



No. 07-021258- -00007-0000

Fecha: 2012-07-16 16:48:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 225

As. 103303

Señor

DIRECTOR DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E.

S.

D.

REF: Expediente No. **07 021258** solicitud de patente de invención a favor
de **GENENTECH** Título: **ANTAGONISTAS ANTIBETA7**
HUMNAIZADOS Y USOS PARA ESTOS

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, portador de la tarjeta profesional No. 57.492 del C.S.J., obrando como apoderado de la sociedad solicitante me permito dar respuesta al oficio número 05971 relacionado con la patentabilidad de la presente invención y notificado por fijación en lista el 18 de Abril de 2012.

Con el ánimo de subsanar las objeciones planteadas por el señor Examinador, me permito presentar un nuevo pliego reivindicatorio de 1 – 35 reivindicaciones, en donde no se amplía en ningún momento la materia inicialmente divulgada y encuentra entero sustento en la descripción.

Consideramos que el nuevo pliego reivindicatorio supera todas y cada una de las objeciones de claridad emitidas por su despacho. Deseamos resaltar de igual manera que las reivindicaciones 28-34 especifican método aplicados *in vitro* que no corresponden a métodos para el tratamiento de humanos o animales. En cuanto a la reivindicación de composición, la misma establece que comprende el anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 27 el cual se encuentra debidamente definido. No compartimos la sugerencia del señor examinador en cuanto a indicar las proporciones de los elementos de la misma ya que restringiría exageradamente el alcance la invención. Para un persona versada en la materia, la composición reivindicada resulta absolutamente clara.

En cuanto a la novedad del anticuerpo reivindicado, deseamos resaltar que las nuevas reivindicaciones 1-8 están dirigidas a anticuerpos anti-beta 7 que comprenden secuencias HVR altamente específicas las cuales no se encuentran reveladas en ninguno de los documentos D1 o D2. Adicionalmente, la reivindicación 9 establece que la secuencia HVR-L1 es una variante de la secuencia SEQ ID NO:1 Así, el anticuerpo reivindicado debe incluir una variante de la secuencia HVR-L1 de FIB504 y por lo tanto las reivindicaciones 9, 14 y 15 no abarcan dicho anticuerpo FIB504.

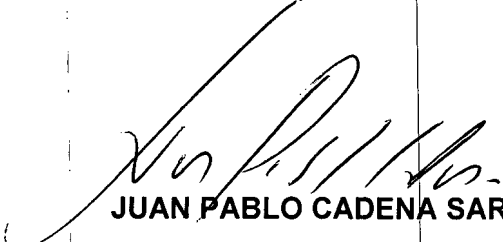
En conclusión, notamos que ninguno de los documentos D1 o D2 revela anticuerpos anti beta 7 con las regiones variables específicas que incluyen mutaciones específicas tal como ahora se reivindica.

Solicitud divisional

Por otra parte, nos permitimos presentar una solicitud divisional para estudio por parte de su Despacho.

Del Señor Director

Atentamente,



JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

T.P. No. 57.492 del C.SJ.

C.C. 80.410.337 de Usaquén

Calle 70 A No. 4 - 41

Reivindicaicones

1. Un anticuerpo anti-beta 7 que comprende

una secuencia HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una en orden comprende RASESVDDLH (SEQ ID NO:9), KYASQSIG (SEQ ID NO:2), QQGNSLPNT (SEQ ID NO:3), GFFITNNYWG (SEQ ID NO:4), GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO:5), y ARTGSSGYFDF (SEQ ID NO:64).

2. Un anticuerpo anti-beta 7 que comprende

una secuencia HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada uno en orden comprende RASESVDDLH (SEQ ID NO:9), KYASQSIG (SEQ ID NO:2), QQGNSLPNT (SEQ ID NO:3), GFFITNNYWG (SEQ ID NO:4), GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO:5), y MTGSSGYFDF (SEQ ID NO:6).

