssa</u>	DIVMTQTPLS	LSVTPGQPAS	ISCKSSQSLL
51	HTDGTTYLYW	YLQKPGQPPQ	LLIYEVSNRF	SGVPDRFSGS	GSGETDFTLKI
101	SRVEAEDVGI	YYCMQNIQLP	WTFGQGTKVE	IKRTVAAPSV	FIFPPSDEQL
151	KSGTASVVCL	LNNFYPREAK	VQWKVDNALQ	SGNSQESVTE	QDSKDSTYSL
201	SSTLTLSKAD	YEKHKVYACE	VTHQGLSSPV	TKSFNRGEC	

140
142
151

SEQ ID NO. 37
Secuencia nucleotídica de la cadena pesada de 7.20.5

1	atgaaacacc	tgtgggttctt	cctcctgctg	gtggcagctc	ccagatgggt
51	cctgtccCAG	GTGCAGCTGC	AGGAGTCGGG	CCCAGGACTG	GTGAAGCCTT
101	CGGAGACCCT	GTCCCTCACC	TGCACTGTCT	CTGGTAGCTC	CATCAGTAGT
151	TACCACTGGA	ACTGGATCCG	GCAGCCCGCC	GGGAAGGGAC	TGGAGTGGAT
201	TGGGCGTATC	TATACCACTG	GGAGCACCAA	CTACAACCCC	TCCCTCAAGA
251	GTCGAGTCAC	CATGTCTACTA	GACACGTCCA	AGAACCAGTT	CTCCCTGAAG
301	CTGAGCTCTG	TGACCGCCGC	GGACACGGCC	GTGTATTACT	GTGCGAGAGA
351	GGGGGTCTAGG	TATTACTATG	CTTCGGGGAG	TTATTACTAC	GGTCTGGACG
401	TCTGGGGCCA	AGGGACCACG	GTCACCGTCT	CCTCAGCCTC	CACCAAGGGC
451	CCATCGGTCT	TCCCCCTGGC	GCCCTGCTCC	AGGAGCACCT	CCGAGAGCAC
501	AGCGGCCCTG	GGCTGCCTGG	TCAAGGACTA	CTTCCCCGAA	CCGGTGACGG
551	TGTCGTGGAA	CTCAGGCGCT	CTGACCAGCG	GCGTGACAC	CTTCCCAGCT
601	GTCCTACAGT	CCTCAGGACT	CTACTCCCTC	AGCAGCGTGG	TGACCGTGCC
651	CTCCAGCAAC	TTCGGCACCC	AGACCTACAC	CTGCAACGTA	GATCACAAGC
701	CCAGCAACAC	CAAGGTGGAC	AAGACAGTTG	AGCGCAAATG	TTGTGTCGAG
751	TGCCCACCGT	GCCCAGCACC	ACCTGTGGCA	GGACCGTCAG	TCTTCCTCTT
801	CCCCCAGAAA	CCCAAGGACA	CCCTCATGAT	CTCCCGGACC	CCTGAGGTCA
851	CGTGCGTGGT	GGTGGACGTG	AGCCACGAAG	ACCCCGAGGT	CCAGTTCAAC
901	TGGTACGTGG	ACGGCGTGGA	GGTGCATAAT	GCCAAGACAA	AGCCACGGGA
951	GGAGCAGTTC	AACAGCACGT	TCCGTGTGGT	CAGCGTCCTC	ACCGTTGTGC
1001	ACCAGGACTG	GCTGAACGGC	AAGGAGTACA	AGTGCAAGGT	CTCCAACAAA
1051	GGCCTCCCAG	CCCCCATCGA	GAAAACCATC	TCCAAAACCA	AAGGGCAGCC
1101	CCGAGAACCA	CAGGTGTACA	CCCTGCCCCC	ATCCCGGGAG	GAGATGACCA
1151	AGAACCAGGT	CAGCCTGACC	TGCCTGGTCA	AAGGCTTCTA	CCCCAGCGAC
1201	ATCGCCGTGG	AGTGGGAGAG	CAATGGGCAG	CCGGAGAACA	ACTACAAGAC
1251	CACACCTCCC	ATGCTGGACT	CCGACGGCTC	CTTCTTCCTC	TACAGCAAGC
1301	TCACCGTGGA	CAAGAGCAGG	TGGCAGCAGG	GGAACGTCTT	CTCATGCTCC
1351	GTGATGCATG	AGGCTCTGCA	CAACCACTAC	ACGCAGAAGA	GCCTCTCCCT
1401	GTCTCCGGGT	AAATGA			

SEQ ID NO. 38
Secuencia proteica de la cadena pesada pronosticada de 7.20.5

1	mkhlwfflll	vaaprwlsQ	VQLQESGPGL	VKPSETLSLT	CTVSGSSISS
51	YHWNWIRQPA	GKGLEWIGRI	YTSGSTNYNP	SLKSRVTMSL	DTSKNQFSLK
101	LSSVTAADTA	VYYCAREGVR	YYYASGSYYY	GLDVWGQGT	VTVSSASTKG
151	PSVFPLAPCS	RSTSESTAAL	GCLVKDYFPE	PVTVSWNSGA	LTSGVHTFPA
201	VLQSSGLYSL	SSVVTVPSSN	FGTQTYTCNV	DHKPSNTKVD	KTVERKCCVE
251	CPPCPAPPVA	GPSVFLFPPK	PKDTLMISRT	PEVTCVVVDV	SHEDPEVQFN
301	WYVDGVEVHN	AKTKPREEQF	NSTFRVSVSL	TVVHQDWLNG	KEYKCKVSNK
351	GLPAPIEKTI	SKTKGQPREP	QVYTLPPSRE	EMTKNQVSLT	CLVKGFYPSD
401	IAVEWESNGQ	PENNYKTTTP	MLDSDGSEFL	YSKLTVDKSR	WQQGNVFSCS
451	VMHEALHNHY	TQKSLSLSPG	K		

241
193
152

SEQ ID NO. 39
Secuencia nucleotídica de la cadena liviana kappa de 7.20.5

1	<u>atgaggctcc</u>	ctgctcagct	cctggggctg	ctaatgctct	gggtctctgg
51	<u>atccagtggg</u>	GATATTGTGA	TGACTCAGTC	TCCACTCTCC	CTGCCCCTCA
101	CCCCTGGAGA	GCCGGCCTCC	ATCTCCTGCA	GGTCTAGTCA	GAGCCTCCTG
151	CATGGTAATG	GATACAACTA	TTTGGATTGG	TACCTGCAGA	AGCCAGGGCA
201	GTCTCCACAG	CTCCTGATCT	ATTTGGGTTC	TAATCGGGCC	TCCGGGGTCC
251	CTGACAGGTT	CAGTGGCAGT	GGATCAGGCA	CAGATTTTAC	ACTGAAAATC
301	AGCAGAGTGG	AGGCTGAGGA	TGTTGGGGTT	TATTACTGCA	TGCAAGCTCT
351	ACAAACTCTC	ACTTTCGGCG	GAGGGACCAA	GGTGGAGATC	AAACGAACTG
401	TGGCTGCACC	ATCTGTCTTC	ATCTTCCCGC	CATCTGATGA	GCAGTTGAAA
451	TCTGGAAGTG	CCTCTGTTGT	GTGCCTGCTG	AATAACTTCT	ATCCCAGAGA
501	GGCCAAAGTA	CAGTGGAAGG	TGGATAACGC	CCTCCAATCG	GGTAACTCCC
551	AGGAGAGTGT	CACAGAGCAG	GACAGCAAGG	ACAGCACCTA	CAGCCTCAGC
601	AGCACCTGA	CGCTGAGCAA	AGCAGACTAC	GAGAAACACA	AAGTCTACGC
651	CTGCGAAGTC	ACCCATCAGG	GCCTGAGCTC	GCCCGTCACA	AAGAGCTTCA
701	ACAGGGGAGA	GTGTTAGTGA			

SEQ ID NO. 40
Secuencia proteica de la cadena liviana kappa pronosticada de 7.20.5

1	<u>mrlpaqlllgl</u>	<u>lmlwvsgssg</u>	DIVMTQSPLS	LPVTPGEPAS	ISCRSSQSLL
51	HGNGYNYLDW	YLQKPGQSPQ	LLIYLGSNRA	SGVPDRFSGS	GS GTDFTLKI
101	SRVEAEDVGV	YYCMQALQTL	TFGGGTKVEI	KRTVAAPSVF	IFPPSDEQLK
151	SGTASVVCLL	NNFYPREAKV	QWKVDNALQS	GNSQESVTEQ	DSKDSTYSLS
201	STLTLSKADY	EKKHVKYACEV	THQGLSSPVT	KSFNRGEC	

SEQ ID NO. 41
Secuencia nucleotídica de la cadena pesada de 7.26.4

1	atggactgga	cctggagcat	cctttttcttg	gtggcagcag	caacaggtgc
51	ccactcccCAG	GTTcAGCTGG	TGcAGTCTGG	AGCTGAGGTG	AAGAAGCCTG
101	GGGCCTCAGT	GAAGGTCTCC	TGCGAGGCTT	CTGGTTACAC	CTTTACCAGC
151	TATGGTATCG	ACTGGGTGCG	ACAGGCCCCT	GGACAAGGGC	TTGAGTGGAT
201	GGGATGGATC	AGCGTTTACA	GTGGTAACAC	AAACTATGCA	CAGAAGCTCC
251	AGGGCAGAGT	CACCATGTCC	ACAGACACAT	CCACGAGCAC	AGCCTACATG
301	GAGCTGAGGA	GCCTGAGATC	TGACGACACG	GCCGTGTATT	ACTGTGCGAG
351	AGAGGGTAGC	AGCTCGTCCG	GAGACTACTA	CTACGGTATG	GACGTCTGGG
401	GCCAAGGGAC	CACGGTCACC	GTCTCCTCAG	CCTCCACCAA	GGGCCCATCG
451	GTCTTCCCCC	TGGCGCCCTG	CTCCAGGAGC	ACCTCCGAGA	GCACAGCGGC
501	CCTGGGCTGC	CTGGTCAAGG	ACTACTTCCC	CGAACCGGTG	ACGGTGTCTG
551	GGAACTCAGG	CGCTCTGACC	AGCGGCGTGC	ACACCTTCCC	AGCTGTCTCTA
601	CAGTCCTCAG	GACTCTACTC	CCTCAGCAGC	GTGGTGACCG	TGCCCTCCAG
651	CAACTTCGGC	ACCCAGACCT	ACACCTGCAA	CGTAGATCAC	AAGCCCAGCA
701	ACACCAAGGT	GGACAAGACA	GTTGAGCGCA	AATGTTGTGT	CGAGTGCCCA
751	CCGTGCCCAG	CACCACCTGT	GGCAGGACCG	TCAGTCTTCC	TCTTCCCCCC
801	AAAACCCAAG	GACACCCTCA	TGATCTCCCG	GACCCCTGAG	GTCACGTGCG
851	TGGTGGTGGA	CGTGAGCCAC	GAAGACCCCG	AGGTCCAGTT	CAACTGGTAC
901	GTGGACGGCG	TGGAGGTGCA	TAATGCCAAG	ACAAAGCCAC	GGGAGGAGCA
951	GTTCAACAGC	ACGTTCCGTG	TGGTCAGCGT	CCTCACCGTT	GTGCACCAGG
1001	ACTGGCTGAA	CGGCAAGGAG	TACAAGTGCA	AGGTCTCCAA	CAAAGGCCTC
1051	CCAGCCCCCA	TTGAGAAAAC	CATCTCCAAA	ACCAAAGGGC	AGCCCCGAGA
1101	ACCACAGGTG	TACACCCTGC	CCCCATCCCG	GGAGGAGATG	ACCAAGAACC
1151	AGGTCAGCCT	GACCTGCCTG	GTCAAAGGCT	TCTACCCAGC	CGACATCGCC
1201	GTGGAGTGGG	AGAGCAATGG	GCAGCCGGAG	AACAACCTACA	AGACCACACC
1251	TCCCATGCTG	GACTCCGACG	GCTCCTTCTT	CCTCTACAGC	AAGCTCACCG
1301	TGGACAAGAG	CAGGTGGCAG	CAGGGGAACG	TCTTCTCATG	CTCCGTGATG
1351	CATGAGGCTC	TGCACAACCA	CTACACGCAG	AAGAGCCTCT	CCCTGTCTCC
1402	GGGTAAATGA				

SEQ ID NO. 42
Secuencia proteica de la cadena pesada pronosticada de 7.26.4

1	mdwtwsilfl	vaaatgahsQ	VQLVQSGAEV	KKPGASVKVS	CEASGYTFTS
51	YGIDWVRQAP	GQGLEWMGWI	SVYSGNTNYA	QKLQGRVTMS	TDTSTSTAYM
101	ELRSLRSDDT	AVYYCAREGS	SSSGDYYYGM	DVWQGTTVT	VSSASTKGPS
151	VFPLAPCSRS	TSESTAALGC	LVKDYPPEPV	TVSWNSGALT	SGVHTFPAVL
201	QSSGLYSLSS	VVTVPSSNFG	TQTYTCNVDH	KPSNTKVDKT	VERKCCVECP
251	PCPAPPVAGP	SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE	VTCVVVDVSH	EDPEVQFNWY
301	VDGVEVHNAK	TKPREEQFNS	TFRVVSVLTV	VHQDWLNGKE	YKCKVSNKGL
351	PAPIEKTISK	TKGQPREPQV	YTLPPSREEM	TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA
401	VEWESNGQPE	NNYKTTPPML	DSDGSFFLYS	KLTVDKSRWQ	QGNVFSCSVM
451	HEALHNHYTQ	KSLSLSPGK			

143
145
154

SEQ ID NO. 43
Secuencia nucleotídica de la cadena liviana kappa de 7.26.4

1	<u>atgaggctcc</u>	<u>ctgctcagct</u>	<u>cctggggctg</u>	<u>ctaattgctct</u>	<u>ggataacctgg</u>
51	<u>atccagtgcg</u>	<u>GATATTGTGA</u>	<u>TGACCCAGAC</u>	<u>TCCACTCTCT</u>	<u>CTGTCCGTCA</u>
101	<u>CCCCTGGACA</u>	<u>GCCGGCCTCC</u>	<u>ATCTCCTGCA</u>	<u>AGTCTAATCA</u>	<u>GAGCCTCCTG</u>
151	<u>TATAGTGATG</u>	<u>GAAAGACCTA</u>	<u>TTTGTTTTGG</u>	<u>TACCTGCAGA</u>	<u>AGCCAGGCCA</u>
201	<u>GCCTCCACAG</u>	<u>CTCCTGATCT</u>	<u>ATGAAGTTTC</u>	<u>CAACCGATTTC</u>	<u>TCTGGAGTGC</u>
251	<u>CAGATAGGTT</u>	<u>CAGTGGCAGC</u>	<u>GGGTCAGGGA</u>	<u>CAGATTTTAC</u>	<u>ACTGAAAATC</u>
301	<u>AGCCGGGTGG</u>	<u>AGGCTGAGGA</u>	<u>TGTTGGGGTT</u>	<u>TATTACTGCA</u>	<u>TGCAAAGTAT</u>
351	<u>ACAGCTTCCG</u>	<u>TGGACGTTTC</u>	<u>GCCAAGGGAC</u>	<u>CAAGGTGGAA</u>	<u>ATCAAACGAA</u>
401	<u>CTGTGGCTGC</u>	<u>ACCATCTGTC</u>	<u>TTCATCTTCC</u>	<u>CGCCATCTGA</u>	<u>TGAGCAGTTG</u>
451	<u>AAATCTGGAA</u>	<u>CTGCCTCTGT</u>	<u>TGTGTGCCTG</u>	<u>CTGAATAACT</u>	<u>TCTATCCCAG</u>
501	<u>AGAGGCCAAA</u>	<u>GTACAGTGGA</u>	<u>AGGTGGATAA</u>	<u>CGCCCTCCAA</u>	<u>TCGGGTAACT</u>
551	<u>CCCAGGAGAG</u>	<u>TGTCACAGAG</u>	<u>CAGGACAGCA</u>	<u>AGGACAGCAC</u>	<u>CTACAGCCTC</u>
601	<u>AGCAGCACCC</u>	<u>TGACGCTGAG</u>	<u>CAAAGCAGAC</u>	<u>TACGAGAAAC</u>	<u>ACAAAGTCTA</u>
651	<u>CGCCTGCGAA</u>	<u>GTCACCCATC</u>	<u>AGGGCCTGAG</u>	<u>CTCGCCCGTC</u>	<u>ACAAAGAGCT</u>
701	<u>TCAACAGGGG</u>	<u>AGAGTGTTAG</u>	<u>TGA</u>		

SEQ ID NO. 44
Secuencia proteica de la cadena liviana kappa pronosticada de 7.26.4

1	<u>mrlpaqllgl</u>	<u>lmlwipgssa</u>	<u>DIVMTQTPLS</u>	<u>LSVTPGQPAS</u>	<u>ISCKSNQSL</u>
51	<u>YSDGKTYLFW</u>	<u>YLQKPGQPPQ</u>	<u>LLIYEVS</u>	<u>NRFS</u>	<u>SGS</u>
101	<u>SRVEAEDVG</u>	<u>VYYCMQSIQLP</u>	<u>WTFGQGTKVE</u>	<u>IKRTVAAPSV</u>	<u>FIFPPSDEQL</u>
151	<u>KSGTASVVCL</u>	<u>LNNFY</u>	<u>PREAKVQWKVDNALQ</u>	<u>SGNSQESVTE</u>	<u>QDSKDSTYSL</u>
201	<u>SSTLTLSKAD</u>	<u>YEKHKVYACE</u>	<u>VTHQGLSSPV</u>	<u>TKSFNRGEC</u>	