3. Un anticuerpo anti-beta 7 que comprende

una secuencia HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una en orden comprende RASESVDDLH (SEQ ID NO:9), KYASQSIG (SEQ ID NO:2), QQGNSLPNT (SEQ ID NO:3), GFFITNNYWG (SEQ ID NO:4), GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO:5), y AMTGSSGYFDF (SEQ ID NO:63).

4. Un anticuerpo anti-beta 7 que comprende:

Una secuencia HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una en orden comprende RASESVDDLH (SEQ ID NO:9), KYASQSIG (SEQ ID NO:2), QQGNSLPNT (SEQ ID NO:3), GFFITNNYWG (SEQ ID NO:4), GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO:5), y RTGSSGYFDF (SEQ ID NO:66).

5. Un anticuerpo anti-beta 7 que comprende

una secuencia HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una en orden comprende RASESVDSLH (SEQ ID NO:7), (SEQ ID NO:2), (SEQ ID NO:3), (SEQ ID NO:4), (SEQ ID NO:5), y (SEQ ID NO:64).

6. Un anticuerpo anti-beta 7 que comprende

una secuencia HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en donde cada una en orden comprende RASESVDSLH (SEQ ID NO:7), (SEQ ID NO:2), (SEQ ID NO:3), (SEQ ID NO:4), (SEQ ID NO:5), y (SEQ ID NO:6).

7. Un anticuerpo anti-beta 7 que comprende

una secuencia HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 and HVR-H3, donde cada una en orden comprende RASESVDTLH (SEQ ID NO:8), (SEQ ID NO:2), (SEQ ID NO:3), (SEQ ID NO:4), (SEQ ID NO:5), y (SEQ ID NO:64).

8. Un anticuerpo anti-beta 7 que comprende

una secuencia HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 and HVR-H3, donde cada una en orden comprende RASESVDTLH (SEQ ID NO:8), (SEQ ID NO:2), (SEQ ID NO:3), (SEQ ID NO:4), (SEQ ID NO:5), y (SEQ ID NO:6).

9. Un anticuerpo anti-beta 7 que comprende la secuencia HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de un anticuerpo anti-beta 7 de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y una variante HVR-L1 que es una variante de la secuencia A1 a A11, en donde A1-A11 es RASESVDTYLH (SEQ ID NO:1), y comprende 1-10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: A2 (A, G, S, T, o V); A3 (S, G, I, K, N, P, Q, R, o T), A4 (E, A, D, G, H, I, K, L, N, Q, R, o V), A5 (S, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, V, o Y), A6 (V, A, G, I, K, L, M, Q, o R), A7 (D, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, T, o V), A8 (S, D, E, G, P, T o N), A9 (L, Y, I, o M), A10 (L, A, I, M, o V), y A11 (H, F, S, o Y).

10. Un anticuerpo anti-beta 7 que comprende la secuencia HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de un anticuerpo anti-beta 7 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y una variante HVR-L2 que es una variante de la secuencia B1-B8, en donde B1-B8 es KYASQSIG (SEQ ID NO:2), y comprende 1-4 (1, 2, 3, o 4) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: B1 (K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y, T, W, S, E, C, D, G, o M), B5 (Q o S), B6 (S, R o L), y B7 (I, T, E, K, o V).

11. Un anticuerpo anti-beta 7 que comprende la secuencia HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de un anticuerpo anti-beta 7 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y una variante HVR-L3 que es una variante de la secuencia C1-C9, en donde C1-C9 es QQGNSLPNT (SEQ ID NO:3), y comprende al menos una sustitución en la posición C8 (W, Y, R, S, A, F, H, I, L, M, N, T, or V).

12. Un anticuerpo anti-beta 7 que comprende la secuencia HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 y HVR-H3 de un anticuerpo anti-beta 7 de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y una HVR-H2 que es una variante de la secuencia E1-E17, en donde E1-E17 es GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO:5), y comprende 1-7 (1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: E2 (Y, V, D, o F), E6 (S o G), E10 (S o Y), E12 (N, A, D, o T), E13 (P, D, A, o H), E15 (L o V), E17 (S o G).