SEQ ID NO. 45
Secuencia nucleotídica de la cadena pesada de 9.8.2

1	atggagtttg	ggctgagctg	ggtttttcctc	gttgctctttt	taagaggtgt
51	ccagtgtCAG	GTGCAGCTGG	TGGAGTCTGG	GGGAGGCGTG	GTCCAGCCTG
101	GGAGGTCCCT	GAGACTCTCC	TGTGCAGCGT	CTGGATTAC	CTTCAGTAGC
151	TATGGCATGC	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA	GGCAAGGGGC	TGGAGTGGGT
201	GGCAGTTATA	TGGTATGATG	GAAGTAATGA	ATACTATGCA	GACTCCGTGA
251	AGGGCCGATT	CACCATCTCC	AGAGACAATT	CCAAGAACAC	GCTGTATCTG
301	CAAATGAACA	GCCTGAGAGC	CGAGGACACG	GCTGTGTATT	ACTGTGCGAG
351	GGGGGCGTAC	CACTTTGCCT	ACTGGGGCCA	GGGAACCCTG	GTCACCGTCT
401	CCTCAGCTTC	CACCAAGGGC	CCATCCGTCT	TCCCCCTGGC	GCCCTGCTCC
451	AGGAGCACCT	CCGAGAGCAC	AGCCGCCCTG	GGCTGCCTGG	TCAAGGACTA
501	CTTCCCCGAA	CCGGTGACGG	TGTCGTGGAA	CTCAGGCGCC	CTGACCAGCG
551	GCGTGACAC	CTTCCCGGCT	GTCCTACAGT	CCTCAGGACT	CTACTCCCTC
601	AGCAGCGTGG	TGACCGTGCC	CTCCAGCAGC	TTGGGCACGA	AGACCTACAC
651	CTGCAACGTA	GATCACAAGC	CCAGCAACAC	CAAGGTGGAC	AAGAGAGTTG
701	AGTCCAAATA	TGGTCCCCCA	TGCCCATCAT	GCCCAGCACC	TGAGTTCCTG
751	GGGGGACCAT	CAGTCTTCCT	GTTCCCCCCA	AAACCCAAGG	ACACTCTCAT
801	GATCTCCCGG	ACCCCTGAGG	TCACGTGCGT	GGTGGTGGAC	GTGAGCCAGG
851	AAGACCCCGA	GGTCCAGTTC	AACTGGTACG	TGGATGGCGT	GGAGGTGCAT
901	AATGCCAAGA	CAAAGCCGCG	GGAGGAGCAG	TTCAACAGCA	CGTACCGTGT
951	GGTCAGCGTC	CTCACCCTCC	TGCACCAGGA	CTGGCTGAAC	GGCAAGGAGT
1001	ACAAGTGCAA	GGTCTCCAAC	AAAGGCCTCC	CGTCCTCCAT	CGAGAAAACC
1051	ATCTCCAAAG	CCAAAGGGCA	GCCCCGAGAG	CCACAGGTGT	ACACCCTGCC
1101	CCCATCCCAG	GAGGAGATGA	CCAAGAACCA	GGTCAGCCTG	ACCTGCCTGG
1151	TCAAAGGCTT	CTACCCCAGC	GACATCGCCG	TGGAGTGGGA	GAGCAATGGG
1201	CAGCCGGAGA	ACAACACAA	GACCACGCCT	CCCGTGCTGG	ACTCCGACGG
1251	CTCCTTCTTC	CTCTACAGCA	GGCTAACCGT	GGACAAGAGC	AGGTGGCAGG
1301	AGGGGAATGT	CTTCTCATGC	TCCGTGATGC	ATGAGGCTCT	GCACAACCAC
1351	TACACACAGA	AGAGCCTCTC	CCTGTCTCTG	GGTAAATGA	

SEQ ID NO. 46
Secuencia proteica de la cadena pesada pronosticada de 9.8.2

1	mefglswvfl	vallrgvqcQ	VQLVESGGGV	VQPGRLRLS	CAASGFTFSS
51	YGMHWVRQAP	GKGLEWVAVI	WYDGSNEYA	DSVKGRFTIS	RDNSKNTLYL
101	QMNSLRAEDT	AVYYCARGAY	HFAYWGQGL	VTVSSASTKG	PSVFPLAPCS
151	RSTSESTAAL	GCLVKDYFPE	PVTVSWNSGA	LTSGVHTFPA	VLQSSGLYSL
201	SSVVTVPSSS	LGTKTYTCNV	DHKPSNTKVD	KRVESKYGPP	CPSCPAPEFL
251	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSQEDPEVQF	NWYVDGVEVH
301	NAKTKPREEQ	FNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KGLPSSIEKT
351	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSQ	EEMTKNQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG
401	QPENNYKTP	PVLDSGDSFF	LYSRLTVDKS	RWQEGNVFSC	SVMHEALHNNH
451	YTQKSLSLSL	GK			

245
147
156

SEQ ID NO. 47

Secuencia nucleotídica de la cadena liviana kappa de 9.8.2

```

1   atggacatga gggtcacctgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct
51  ctcagtcgca ggtgccagat gtGACATCCA GATGACCCAG TCTCCATCCT
101 CCCTGTCTGC ATCTGTAGGA GACAGAGTCA CCATCACTTG CCAGGCGAGT
151 CAGGACATTA GCAACTATTT AAATTGGTAT CAGCAGAAAC CAGGGAAAGC
201 CCCTAAGCTC CTGATCTACG ATGCATCCAA TTTGGAAACA GGGGTCCCAT
251 CAAGGTTTCA TGGAAGTGGA TCTGGGACAG ATTTTACTTT CACCATCAGC
301 AGCCTGCAGC CTGAAGATAT TGCAACATAT TCCTGTCAAC ACTCTGATAA
351 TCTCTCGATC ACCTTCGGCC AGGGGACACG ACTGGAGATT AAACGAACTG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAAGTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ACCCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAACTCCT
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCTTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAGTGA
```

SEQ ID NO. 48

Secuencia proteica de la cadena liviana kappa pronosticada de 9.8.2

```

1   mdmrvpaql l gllllwlsva garcDIQMTQ SPSSLASAVG DRVTITCQAS
51  QDISNYLNWY QQKPGKAPKL LIYDASNLET GVPSRFSGSG SGTDFTFITIS
101 SLQPEDIATY SCQHSNLSI TFGQGRLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
151 SGTASVVCLL NNFYPREKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL
201 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
```

SEQ ID NO. 49
Secuencia nucleotídica del dominio que liga $\alpha_4\beta_7$ a MAdCAM de cynomolgus

1	ATGGATCGGG	GCCTGGCCCT	CCTGCTGGCG	GGGCTTCTGG	GGCTCCTCCA
51	GCCGGGCTGC	GGCCAGTCCC	TCCAGGTGAA	GCCCCTGCAG	GTGGAGCCCC
101	CGGAGCCGGT	GGTGGCCGTG	GCCCTGGGCG	CCTCTCGCCA	GCTCACCTGC
151	CGCCTGGACT	GCGCGGACGG	CGGGGCCACG	GTGCAGTGGC	GGGGCCTGGA
201	CACCAGCCTG	GGCGCGGTGC	AGTCGGACGC	GGGCCGCAGC	GTCCTCACCG
251	TGCGCAACGC	CTCGCTGTCG	GCGGCCGGGA	CCCGTGTGTG	CGTGGGCTCC
301	TGCGGGGGCC	GCACCTTCCA	GCACACCGTG	CGGCTCCTTG	TGTACGCCTT
351	CCCGGACCAG	CTGACCATCT	CCCCGGCAGC	CCTGGTGCCT	GGTGACCCGG
401	AGGTGGCCTG	TACGGCTCAC	AAAGTCACGC	CTGTGGACCC	CAATGCGCTC
451	TCCTTCTCCC	TGCTCCTGGG	GGACCAGGAA	CTGGAGGGGG	CCCAGGCTCT
501	GGGCCCCGAG	GTGGAGGAGG	AGGAGGAGCC	CCAGGAGGAG	GAGGACGTGC
551	TGTTTCAGGT	GACAGAGCGC	TGGCGGCTGC	CGACCCTGGC	AACCCCTGTC
601	CTGCCCCGCG	TCTACTGCCA	GGCCACGATG	AGGCTGCCTG	GCTTGGAGCT
651	CAGCCACCGC	CAGGCCATCC	CGGTCCTGCA	C	

SEQ ID NO. 50
Secuencia de aminoácidos del dominio que liga $\alpha_4\beta_7$ a MAdCAM de cynomolgus

1	MDRGLALLLA	GLLGLLQPGC	GQSLQVKPLQ	VEPPEPVVAV	ALGASRQLTC
51	RLDCADGGAT	VQWRGLDTSL	GAVQSDAGRS	VLTVRNASLS	AAGTRVCVGS
101	CGGRTFQHTV	RLLVYAFPDQ	LTISPAALVP	GDPEVACTAH	KVTPVDPNAL
151	SFSLLLGDQE	LEGAQALGPE	VEEEEEEPQEE	EDVLFVRVTER	WRLPTLATPV
201	LPALYCQATM	RLPGLELSHR	QAIPVLH		

SEQ ID NO. 51
Secuencia nucleotídica de la cadena pesada de 6.22.2 modificado

```
1  atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt
51  ccagtgtCAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG
101 GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCGT CTGGATTAC CTTCAGTAGC
151 GATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 GGCAATTATA TGGTATGATG GAAGTAATAA ATATTATGCA GACTCCGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTATATT ACTGTGCGAG
351 AGATCCCGGC TACTATTACG GTATGGACGT CTGGGGCCAA GGGACCACGG
401 TCACCGTCTC CTCAGCTTCC ACCAAGGGCC CATCCGTCTT CCCCCTGGCG
451 CCCTGCTCTA GAAGCACCTC CGAGAGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT
501 CAAGGACTAC TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCTC
551 TGACCAGCGG CGTGCACACC TTCCCAGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC
601 TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGCCC TCCAGCAACT TCGGCACCCA
651 GACCTACACC TGCAACGTAG ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA
701 AGACAGTTGA GCGCAAATGT TGTGTCGAGT GCCCACCGTG CCCAGCACCA
751 CCTGTGGCAG GACCGTCAGT CTTCTCTTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC
801 CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC GTGCGTGGTG GTGGACGTGA
851 GCCACGAAGA CCCCAGGTC CAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG
901 GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCACGGGAG GAGCAGTTCA ACAGCACGTT
951 CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTTGTGCA CCAGGACTGG CTGAACGGCA
1001 AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG GCCTCCCAGC CCCCATCGAG
1051 AAAACCATCT CAAAACCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC
1101 CCTGCCCCCA TCCCGGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT
1151 GCCTGGTCAA AGGCTTCTAC CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC
1201 AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACACCTCCCA TGCTGGACTC
1251 CGACGGCTCC TTCTTCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT
1301 GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC
1351 AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AATGATAG
```

SEQ ID NO. 52
Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 6.22.2

```
1  mefglswvfl vallrgvgcQ VQLVESGGGV VQGRSLRLS CAASGFTFSS
51  DGMHWVRQAP GKGLEWVAII WYDGSNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCARDPG YYYGMDVWGQ GTTVTVSSAS TKGPSVFPLA
151 PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL
201 YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVKRC CVECPCPAP
251 PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE
301 VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE
351 KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
401 NGQPENNYKT TPPMLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH
451 NHYTQKSLSL SPGK
```

SEQ ID NO. 53
Secuencia nucleotídica de la cadena liviana kappa de 6.22.2 modificado

```
1   atgttgccat cacaactcat tgggttttctg ctgctctggg ttccagcttc
51  caggggtGAA ATTGTGCTGA CTCAGTCTCC AGACTTTCAG TCTGTGACTC
101 CAAAAGAGAA AGTCACCATC ACCTGCCGGG CCAGTCAGAG AATTGGTAGT
151 AGCTTACACT GGTACCAGCA GAAACCAGAT CAGTCTCCAA AACTCCTCAT
201 CAAGTATGCT TCCCAGTCCT TCTCAGGGGT CCCCTCGAGG TTCAGTGGCA
251 GTGGATCTGG GACAGATTTC ACCCTCACCA TCAATAGCCT GGAAGCTGAA
301 GATGCTGCAA CTTATTACTG TCATCAGAGT GGTCGTTTAC CGCTCACTTT
351 CGGCGGAGGG ACCAAGGTGG AGATCAAACG AACTGTGGCT GCACCATCTG
401 TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG AACTGCCTCT
451 GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG
501 GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG AGTGTACACAG
551 AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG
601 AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA
651 TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG CTTCAACAGG GGAGAGTGTT
701 AGTGA
```

SEQ ID NO. 54
Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana kappa de 6.22.2 modificado

```
1   mlpsqligfl llwvpasrgE IVLTQSPDFQ SVTPKEKVTI TCRASQRIGS
51  SLHWYQQKPD QSPKLLIKYA SQSFSGVPSR FSGSGSGTDF TLTINSLEAE
101 DAATYYCHQS GRLPLTFGGG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS
151 VVCLLNNFYF REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL
201 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC
```

149
181
160

SEQ ID NO. 55
Secuencia nucleotídica de la cadena pesada de 6.34.2 modificado

1	<u>atggagtttg</u>	<u>ggctgagctg</u>	<u>ggttttcctc</u>	<u>gttgctcttt</u>	<u>taagaggtgt</u>
51	<u>ccagtgtCAG</u>	<u>GTGCAGCTGG</u>	<u>TGGAGTCTGG</u>	<u>GGGAGGCGTG</u>	<u>GTCCAGCCTG</u>
101	<u>GGAGGTCCCT</u>	<u>GAGACTCTCC</u>	<u>TGTGCAGCCT</u>	<u>CTGGATTAC</u>	<u>CTTCAGTAGC</u>
151	<u>TATGGCATGC</u>	<u>ACTGGGTCCG</u>	<u>CCAGGCTCCA</u>	<u>GGCAAGGGGC</u>	<u>TGGAGTGGGT</u>
201	<u>GGCAGTTATA</u>	<u>TCAAATGATG</u>	<u>GAAATAATAA</u>	<u>ATACTATGCA</u>	<u>GACTCCGTGA</u>
251	<u>AGGGCCGATT</u>	<u>CACCATCTCC</u>	<u>AGAGACAATT</u>	<u>CCAAAAACAC</u>	<u>GCTGTATCTG</u>
301	<u>CAAATGAACA</u>	<u>GCCTGCGCGC</u>	<u>TGAGGACACG</u>	<u>GCTGTGTATT</u>	<u>ACTGTGCGAG</u>
351	<u>AGATAGTACG</u>	<u>GCGATAACCT</u>	<u>ACTACTACTA</u>	<u>CGGAATGGAC</u>	<u>GTCTGGGGCC</u>
401	<u>AAGGGACCAC</u>	<u>GGTCACCGTC</u>	<u>TCCTCAGCTT</u>	<u>CCACCAAGGG</u>	<u>CCCATCCGTC</u>
451	<u>TTCCCCCTGG</u>	<u>CGCCCTGCTC</u>	<u>TAGAAGCACC</u>	<u>TCCGAGAGCA</u>	<u>CAGCGGCCCT</u>
501	<u>GGGCTGCCTG</u>	<u>GTCAAGGACT</u>	<u>ACTTCCCCGA</u>	<u>ACCGGTGACG</u>	<u>GTGTCGTGGA</u>
551	<u>ACTCAGGCGC</u>	<u>TCTGACCAGC</u>	<u>GGCGTGCA</u>	<u>CCTTCCCAGC</u>	<u>TGTCCTACAG</u>
601	<u>TCCTCAGGAC</u>	<u>TCTACTCCCT</u>	<u>CAGCAGCGTG</u>	<u>GTGACCGTGC</u>	<u>CCTCCAGCAA</u>
651	<u>CTTCGGCACC</u>	<u>CAGACCTACA</u>	<u>CCTGCAACGT</u>	<u>AGATCACAAG</u>	<u>CCCAGCAACA</u>
701	<u>CCAAGGTGGA</u>	<u>CAAGACAGTT</u>	<u>GAGCGCAAAT</u>	<u>GTTGTGTCGA</u>	<u>GTGCCCACCG</u>
751	<u>TGCCCAGCAC</u>	<u>CACCTGTGGC</u>	<u>AGGACCGTCA</u>	<u>GTCTTCCTCT</u>	<u>TCCCCCAAA</u>
801	<u>ACCCAAGGAC</u>	<u>ACCCTCATGA</u>	<u>TCTCCCGGAC</u>	<u>CCCTGAGGTC</u>	<u>ACGTGCGTGG</u>
851	<u>TGGTGGACGT</u>	<u>GAGCCACGAA</u>	<u>GACCCCGAGG</u>	<u>TCCAGTTCAA</u>	<u>CTGGTACGTG</u>
901	<u>GACGGCGTGG</u>	<u>AGGTGCATAA</u>	<u>TGCCAAGACA</u>	<u>AAGCCACGGG</u>	<u>AGGAGCAGTT</u>
951	<u>CAACAGCACG</u>	<u>TTCCGTGTGG</u>	<u>TCAGCGTCCT</u>	<u>CACCGTTGTG</u>	<u>CACCAGGACT</u>
1001	<u>GGCTGAACGG</u>	<u>CAAGGAGTAC</u>	<u>AAGTGCAAGG</u>	<u>TCTCCAACAA</u>	<u>AGGCCTCCCA</u>
1051	<u>GCCCCCATCG</u>	<u>AGAAAACCAT</u>	<u>CTCCAAAACC</u>	<u>AAAGGGCAGC</u>	<u>CCCGAGAACC</u>
1101	<u>ACAGGTGTAC</u>	<u>ACCCTGCCCC</u>	<u>CATCCCGGGA</u>	<u>GGAGATGACC</u>	<u>AAGAACCAGG</u>
1151	<u>TCAGCCTGAC</u>	<u>CTGCCTGGTC</u>	<u>AAAGGCTTCT</u>	<u>ACCCCAGCGA</u>	<u>CATCGCCGTG</u>
1201	<u>GAGTGGGAGA</u>	<u>GCAATGGGCA</u>	<u>GCCGGAGAAC</u>	<u>AACTACAAGA</u>	<u>CCACACCTCC</u>
1251	<u>CATGCTGGAC</u>	<u>TCCGACGGCT</u>	<u>CCTTCTTCCT</u>	<u>CTACAGCAAG</u>	<u>CTCACCGTGG</u>
1301	<u>ACAAGAGCAG</u>	<u>GTGGCAGCAG</u>	<u>GGGAACGTCT</u>	<u>TCTCATGCTC</u>	<u>CGTGATGCAT</u>
1351	<u>GAGGCTCTGC</u>	<u>ACAACCACTA</u>	<u>CACGCAGAAG</u>	<u>AGCCTCTCCC</u>	<u>TGTCTCCGGG</u>
1401	<u>TAAATGATAG</u>				

SEQ ID NO. 56
Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 6.34.2 modificado

1	<u>mefglswvfl</u>	<u>vallrgvqcQ</u>	<u>VQLVESGGGV</u>	<u>VQPGSLRLS</u>	<u>CAASGFTFSS</u>
51	<u>YGMHWVRQAP</u>	<u>GKGLEWVAVI</u>	<u>SNDGNNKYIA</u>	<u>DSVKGRFTIS</u>	<u>RDNSKNTLYL</u>
101	<u>QMNSLRAEDT</u>	<u>AVYYCARDST</u>	<u>AITYYYYGMD</u>	<u>VWGQGTTVTV</u>	<u>SSASTKGPSV</u>
151	<u>FPLAPCSRST</u>	<u>SESTAALGCL</u>	<u>VKDYPPEPVT</u>	<u>VSWNSGALTS</u>	<u>GVHTFPAVLQ</u>
201	<u>SSGLYSLSSV</u>	<u>VTVPSSNFGT</u>	<u>QTYTCNVDHK</u>	<u>PSNTKVDKTV</u>	<u>ERKCCVECPP</u>
251	<u>CPAPPVAGPS</u>	<u>VFLFPPKPKD</u>	<u>TLMISRTPEV</u>	<u>TCVVVDVSHE</u>	<u>DPEVQFNWYV</u>
301	<u>DGVEVHNAKT</u>	<u>KPREEQFNST</u>	<u>FRVSVLTVV</u>	<u>HQDWLNGKEY</u>	<u>KCKVSNKGLP</u>
351	<u>APIEKTISK</u>	<u>KGQPREPQVY</u>	<u>TLPPSREEMT</u>	<u>KNQVSLTCLV</u>	<u>KGFYPSDIAV</u>
401	<u>EWESNGQPEN</u>	<u>NYKTTTPMLD</u>	<u>SDGSFFLYSK</u>	<u>LTVDKSRWQQ</u>	<u>GNVFSCSVMH</u>
451	<u>EALHNHYTQK</u>	<u>SLSLSPGK</u>			