13. Un anticuerpo anti-beta 7 que comprende la secuencia HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 y HVR-H2 de un anticuerpo anti-beta 7 de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y una HVR-H3 que es una variante de la secuencia F2-F11, en donde F2-F11 es MTGSSGYFDF (SEQ ID NO:6) o RTGSSGYFDF (SEQ ID NO:66), o de secuencia F1-F11, en donde F1-F11 es AMTGSSGYFDF (SEQ ID NO:63) o ARTGSSGYFDF (SEQ ID NO:64), y comprende 1 o 2 sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: F2 (M, A, E, G, Q, R, o S), y F11 (F o Y).
14. El anticuerpo anti-beta 7 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en donde el anticuerpo anti-beta 7 es humanizado.
15. El anticuerpo anti-beta 7 de la reivindicación 14 en donde el anticuerpo anti-beta 7 comprende una o más secuencias de estructura de consenso humana y/o humana en su dominio variable de cadena pesada y/o ligera.
16. El anticuerpo anti-beta 7 de la reivindicación 15 en donde el anticuerpo anti-beta 7 comprende al menos una porción o toda la secuencia de estructura de consenso humana κ del subgrupo I.
17. El anticuerpo anti-beta 7 de la reivindicación 15 en donde el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-beta 7 comprende una secuencia de estructura de consenso humana subgrupo III.
18. El anticuerpo anti-beta 7 de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 en donde el aminoácido en la posición 71 de la estructura de cadena pesada se selecciona del grupo de R, A, y T, y/o el aminoácido en la posición 73 de la estructura de cadena pesada se selecciona del grupo de N y T, y/o el aminoácido en la posición 78 de la estructura de cadena pesada se selecciona del grupo de F, A, y L.
19. El anticuerpo anti-beta 7 de la reivindicación 15 en donde el anticuerpo anti-beta 7 comprende una variante de la secuencia de estructura de consenso humana subgrupo III que comprende una sustitución en una o más de las posiciones 71, 73, 78 y/o 94.
20. El anticuerpo anti-beta7 de la reivindicación 19, en el que la sustitución es R71A, N73T, L78A y/o R94M.
21. Un anticuerpo anti-beta 7 humanizado, o un fragmento de unión beta 7 del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 en donde la afinidad monovalente del anticuerpo o el fragmento de unión a beta7 humano es sustancialmente igual que o mayor que la afinidad monovalente de un anticuerpo que comprende las secuencias variables de cadena pesada y ligera como se representa en la figura. 1A (SEQ ID NO: 10) y/o la figura. 1B (SEQ ID NO: 11), o la figura. 9A (SEQ ID NO: 12) y/o la figura. 9B (SEQ ID NO: 13).

22. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 21, en el que la afinidad es por lo menos dos veces, por lo menos cinco veces, al menos 10 veces, por lo menos 50 veces, por lo menos 100 veces, por lo menos 500 veces, por lo menos 1000 veces, por lo menos 5000 veces, o por lo menos 10.000 veces mayor que un anticuerpo que comprende las secuencias de cadena ligera y cadena pesada representados en la figura. 1A (SEQ ID NO: 10) y la fig. 1B (SEQ ID NO: 11), o la figura 9A (SEQ ID NO: 12) y la fig. 9B (SEQ ID NO: 13).
23. El anticuerpo o fragmento de unión de la reivindicación 22, en el que la afinidad monovalente del anticuerpo a beta7 humano es por lo menos tres veces mayor que la afinidad monovalente de un anticuerpo que comprende las secuencias de cadena ligera y cadena pesada representadas en la figura. 1A (SEQ ID NO: 10) y la fig. 1B (SEQ ID NO: 11), o la figura. 9A (SEQ ID NO: 12) y la fig. 9B (SEQ ID NO: 13).
24. El anticuerpo o fragmento de unión de la reivindicación 21 o 22 en el que el anticuerpo que comprende las secuencias de cadena ligera y cadena pesada representado en la figura. 1A (SEQ ID NO: 10) y la fig. 1B (SEQ ID NO: 11), o la figura. 9A (SEQ ID NO: 12) y la fig. 9B (SEQ ID NO: 13) es producido por la línea celular del hibridoma depositado bajo ATCC bajo la designación HB-293.
25. El anticuerpo o fragmento de unión de la reivindicación 21, en el que la afinidad de unión se expresa como un valor Kd.
26. El anticuerpo o fragmento de unión de la reivindicación 21, en el que la afinidad de unión se mide por Biacore TM o radioinmunoensayo.
27. El anticuerpo anti-beta7 de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 20, en el que la afinidad monovalente del anticuerpo beta7 humano es sustancialmente igual a o mayor que la afinidad monovalente a beta7 humano de un anticuerpo que comprende las secuencias variables de cadena ligera y pesada como la representada en la figura. 1A (SEQ ID NO: 10) y /o la figura. 1B (SEQ ID NO: 11), o la figura. 9A (SEQ ID NO: 12) y /o la figura. 9B (SEQ ID NO: 13).
28. Un método para inhibir la interacción de una subunidad integrina beta 7 humano con una segunda subunidad integrina y /o un ligando *in vitro*, al contactar el anticuerpo anti-beta7 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 con la integrina beta7.
29. El método de la reivindicación 28, en el que la segunda subunidad integrina es la subunidad integrina alfa4, y en donde el ligando es MAdCAM, VCAM o fibronectina.
30. El método de la reivindicación 29, en donde la subunidad integrina alfa4 es de un humano.

2

31. El método de la reivindicación 30 en donde el ligando es de un humano.
32. El método de la reivindicación 31 en donde la segunda subunidad integrina es la subunidad integrina alfaE y en donde el ligando es E-cadereina.
33. El método de la reivindicación 32 en donde la subunidad integrina alfaE es de un humano.
34. El método de la reivindicación 33 en donde el ligando es de un humano.
35. Una composición que comprende un anticuerpo anti-beta7 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

AS. 121.486

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión

☒ División

☐ Fusión

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

GENENTECH, INC.

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre representante legal

Tipo de empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☐

Otra ☒

Documento de identificación:

☐ C.C.

☐ C.E.

☐ NIT

☐ Otro

Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Estados Unidos de América	1 DNA Way, CA 94080	South San Francisco
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☒ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

CADENA SARMIENTO JUAN PABLO

80.410.337

57492

Apellidos y Nombre

Documento de identificación

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Ciudad
Calle 70 A #4-41	Bogotá, D.C.
Dirección electrónica	No. Fax
	742-2200
	Número telefónico
	744-2200

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

4. Datos del trámite		
CONVERSIÓN	DIVISIÓN	FUSIÓN
Expediente:	Expediente: 07 021.258	Expediente:
De:	De:	De:
A:	A:	A:

5. Anexos
Comprobante de pago No. <u>12-71094, 12-71129</u> Fecha: <u>16.07.2012</u>

6. Anexos
☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación.
☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación.
☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división.
☒ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud.
☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

7. Firma	
Nombre y apellidos	Firma
JUAN PABLO CADENA SARMIENTO	
C.C 80.410.337	Tarjeta Profesional 57492

121486.10

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -			
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		RECIBO DE CAJA		No. 12 - 0071094	
				Bogotá D.C., Julio 12 de 2012 - 16:31:45	
RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.				NI 860.047.372	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	452410151	12/07/2012	9.820.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO			Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	7 TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES			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. 07-021258- -00007-0000 Fecha: 2012-07-16 16:48:25 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASE NACIONAL I Act. 523 RESPUESTA Folios: 225					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Julio 12 de 2012 - 16:32:00					

121486

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0071129

Bogotá D.C., Julio 12 de 2012 - 16:33:08

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	452410140	12/07/2012	1.200.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
40 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	1.200.000.00
			\$1.200.000.00

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

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-021258- -00007-0000

Fecha: 2012-07-16 16:48:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 225

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

Julio 12 de 2012 - 16:33:10

Brigard & Castro
BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseññas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios; reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses); con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We)

Genentech, Inc.