150
182
161

SEQ ID NO. 57
Secuencia nucleotídica de la cadena liviana kappa de 6.34.2 modificado

```
1   atggacatga gggteccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctgget
51  ccgaggtgcc agatgtGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT
101 CTGCATCTGT CGGAGACAGA GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCAGAGT
151 ATTAGTAGCT ATTTAAATTG GTATCAGCAG AAACCAGGGA AAGCCCCTAA
201 GCTCCTGATC TATGCTGCAT CCGGTTTGAA GCGTGGGGTC CCATCACGGT
251 TCAGTGGTAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTACCAT CAGTTCTCTG
301 CAACCTGAGG ATTTTGCAAC TTACTACTGT CACCAGAGTT ACAGTCTCCC
351 ATTCACTTTC GGCCCTGGGA CCAAAGTGGA TATCAAACGA ACTGTGGCTG
401 CACCATCTGT CTTCATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
451 ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
551 GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
601 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
701 GAGAGTGTTA GTGA
```

SEQ ID NO. 58
Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana kappa de 6.34.2 modificado

```
1   mdmrvpaql l gllllwlrga rcDIQMTQSP SSLSASVGDR VTITCRASQS
51  ISSYLNWYQQ KPGKAPKLLI YAASGLKRGV PSRFSGSGSG TDFTLTISSL
101 QPEDFATYYC HQSYSLPFTF GPGTKVDIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
151 TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSLST
201 LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
```

181
183
162

SEQ ID NO. 59
Secuencia nucleotídica de la cadena pesada de 6.67.1 modificado

1	<u>atgaaacacc</u>	<u>tgtggttctt</u>	<u>cctcctgctg</u>	<u>gtggcagctc</u>	<u>ccagatgggt</u>
51	<u>cctgtccCAG</u>	<u>GTGCAGCTGC</u>	<u>AGGAGTCGGG</u>	<u>CCCAGGACTG</u>	<u>GTGAAGCCTT</u>
101	<u>CGGAGACCCT</u>	<u>GTCCCTCACC</u>	<u>TGCACTGTCT</u>	<u>CTGGTGA CTC</u>	<u>CATCAGTAGT</u>
151	<u>AACTATTGGA</u>	<u>GCTGGATCCG</u>	<u>GCAGCCCGCC</u>	<u>GGGAAGGGAC</u>	<u>TGGAGTGGAT</u>
201	<u>TGGGCGTATC</u>	<u>TATACCA GTG</u>	<u>GGGGCACCAA</u>	<u>CTCCAACCCC</u>	<u>TCCCTCAGGG</u>
251	<u>GTCGAGTCAC</u>	<u>CATGTCAGTA</u>	<u>GACACGTCCA</u>	<u>AGAACCAGTT</u>	<u>CTCTCTGAAA</u>
301	<u>CTGAGTTCTG</u>	<u>TGACCGCCGC</u>	<u>GGACACGGCC</u>	<u>GTGTATTACT</u>	<u>GTGCGAGAGA</u>
351	<u>TCGTATTACT</u>	<u>ATAATTGCGG</u>	<u>GACTTATTCC</u>	<u>ATCCTTCTTT</u>	<u>GACTACTGGG</u>
401	<u>GCCAGGGAAC</u>	<u>CCTGGTCACC</u>	<u>GTCTCCTCAG</u>	<u>CTTCCACCAA</u>	<u>GGGCCCATCC</u>
451	<u>GTCTTCCCCC</u>	<u>TGGCGCCCTG</u>	<u>CTCTAGAAGC</u>	<u>ACCTCCGAGA</u>	<u>GCACAGCGGC</u>
501	<u>CCTGGGCTGC</u>	<u>CTGGTCAAGG</u>	<u>ACTACTTCCC</u>	<u>CGAACCGGTG</u>	<u>ACGGTGTCTG</u>
551	<u>GGAACTCAGG</u>	<u>CGCTCTGACC</u>	<u>AGCGGCGTGC</u>	<u>ACACCTTCCC</u>	<u>AGCTGTCCTA</u>
601	<u>CAGTCCTCAG</u>	<u>GACTCTACTC</u>	<u>CCTCAGCAGC</u>	<u>GTGGTGACCG</u>	<u>TGCCCTCCAG</u>
651	<u>CAACTTCGGC</u>	<u>ACCCAGACCT</u>	<u>ACACCTGCAA</u>	<u>CGTAGATCAC</u>	<u>AAGCCCAGCA</u>
701	<u>ACACCAAGGT</u>	<u>GGACAAGACA</u>	<u>GTTGAGCGCA</u>	<u>AATGTTGTGT</u>	<u>CGAGTGCCCA</u>
751	<u>CCGTGCCCAG</u>	<u>CACCACCTGT</u>	<u>GGCAGGACCG</u>	<u>TCAGTCTTCC</u>	<u>TCTTCCCCCC</u>
801	<u>AAAACCCAAG</u>	<u>GACACCCTCA</u>	<u>TGATCTCCCG</u>	<u>GACCCCTGAG</u>	<u>GTCACGTGCG</u>
851	<u>TGGTGGTGGA</u>	<u>CGTGAGCCAC</u>	<u>GAAGACCCCG</u>	<u>AGGTCCAGTT</u>	<u>CAACTGGTAC</u>
901	<u>GTGGACGGCG</u>	<u>TGGAGGTGCA</u>	<u>TAATGCCAAG</u>	<u>ACAAAGCCAC</u>	<u>GGGAGGAGCA</u>
951	<u>GTTCAACAGC</u>	<u>ACGTTCCGTG</u>	<u>TGGTCAGCGT</u>	<u>CCTCACCGTT</u>	<u>GTGCACCAGG</u>
1001	<u>ACTGGCTGAA</u>	<u>CGGCAAGGAG</u>	<u>TACAAGTGCA</u>	<u>AGGTCTCCAA</u>	<u>CAAAGGCCTC</u>
1051	<u>CCAGCCCCCA</u>	<u>TCGAGAAAAC</u>	<u>CATCTCCAAA</u>	<u>ACCAAAGGGC</u>	<u>AGCCCCGAGA</u>
1101	<u>ACCACAGGTG</u>	<u>TACACCCTGC</u>	<u>CCCCATCCCC</u>	<u>GGAGGAGATG</u>	<u>ACCAAGAACC</u>
1151	<u>AGGTCAGCCT</u>	<u>GACCTGCCTG</u>	<u>GTCAAAGGCT</u>	<u>TCTACCCAG</u>	<u>CGACATCGCC</u>
1201	<u>GTGGAGTGGG</u>	<u>AGAGCAATGG</u>	<u>GCAGCCGGAG</u>	<u>AACA ACTACA</u>	<u>AGACCACACC</u>
1251	<u>TCCCATGCTG</u>	<u>GACTCCGACG</u>	<u>GCTCCTTCTT</u>	<u>CCTCTACAGC</u>	<u>AAGCTCACCG</u>
1301	<u>TGGACAAGAG</u>	<u>CAGGTGGCAG</u>	<u>CAGGGGAACG</u>	<u>TCTTCTCATG</u>	<u>CTCCGTGATG</u>
1351	<u>CATGAGGCTC</u>	<u>TGCACAACCA</u>	<u>CTACACGCAG</u>	<u>AAGAGCCTCT</u>	<u>CCCTGTCTCC</u>
1401	<u>GGGTAAATGA</u>	<u>TAG</u>			

SEQ ID NO. 60
Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 6.67.1 modificado

1	<u>mkhlwfflll</u>	<u>vaaprwlsQ</u>	<u>VQLQESGPGL</u>	<u>VKPSETLSLT</u>	<u>CTVSGDSISS</u>
51	<u>NYWSWIRQPA</u>	<u>GKGLEWIGRI</u>	<u>YTSGGTNSNP</u>	<u>SLRGRVTMSV</u>	<u>DTSKNQFSLK</u>
101	<u>LSSVTAADTA</u>	<u>VYYCARDRIT</u>	<u>IIRGLIPSFF</u>	<u>DYWGQGLVT</u>	<u>VSSASTKGPS</u>
151	<u>VFPLAPCSRS</u>	<u>TSESTAALGC</u>	<u>LVKD YFPEPV</u>	<u>TVSWNSGALT</u>	<u>SGVHTFPAVL</u>
201	<u>QSSGLYSLSS</u>	<u>VVTVPSSNFG</u>	<u>TQTYTCNV DH</u>	<u>KPSNTKVDKT</u>	<u>VERKCCVECP</u>
251	<u>PCPAPPVAGP</u>	<u>SVFLFPPKPK</u>	<u>DTLMISRTPE</u>	<u>VTCVVVDVSH</u>	<u>EDPEVQFNWY</u>
301	<u>VDGVEVHNAK</u>	<u>TKPREEQFNS</u>	<u>TFRVSVSLTV</u>	<u>VHQDWLNGKE</u>	<u>YKCKVSNKGL</u>
351	<u>PAPIEKTISK</u>	<u>TKGQPREPQV</u>	<u>YTLPPSREEM</u>	<u>TKNQVSLTCL</u>	<u>VKGFYPSDIA</u>
401	<u>VEWESNGQPE</u>	<u>NNYKTT P PML</u>	<u>DSDGSFFLYS</u>	<u>KLTVDKSRWQ</u>	<u>QGNVFSCSVM</u>
451	<u>HEALHNHYTQ</u>	<u>KSLSLSPGK</u>			