1 DNA Way

domiciled in **South San Francisco, California 94080-4990 USA**

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law; renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

South San Francisco, California

Granted and signed in **USA**

this 6th day of December 2005

Signature

Name **Timothy R. Schwartz, Ph.D.**
Title **Section Patent Counsel
Authorized Corporate Signatory
Genentech, Inc.**

AUTHORIZATION

Genentech, Inc. hereby authorizes any of Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec and Timothy R. Schwartz, for so long as they remain employees of Genentech, Inc., to execute, on its behalf, any submissions associated with the filing, prosecution, granting, and extension and maintenance of grant of patent and trademark applications in the U.S. and foreign countries, contracts relating to biological deposits with the American Type Culture Collection, and assignments to publishers of copyrights covering works authored by Genentech employees.

August 27, 2002

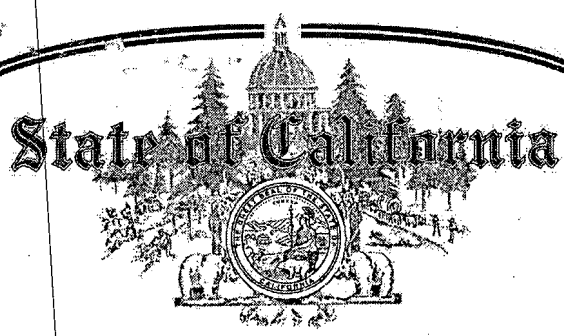
Dated

Sean Johnston

Sean A. Johnston
Vice President, Intellectual Property
Genentech, Inc.

13

AP-71108



SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

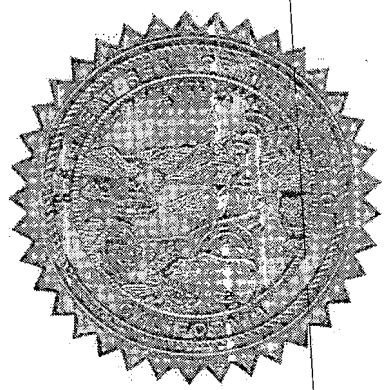
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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

CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 15th day of December 2005
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 267083
9. Seal/Stamp:

10. Signature



Priscilla McPherson

Secretary of State

[Signature]



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

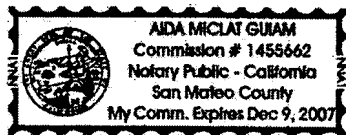
State of California

County of San Mateo } ss.

On December 6, 2005 before me, Aida Mielat Guian
Date Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")
personally appeared Timothy R. Schwartz
Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me
☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



WITNESS my hand and official seal.

Aida Mielat Guian
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____ Number of Pages: _____

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

- ☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER
Top of thumb here

14

93 33

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por **Genentech, Inc.** domiciliada en **1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, Estados Unidos de América.**

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América
Esta documento público
2. ha sido firmado por AIDA MICLAT GUIAM
3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello/timbre de AIDA MICLAT GUIAM, Notario Público
Estado de California

CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el 15 de diciembre de 2005
7. por el Secretario de Estado Delegado, Estado de California
8. No. 267083
9. Sello/Timbre

10. Firma

(Firma)

Secretario de Estado

RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

Estado de California)
) ss.
Condado de San Mateo)

El 6 de diciembre de 2005, ante mi, AIDA MICLAT GUIAM, apareció personalmente
Thimoty R. Schwartz

☐ a quien conozco personalmente

☒ quien demostró ante mi en base a
evidencia satisfactoria ser la persona cuyo
nombre esta suscrito en el instrumento y
quien reconoció ante mi que ejecutó el
mismo en su capacidad autorizada, y que
por su firma en el instrumento la persona o
la entidad a nombre de la cual la persona
actuó, ejecutó el instrumento.

Hay un sello que dice:
AIDA MICLAT GUIAM
COMISIÓN # 14556612
Notario Público-California
Condado de San Mateo
Mi comisión expira Dic. 9 de 2007

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

OPCIONAL

Aunque la información en esta sección no es requerida por la ley, puede probar ser valiosa para las personas que se basan en el documento y puede
prevenir la remoción y readhesión fraudulenta de esta forma a otro documento

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento: _____

Fecha del Documento: _____ Número de páginas: _____

Firmante(s) diferente(s) a (los) nombrado(s) arriba: _____

Capacidad(es) Reivindicada(s) por el (los) firmante(s)

Nombre del firmante: _____

- ☐ Individuo
☐ Funcionario Corporativo – Título(s): _____
☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
☐ Abogado de hecho
☐ Fideicomisario
☐ Guardián o conservador
☐ Otro: _____

El firmante representa: _____

Huella Índice derecho del firmante Parte alta del dedo aquí

AUTORIZACION

Genentech, Inc. por la presente autoriza a cualquiera de Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec y Thomity R. Schwartz, mientras permanezcan como empleados de Genentech, Inc., a ejecutar, a su nombre, cualquier solicitud asociada con presentación, procesamiento, consecución, y extensión y mantenimiento de concesión de solicitudes de patente y marca registrada en los Estados Unidos y países extranjeros, contratos relacionados con depósitos biológicos con la Colección Americana de Tipo de Cultivo, y cesiones a publicistas de derechos de autor que cubran los trabajos de autoría de los empleados de Genentech.

27 de Agosto de 2002

Fechado

(Firma)

Sean A. Johnston
Vicepresidente, Propiedad Intelectual
Genentech, Inc.

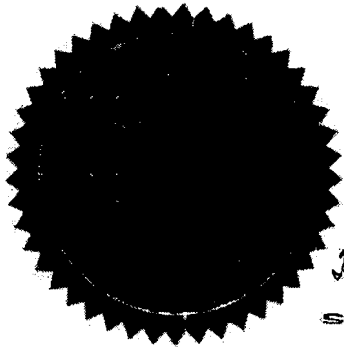
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254030
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



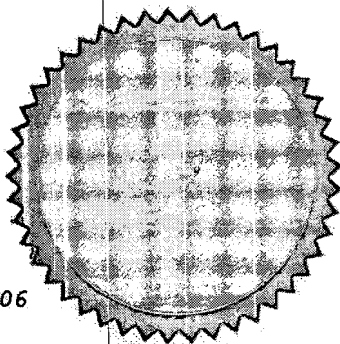
Harriet Smith Windsor
Secretary of State

Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900384

DATE: 05-24-05

AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION:

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "Corporation"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("Delaware Law").

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 09:00 AM 07/22/1999
991302331 - 2112549

12

ARTICLE 4

SECTION 4.01. Capital Stock. (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. Common Stock. (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

SECTION 4.03. Preferred Stock.

(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of

the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

(i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;

(ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;

(iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;

(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;

(vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;

(vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and

(viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.

18

ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are

divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors.* (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or

19

not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, rescission, adoption or modification.

ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities

of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities.* In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.

20

SECTION 8.04. *Deemed Consent of Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term "Roche" shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are "affiliates" (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

SECTION 8.06. *Termination; Binding Effect.* Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. *Article 9.* The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. *Contracts Not Void.* No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the

meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "Corporation" and "Roche" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. *No Liability For Good Faith Actions.* Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer or director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

SECTION 9.05. *Contracts Covered.* For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.

21

SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.

IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary

22

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

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 Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254030
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL VIGÉSIMO SEGUNDO DÍA DE JULIO, A. D. 1999, A LAS 9 EN PUNTO DE LA MAÑANA.