SEQ ID NO. 61

Secuencia nucleotídica de la cadena liviana kappa de 6.67.1 modificado

```
1   atggtgttgc agaccaggt cttcatttct ctgttgctct ggatctctgg
51  tgcctacggg GACATCGTGA TGACCCAGTC TCCAGACTCC CTGGCTGTGT
101 CTCTGGGCGA GAGGGCCACC ATCAACTGCA AGTCCAGCCA GAGTGTTTTA
151 TACAGCTCCA ACAATAAGAA CTACTTAGCT TGGTACCAAC AGAAACCAGG
201 ACAGCCTCCT AAATTGCTCA TTTACTGGGC ATCTATACGG GAATATGGGG
251 TCCCTGACCG ATTCAGTGGC AGCGGGTCTG GGACAGATTT CACTCTCACC
301 ATCAGCAGCC TGCAGGCTGA AGATGTGGCA GTTTATTTCT GTCAACAATA
351 TTATAGTATT CCTCCCCTCA CTTTCGGCGG AGGGACCAAG GTGGAGATCA
401 AACGAACTGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG
451 CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG TGCCTGCTGA ATAACTTCTA
501 TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAGGT GGATAACGCC CTCCAATCGG
551 GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC
601 AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA
651 AGTCTACGCC TCGGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA
701 AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGTGA
```

SEQ ID NO. 62

Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana kappa de 6.67.1 modificado

```
1   mvlqtqvfis lllwisgayg DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL
51  YSSNNKNYLA WYQQKPGQPP KLLIYWASIR EYGVPDRFSG SGSGTDFTLT
101 ISSLQAEDVA VFYFQQYYSI PPLTFGGGTK VEIKRTVAAP SVFIFPPSDE
151 QLKSGTASVV CLLNFFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV TEQDSKDSTY
201 SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PVTKSFNRGE C
```

183
155
164

SEQ ID NO. 63
Secuencia nucleotídica de la cadena pesada de 6.77.1 modificado

1 atggaactgg ggctccgctg ggttttcctt gttgctatatt tagaaggtgt
51 ccagtgtGAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCCTG GTCAAGCCTG
101 GGGGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTCAGTAGC
151 TATAGCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGGAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 CTCATCCATT AGTAGTAGTA GTAGTTACAT ATACTACGCA GACTCAGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAACG CCAAGAACTC ACTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG
351 AGATGGGTAT AGCAGTGGCT GGTCTACTA CTACTACTAC GGTATGGACG
401 TCTGGGGCCA AGGGACCACG GTCACCGTCT CCTCAGCTTC CACCAAGGGC
451 CCATCCGTCT TCCCCCTGGC GCCCTGCTCT AGAAGCACCT CCGAGAGCAC
501 AGCGGCCCTG GGCTGCCTGG TCAAGGACTA CTTCCCCGAA CCGGTGACGG
551 TGTCGTGGAA CTCAGGCGCT CTGACCAGCG GCGTGCACAC CTTCCCAGCT
601 GTCCTACAGT CCTCAGGACT CTACTCCCTC AGCAGCGTGG TGACCGTGCC
651 CTCCAGCAAC TTCGGCACCC AGACCTACAC CTGCAACGTA GATCACAAGC
701 CCAGCAACAC CAAGGTGGAC AAGACAGTTG AGCGCAAATG TTGTGTCGAG
751 TGCCCCACCGT GCCCAGCACC ACCTGTGGCA GGACCGTCAG TCTTCCTCTT
801 CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
851 CGTGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCCGAGGT CCAGTTCAAC
901 TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCACGGGA
951 GGAGCAGTTC AACAGCACGT TCCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTTGTGC
1001 ACCAGGACTG GCTGAACGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
1051 GGCCTCCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAACCA AAGGGCAGCC
1101 CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
1151 AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA CCCCAGCGAC
1201 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC
1251 CACACCTCCC ATGCTGGA CTGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAAGC
1301 TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC
1351 GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT
1401 GTCTCCGGGT AAATGATAG

SEQ ID NO. 64
Secuencia proteica de la cadena pesada de 6.77.1 modificado

1 melglrwvfl vailegvqcE VQLVESGGGL VKPGGSLRLS CAASGFTFSS
51 YSMNWVRQAP GKGLEWVSSI SSSSYIYYA DSVKGRFTIS RDNAKNSLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCARDGY SSGWSYYYYY GMDVWGQGT VTVSSASTKG
151 PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
201 VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQYTCNV DHKPSNTKVD KTVKCKCCVE
251 CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN
301 WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK
351 GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD
401 IAVEWESNGQ PENNYKTTTP MLDSGGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS
451 VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

SEQ ID NO. 65
Secuencia nucleotídica de la cadena liviana kappa de 6.77.1 modificado

1	atgaggctcc	ctgctcagct	cctggggctg	ctaagtctct	ggatacctgg
51	atccagtgca	GATATTGTGA	TGACCCAGAC	TCCACTCTCT	CTGTCCGTCA
101	CTCCTGGACA	GCCGGCCTCC	ATCTCCTGCA	AGTCTAGTCA	GAGCCTCCTG
151	CTTAGTGATG	GAAAGACCTA	TTTGAATTGG	TACCTGCAGA	AGCCCGGCCA
201	GCCTCCACAG	CTCCTGATCT	ATGAAGTTTC	CAACCGGTTT	TCTGGAGTGC
251	CAGACAGGTT	CAGTGGCAGC	GGGTCAGGGA	CAGATTTTAC	ACTGAAAATC
301	AGCCGGGTGG	AGGCTGAGGA	TGTTGGGGTT	TATTACTGCA	TGCAAAGTAT
351	ACAGCTTATG	TGCAGTTTTG	GCCAGGGGAC	CAAGCTGGAG	ATCAAACGAA
401	CTGTGGCTGC	ACCATCTGTC	TTCATCTTCC	CGCCATCTGA	TGAGCAGTTG
451	AAATCTGGAA	CTGCCTCTGT	TGTGTGCCTG	CTGAATAACT	TCTATCCCAG
501	AGAGGCCAAA	GTACAGTGGA	AGGTGGATAA	CGCCCTCCAA	TCGGGTAACT
551	CCCAGGAGAG	TGTCACAGAG	CAGGACAGCA	AGGACAGCAC	CTACAGCCTC
601	AGCAGCACCC	TGACGCTGAG	CAAAGCAGAC	TACGAGAAAC	ACAAAGTCTA
651	CGCCTGCGAA	GTCACCCATC	AGGGCCTGAG	CTCGCCCCTG	ACAAAGAGCT
701	TCAACAGGGG	AGAGTGTTAG	TGA		

SEQ ID NO. 66
Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana kappa de 6.77.1 modificado

1	mrlpaqllgll	lmlwipgssa	DIVMTQTPLS	LSVTPGQPAS	ISCKSSQSLL
51	LSDGKTYLNL	YLQKPGQPPQ	LLIYEVSNRF	SGVPDRFSGS	SGGTDFTLKI
101	SRVEAEDVGV	YSCMQSIQLM	SSFGQGTKLE	IKRTVAAPSV	FIFPPSDEQL
151	KSGTASVVCL	LNNFYPREAK	VQWKVDNALQ	SGNSQESVTE	QDSKDSTYSL
201	SSTLTLSKAD	YEKHKVYACE	VTHQGLSSPV	TKSFNRGEC	

285
~~184~~
166

SEQ ID NO. 67
Secuencia nucleotídica de la cadena liviana kappa de 7.26.4 modificado

```
1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg
51  atccagtgcg GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CCCCTGGACA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA AGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 TATAGTGATG GAAAGACCTA TTTGTTTTTG TACCTGCAGA AGCCAGGCCA
201 GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGAAGTTTC CAACCGATTG TCTGGAGTGC
251 CAGATAGGTT CAGTGGCAGC GGGTCAGGGA CAGATTTTCA ACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTGTTGGGT TATTACTGCA TGCAAAGTAT
351 ACAGCTTCCG TGGACGTTTC GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAACGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG
451 AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT
551 CCCAGGAGAG TGTCACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA
651 CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCCTG ACAAAGAGCT
701 TCAACAGGGG AGAGTGTTAG TGA
```

SEQ ID NO. 68
Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana kappa de 7.26.4 modificado

```
1   mrlpaqlllgl lmlwipgssa DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL
51  YSDGKTYLFW YLQKPGQPPQ LLIYEVSNRG SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YYCMQSIQLP WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL
201 SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano o una porción que liga antígeno del mismo que se liga específicamente a la molécula de adhesión celular de adhesina mucosal (MAdCAM).

2. El anticuerpo monoclonal humano o la porción que liga antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo o porción posee al menos una de las propiedades siguientes:

- (a) se liga a células humanas;
- (b) tiene una selectividad para MAdCAM al menos 100 veces mayor que para VCAM o fibronectina;
- (c) se liga a MAdCAM humano con una K_d de 3×10^{-10} M o menor; o
- (d) inhibe la ligadura de células que expresan $\alpha_4\beta_7$ a MAdCAM humano.
- (e) inhibe el reclutamiento de linfocitos al tejido linfoide gastrointestinal.

3. El anticuerpo monoclonal humano o la porción que liga antígeno de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho anticuerpo o porción liga MAdCAM humano con una K_d de 3×10^{-10} M o menor e inhibe la ligadura de $\alpha_4\beta_7$ a MAdCAM humano.

4. Una línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal humano de acuerdo con la reivindicación 1, donde el hibridoma se selecciona del grupo formado por 1.7.2 (No. de acceso ECACC 03090901), 1.8.2 (No. de acceso ECACC 03090902), 6.14.2 (No. de acceso ECACC 03090903), 6.22.2 (No. de acceso ECACC 03090904), 6.34.2 (No. de acceso ECACC 03090905), 6.67.1 (No. de acceso ECACC 03090906), 6.73.2 (No. de acceso ECACC 03090907), 6.77.1 (No. de acceso ECACC 03090908), 7.16.6 (No. de acceso ECACC 03090909), 7.20.5 (No. de acceso ECACC 03090910), 7.26.4 (No. de acceso ECACC 03090911), y 9.8.2 (No. de acceso ECACC 03090912).

5. El anticuerpo monoclonal humano producido por la línea celular de hibridoma de acuerdo con la reivindicación 4 o una porción que liga antígeno de dicho anticuerpo monoclonal.

6. El anticuerpo monoclonal humano de acuerdo con la reivindicación 5, donde la lisina C-terminal de la cadena pesada está separada.

7. El anticuerpo monoclonal humano o la porción que liga antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho anticuerpo o

porción que liga antígeno inhibe la ligadura de MAdCAM humano a $\alpha_4\beta_7$, y donde el anticuerpo o porción del mismo tiene al menos una de las propiedades siguientes:

- (a) compite en forma cruzada con un anticuerpo de referencia para ligarse a MAdCAM;
- (b) compite con un anticuerpo de referencia para ligarse a MAdCAM;
- (c) se liga al mismo epítipo de MAdCAM como un anticuerpo de referencia;
- (d) se liga a MAdCAM con substancialmente la misma K_d como el anticuerpo de referencia;
- (e) se liga a MAdCAM con substancialmente el mismo grado de disociación como el anticuerpo de referencia;

donde el anticuerpo de referencia se selecciona del grupo formado por: anticuerpo monoclonal 1.7.2, anticuerpo monoclonal 1.8.2, anticuerpo monoclonal 6.14.2, anticuerpo monoclonal 6.22.2, anticuerpo monoclonal 6.34.2, anticuerpo monoclonal 6.67.1, anticuerpo monoclonal 6.73.2, anticuerpo monoclonal 6.77.1, anticuerpo monoclonal 7.16.6, anticuerpo monoclonal 7.20.5, anticuerpo monoclonal 7.26.4, anticuerpo monoclonal 9.8.2, anticuerpo monoclonal 6.22.2-mod, anticuerpo monoclonal 6.34.2-mod, anticuerpo monoclonal 6.67.1-mod, anticuerpo monoclonal 6.77.1-mod y anticuerpo monoclonal 7.26.4-mod.

8. Un anticuerpo monoclonal que liga específicamente MAdCAM, donde el anticuerpo se selecciona del grupo formado por:

- (a) un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, sin las secuencias señal;
- (b) un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8, sin las secuencias señal;
- (c) un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12, sin las secuencias señal;
- (d) un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 16, sin las secuencias señal;
- (e) un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20, sin las secuencias señal;
- (f) un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 24, sin las secuencias señal;
- (g) un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 28, sin las secuencias señal;

- (h) un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 32, sin las secuencias señal;
- (i) un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 36, sin las secuencias señal;
- (j) un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 40, sin las secuencias señal;
- (k) un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 44, sin las secuencias señal;
- (l) un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 48, sin las secuencias señal;
- (m) un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 52 y SEQ ID NO: 54, sin las secuencias señal;
- (n) un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 58, sin las secuencias señal;
- (o) un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 62, sin las secuencias señal;
- (p) un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 64 y SEQ ID NO: 66, sin las secuencias señal; y
- (q) un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 68, sin las secuencias señal.

9. Un anticuerpo monoclonal o una porción que liga antígeno del mismo, donde la cadena pesada de dicho anticuerpo o la porción del mismo comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada o donde la cadena liviana comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana de un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo formado por: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod y 7.26.4-mod.

10. El anticuerpo monoclonal o una porción que liga antígeno de acuerdo con la reivindicación 9, donde dicho anticuerpo o porción comprende una cadena pesada que utiliza un gen VH 1-18 humano, un gen VH 3-15 humano, un gen VH 3-21 humano, un gen VH 3-23 humano, un gen VH 3-30 humano, un gen VH 3-33 humano o un gen VH 4-4 humano.

11. El anticuerpo monoclonal o una porción que liga antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicho anticuerpo o porción comprende una cadena liviana que utiliza un gen V_K A2 humano, un gen V_K A3 humano, un gen V_K A26 humano, un gen V_K B3 humano, un gen V_K O12 humano o un gen V_K O18 humano.

12. El anticuerpo monoclonal humano o porción que liga antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de la cadena pesada, la región variable de la cadena liviana o ambas tienen secuencias de aminoácidos al menos 90% idénticas a la región o las regiones correspondientes de un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo formado por: anticuerpo monoclonal 1.7.2, anticuerpo monoclonal 1.8.2, anticuerpo monoclonal 6.14.2, anticuerpo monoclonal 6.22.2, anticuerpo monoclonal 6.34.2, anticuerpo monoclonal 6.67.1, anticuerpo monoclonal 6.73.2, anticuerpo monoclonal 6.77.1, anticuerpo monoclonal 7.16.6, anticuerpo monoclonal 7.20.5, anticuerpo monoclonal 7.26.4, anticuerpo monoclonal 9.8.2, anticuerpo monoclonal 6.22.2-mod, anticuerpo monoclonal 6.34.2-mod, anticuerpo monoclonal 6.67.1-mod, anticuerpo monoclonal 6.77.1-mod y anticuerpo monoclonal 7.26.4-mod.

13. Un anticuerpo monoclonal o una porción que liga antígeno del mismo que liga específicamente MAdCAM, donde:

(a) la cadena pesada comprende las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo formado por: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod y 7.26.4-mod.

(b) la cadena liviana comprende las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena liviana de un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo formado por: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod y 7.26.4-mod.

(c) el anticuerpo comprende una cadena pesada de (a) y una cadena liviana de (b); y

(d) el anticuerpo de (c) donde las secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena pesada y cadena liviana se seleccionan del mismo anticuerpo de referencia.

14. El anticuerpo monoclonal o porción que liga antígeno de acuerdo con la reivindicación 13, donde la cadena pesada, la cadena liviana o ambas comprenden la secuencia de aminoácidos desde el comienzo de la CDR1 hasta el final de la CDR3 de

la cadena pesada, la cadena liviana o ambas, respectivamente, del anticuerpo de referencia.

15. El anticuerpo monoclonal o una porción que liga antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 13, donde dicho anticuerpo comprende:

(a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo formado por: 1.7.2 (SEQ ID NO: 2); 1.8.2 (SEQ ID NO: 6); 6.14.2 (SEQ ID NO: 10); 6.22.2 (SEQ ID NO: 14); 6.34.2 (SEQ ID NO: 18); 6.67.1 (SEQ ID NO: 22); 6.73.2 (SEQ ID NO: 26); 6.77.1 (SEQ ID NO: 30); 7.16.6 (SEQ ID NO: 34); 7.20.5 (SEQ ID NO: 38); 7.26.4 (SEQ ID NO: 42); y 9.8.2 (SEQ ID NO: 46); 6.22.2-mod (SEQ ID NO: 52); 6.34.2-mod (SEQ ID NO: 56); 6.67.1-mod (SEQ ID NO: 60); 6.77.1-mod (SEQ ID NO: 64); y 7.26.4-mod (SEQ ID NO: 42);

(b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de un anticuerpo seleccionado del grupo formado por: 1.7.2 (SEQ ID NO: 4); 1.8.2 (SEQ ID NO: 8); 6.14.2 (SEQ ID NO: 12); 6.22.2 (SEQ ID NO: 16); 6.34.2 (SEQ ID NO: 20); 6.67.1 (SEQ ID NO: 24); 6.73.2 (SEQ ID NO: 28); 6.77.1 (SEQ ID NO: 32); 7.16.6 (SEQ ID NO: 36); 7.20.5 (SEQ ID NO: 40); 7.26.4 (SEQ ID NO: 44); y 9.8.2 (SEQ ID NO: 48); 6.22.2-mod (SEQ ID NO: 54); 6.34.2-mod (SEQ ID NO: 58); 6.67.1-mod (SEQ ID NO: 62); 6.77.1-mod (SEQ ID NO: 66); y 7.26.4-mod (SEQ ID NO: 68); o

(c) la cadena pesada de (a) y la cadena liviana de (b).

16. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-17 que es una inmunoglobulina G (IgG), una IgM, una IgE, e IgA o una molécula IgD, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo biespecífico.

17. La porción que liga antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, 5-7 y 9-16 que es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento F_v o un anticuerpo de cadena simple.

18. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del anticuerpo monoclonal o una porción que liga antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-17 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

19. Un método para tratar una enfermedad inflamatoria en un sujeto que lo necesita, que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto el anticuerpo

monoclonal o la porción que liga antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-17 donde dicho anticuerpo o porción que liga antígeno inhibe la ligadura de MAdCAM a $\alpha_4\beta_7$.

20. El método de la reivindicación 19, donde la enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal.

21. El método de la reivindicación 20, donde la enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal se selecciona del grupo formado por enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, diverticulitis, gastritis, enfermedad del hígado, esclerosis biliar primaria y colangitis esclerosante.

22. El método de la reivindicación 20, donde la enfermedad inflamatoria del intestino es la enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa o ambas.

23. El método de la reivindicación 20, donde las enfermedades inflamatorias son diabetes insulina-dependiente y enfermedad injerto versus hospedante.

24. Una línea celular aislada que produce el anticuerpo monoclonal o la porción que liga antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-17 o la cadena pesada o cadena liviana de dicho anticuerpo o dicha porción del mismo.

25. La línea celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 24 que produce un anticuerpo seleccionado del grupo formado por: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 y 9.8.2, o un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de uno de dichos anticuerpos.