Harriet Smith Windsor (Firma)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACIÓN: 3900384

FECHA: 05 - 24 - 05

27

CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
GENENTECH, INC.

Genentech, Inc (la "Corporación"), una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, por la presente corrige el Certificado de Incorporación, el fue presentado originalmente el 23 de diciembre de 1986, bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y corregido subsiguientemente.

Por la presente se vuelve a redactar el certificado de incorporación de la Corporación y se corrige aun más para que diga en su totalidad lo que sigue:

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTICULO 3

El propósito de a Corporación es el de participar en cualquier acto o actividad legal para las cuales las corporaciones pueden ser organizadas bajo la Ley General de Corporación del Estado de Delaware como existe o puede se modificada la misma en adelante ("Delaware Law").

ARTICULO 4

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de cuatrocientos millones (400,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones

preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Trecientos millones (300,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de la Corporación con derecho a votar por la misma independiente de las consideraciones de la Sección 242(b)(2) de la Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción Común.* (a) *Emisión y Consideración.* Cualquier acción sin emitir o del tesoro del las Acciones Comunes puede emitirse para tal consideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto tiempo por la Junta Directiva.

(b) *Dividendos.* Sujeto a los derechos de los accionistas de las Acciones Preferenciales, los accionistas de Acciones Comunes deberán tener el derecho a recibir, cuando y como se declare por la Junta Directiva, de los activos de la Corporación los cuales están disponibles para ello por ley, dividendos pagables ya sea en dinero, propiedad, o acciones y los accionistas de la Acción Preferencial no tendrán derecho a participar en tales dividendos (a menos que la Junta Directiva determine lo contrario en cualquier resolución que condiciona la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCIÓN 4.03. *Acción Preferencial*

(a) *Serie y Límites de Variaciones entre Series.* Cualquier acción no emitida o del tesoro de las Acciones Preferenciales puede emitirse cada cierto tiempo en una o más series para tal consideración como pueda ser fijada cada cierto tiempo por la Junta Directiva. Antes de que se emita cualquier acción de las Acciones Preferenciales de cualquier serie particular, se deberá presentar un certificado ante el Secretario de Estado de Delaware estableciendo las designaciones, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones que irán anexas a las Acciones Preferenciales de tal serie y tales otras cuestiones como puedan requerirse, y la Junta Directiva deberá fijar y determinar, y por la presente está expresamente autorizada para fijar y determinar, en la forma provista por la ley, los

particulares de las acciones de tal serie (siempre y cuando no sean inconsistentes con las condiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluyendo, pero sin limitarse a, las siguientes:

(i) la designación distintiva de tal serie y el número de las acciones que han de constituir tal serie, número que puede incrementarse (excepto cuando lo determine de otro modo la Junta Directiva al crear tal serie) o reducida (pero no por debajo del número de acciones de las mismas que están vigentes) cada cierto tiempo por una acción semejante de la Junta Directiva;

(ii) la tasa anual de dividendos a pagar sobre las acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales se pagarán tales dividendos y la fecha a partir de la cual los dividendos serán acumulativos en el evento que la Junta Directiva determine que los dividendos serán acumulativos;

(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;

(iv) si tal serie tendrá o no privilegios de conversión y, de ser así, los términos y condiciones de tal conversión, incluyendo, pero sin estar limitado a, la condición para ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y de tal forma como la Junta Directiva lo determine;

(v) si las acciones de tal serie serán o no redimibles y, de ser así, los términos y condiciones de tal redención, incluyendo la fecha o fechas en las cuales o después de las cuales pueden ser redimibles, y la cantidad a pagar por acción en caso de redención, cantidad que variará bajo diferentes condiciones y en diferentes fechas de redención;

(vi) si tal serie tendrá o no un fondo de inversión para la redención o compra de acciones de esa serie y, de ser así, los términos y la cantidad de tal fondo de inversión;

(vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de una liquidación, disolución o cierre voluntaria o involuntaria de la Corporación, y

los derechos relativos de prioridad, de haber, de pago de acciones de esa serie; y

(viii) cualquier otro derecho relativo, preferencia y limitación de tal serie.