26. La línea celular de acuerdo con la reivindicación 25 que produce un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo formado por: 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod y 7.26.4-mod o un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de uno de dichos anticuerpos.

27. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica la cadena pesada o porción que liga antígeno de la misma o la cadena liviana o una porción que liga antígeno de la misma de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-17.

28. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 27, donde el vector comprende opcionalmente una secuencia de control de expresión ligada operativamente a la molécula de ácido nucleico.

29. Una célula hospedante que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 28 o la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 27.

30. Una célula hospedante de acuerdo con la reivindicación 29 que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada o una porción que liga antígeno de la misma y una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena liviana o una porción que liga antígeno de la misma de un anticuerpo o porción que liga antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-17.

31. Un método para producir un anticuerpo monoclonal humano o una porción que liga antígeno del mismo que liga específicamente MAdCAM, método que comprende cultivar la célula hospedante de acuerdo con la reivindicación 29 ó 30 o la línea celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 24 bajo condiciones adecuadas y recuperar dicho anticuerpo o porción que liga antígeno.

32. Un animal transgénico no humano o una planta transgénica que comprende (a) una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada o una porción que liga antígeno de la misma; (b) una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena liviana o una porción que liga antígeno de la misma; o (c) ambas (a) y (b) de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 ó 5-17, donde el animal transgénico no humano o la planta transgénica expresa dicha cadena pesada o cadena liviana o ambas.

33. Un método para aislar un anticuerpo o una porción que liga antígeno del mismo que se liga específicamente a MAdCAM, método que comprende la etapa de aislar el anticuerpo a partir del animal transgénico no humano o la planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 32.

34. Un método para tratar un sujeto que lo necesita con un anticuerpo humano o una porción que liga antígeno del mismo que se liga específicamente a MAdCAM e inhibe la ligadura a $\alpha_4 \beta_7$, método que comprende las etapas de:

- (a) administrar una cantidad efectiva de una molécula de ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada o una porción que liga antígeno de la misma, una molécula de ácido nucleico aislado que codifica la cadena liviana o una porción que liga antígeno de la misma, o moléculas de ácidos nucleicos que codifican la cadena liviana y la cadena pesada o porciones que ligan antígeno de las mismas; y
- (b) expresar la molécula de ácido nucleico.

35. Un método para producir un anticuerpo monoclonal humano que liga específicamente MAdCAM, método que comprende las etapas de:

(a) inmunizar un animal transgénico no humano que es capaz de producir anticuerpos humanos con MAdCAM, con una porción inmunogénica de MAdCAM o con una célula o tejido que expresa MAdCAM; y

(b) permitir que el animal transgénico produzca una respuesta inmune a MAdCAM.

36. Un anticuerpo monoclonal humano producido por el método de acuerdo con la reivindicación 35.

37. Un método para inhibir la ligadura de $\alpha_4 \beta_7$ a células que expresan MAdCAM humano, método que comprende poner en contacto las células con el anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-17 o una porción que liga antígeno del mismo.

38. Un método para inhibir la adhesión leucocitos - células endoteliales mediada por MAdCAM, método que comprende poner en contacto las células endoteliales con un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-17 o una porción que liga antígeno del mismo.

39. Un método para inhibir la adhesión, migración e infiltración de leucocitos a tejidos mediadas por MAdCAM, método que comprende la etapa de poner en contacto las células endoteliales con el anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-17 o una porción que liga antígeno del mismo.

40. Un método para inhibir adhesión celular $\alpha_4 \beta_7$ /MAdCAM dependiente, método que comprende la etapa de poner en contacto células que expresan MAdCAM humano con el anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-17 o una porción que liga antígeno del mismo.

41. Un método para inhibir el reclutamiento mediado por MAdCAM de linfocitos para el tejido linfoide gastrointestinal, método que comprende la etapa de poner en contacto células que expresan MAdCAM humano con el anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-17 o una porción que liga antígeno del mismo.

42. Un anticuerpo monoclonal o una porción que liga antígeno del mismo que liga específicamente MAdCAM, donde dicho anticuerpo o porción del mismo comprende una o más de una secuencia de aminoácidos FR1, FR2, FR3 o FR4 de un anticuerpo monoclonal humano seleccionado del grupo formado por: 1.7.2, 1.8.2,

6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod y 7.26.4-mod.

43. El anticuerpo monoclonal humano o una porción que liga antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende:

(a) una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que es al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo formado por: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod y 7.26.4-mod;

(b) una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que es al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo formado por: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod y 7.26.4-mod;

(c) ambas cadenas, (a) y (b); o

(d) cualquiera de (a), (b) o (c), con o sin la secuencia señal.

44. Un método para diagnosticar un trastorno caracterizado por MAdCAM humano soluble circulante, método que comprende las etapas de: (1) poner en contacto una muestra biológica con el anticuerpo monoclonal humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-17 o una porción que liga antígeno y (2) detectar la ligadura.

45. Un método para detectar inflamación en un sujeto, método que comprende las etapas de: (1) administrar a dicho sujeto el anticuerpo monoclonal o porción que liga antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-17, donde dicho anticuerpo o porción del mismo está marcado en forma detectable y (2) detectar la ligadura.

46. Un equipo diagnóstico que comprende el anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-17 o una porción que liga antígeno.

47. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 18 que comprende además uno o más agentes antiinflamatorios o inmunomoduladores adicionales.

48. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 47, donde dicho uno o más agentes antiinflamatorios o inmunomoduladores adicionales son

seleccionados del grupo formado por: corticosteroides, aminosalicilatos, azatioprina, metotrexato, ciclosporina, FK506, IL-10, GM-CSF, rapamacina, agentes anti-TNF α y antagonistas de moléculas de adhesión.

49. Una vacuna que comprende una cantidad efectiva del anticuerpo humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-17 o una porción que liga antígeno y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

50. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 49, donde la vacuna es mucosal.

51. Un método para detectar el efecto de la administración de un anticuerpo anti-MAdCAM inhibitorio o una porción que liga antígeno del mismo a un sujeto, método que comprende las etapas de:

- (a) administrar a un sujeto un anticuerpo monoclonal humano que se liga específicamente a MAdCAM; y
- (b) determinar si existe un aumento en los niveles de circulación de leucocitos que expresan $\alpha_4\beta_7$.

52. El método de acuerdo con la reivindicación 51, donde dichos leucocitos son linfocitos.

53. El método de acuerdo con la reivindicación 51, donde dicho aumento en los niveles de circulación de leucocitos que expresan $\alpha_4\beta_7$ se determina mediante análisis FACS.

Resumen

[0284] La presente invención se refiere a anticuerpos que incluyen anticuerpos humanos y porciones que ligan antígeno de los mismos que se ligan específicamente a MAdCAM, preferentemente a MAdCAM humano y que funcionan para inhibir MAdCAM. La invención también se refiere a anticuerpos anti-MAdCAM humanos y porciones que ligan antígeno de los mismos. La invención también se refiere a anticuerpos que son quiméricos, biespecíficos, derivatizados, anticuerpos de cadena simple o porciones de proteínas de fusión. La invención también se refiere a inmunoglobulinas aisladas de cadena pesada y liviana derivadas de anticuerpos anti-MAdCAM humanos y a moléculas de ácido nucleico que codifican tales inmunoglobulinas. La presente invención también se refiere a métodos para fabricar anticuerpos anti-MAdCAM humanos, a composiciones que comprenden estos anticuerpos y a métodos para usar los anticuerpos y composiciones para diagnóstico y tratamiento. La invención también provee métodos de terapia con genes que usan moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada y/o liviana de moléculas de inmunoglobulina que comprenden los anticuerpos anti-MAdCAM humanos. La invención también se refiere a animales o plantas transgénicos que comprenden moléculas de ácido nucleico de la invención.

178

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

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0039912
		Bogotá D.C., Abril 24 de 2012 - 11:26:22

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	22767	05/03/2012		20.000.00
RECIBO DE CA	999999999	32517	02/04/2012		300.000.00
RECIBO DE CA	999999999	32518	02/04/2012		300.000.00
RECIBO DE CA	999999999	32519	02/04/2012		300.000.00
RECIBO DE CA	999999999	32545	02/04/2012		370.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
43 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	1.290.000.00
			\$1.290.000.00

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

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-077165- -00008-0000

Fecha: 2012-04-24 11:20:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 179

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 24 de 2012 - 11:26:24

269 268
170
179

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0032560	
				Bogotá D.C., Abril 02 de 2012 - 08:09:04	
RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS				NI 860.041.367	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	157713566	30/03/2012	42.925.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO		Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00		590.000.00
					\$590.000.00
			=====		
SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 06-077165- -00008-0000 Fecha: 2012-04-24 11:20:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 179					
Código: 15413-841-005-0					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia Web: www.sic.gov.co e-mal: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240 Abril 2 de 2012 - 08:09:17					



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ ANTICUERPOS CONTRA MADCAM

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ AMGEN FREMONT, INC. Y PFIZER INC.

DOMICILIO _____ CALIFORNIA Y NEW YORK, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO _____ LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____

(FORMA P-10)