ARTICULO 5

SECCION 5.01. *Enmiendas a los estatutos por los Directores.* (a) En adición y no limitando los poderes conferidos por estatutos, la Junta Directiva esta expresamente autorizada para hacer, alterar, enmendar, rechazar y rescindir los estatutos de la Corporación, sujetos a las secciones 5.01(b) y 5.01(c) a continuación.

(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos solo pueden ser alteradas, enmendadas, repelidas, o rescindidas por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar las mismas.

SECCION 5.02. *Enmienda del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación solo puede ser alterada, enmendada, repelida, o rescindida por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a voto sobre la misma que representen a más del 60% de las acciones con derecho a votar la misma. La sección 5.01(c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar la misma que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar la misma.

ARTICULO 6

SECCION 6.01. *Elección del Directorio por los Accionistas de Acción Preferencial.* Durante cualquier periodo cuando los accionistas de cualquier

25

acción preferencial cualquiera de una o más series de las mismas, que voten como una clase, tengan derecho a elegir un número específico de directores, por razón a atrasos en los dividendos u otras condiciones que les dan el derecho a hacerlo, entonces y durante el tiempo que continúe el derecho (i) el número de directores autorizado de otro modo será incrementado por tal número de directores especificado, y los accionistas de tales Acciones Preferenciales o tales series de las mismas, que votan como una clase, tendrán derecho a elegir los directores adicionales para lo que se provee, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones Preferenciales o series; (ii) cada uno de tales directores adicionales servirá durante tal término, y tendrá tales poderes de voto, como se han de otorgar en las provisiones pertinentes a tales Acciones Preferenciales o series; y (iii) siempre que los accionistas de cualquiera de tales Acciones Preferenciales o series de las mismas están desprovistos de tales derechos a elegir un número específico de directores, votando como clase, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones preferenciales o series, los términos de oficio de todos los directores elegidos por los accionistas de tales Acciones preferenciales o series, que votan como clase, de acuerdo con las condiciones o elegidos para llenar cualquier vacante resultante de la muerte, renuncia o remoción de directores así elegidos por los accionistas de tales Acciones Preferenciales o series, terminarán en adelante y el número autorizado de directores será reducido en concordancia.

SECCION 6.02. *Votaciones.* Las elecciones de directores en una reunión anual o especial de accionistas necesaria no serán por votos escritos a menos que los estatutos de la Corporación digan lo contrario.

SECCION 6.03. *Eliminación de cierta responsabilidad personal de los directores.* (a) Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por daños monetarios por violación del deber fiduciario como director hasta donde lo permita la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y sus herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quien fue o es una parte o esta amenazado de ser parte de, o esta involucrado en cualquier acción, demanda o proceso amenazado, pendiente, o completado, ya sea civil, criminal, administrativo o investigativo, por razón del hecho de que esa persona es o fue un director de la Corporación o es o estaba sirviendo por solicitud de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa, será indemnizado y completamente protegido por la Corporación hasta donde lo

permita la Ley de Delaware. El derecho a la indemnización concedido en esta sección 6.03 también debe incluir el derecho a que la Corporación le pague los gastos incurridos en conexión con cualquiera de tales procesos por adelantado de su decisión final hasta donde los autoriza la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferido en esta sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, por acción de su Junta Directiva, proporcionar indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta tal punto y a tal efecto como lo determine apropiado la Junta Directiva y lo autorice la Ley de Delaware.

(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa contra cualquier gasto, responsabilidad o pérdida incurrida por tal persona en cualquier capacidad o que surge de su estado como tal, ya sea si la Corporación tiene o no el poder de indemnizarlo contra tal responsabilidad bajo la ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán exclusivos de ningún otro derecho el cual cualquier otra persona pueda tener o adquirir de aquí en adelante.

(f) Ni la alteración, enmienda, rechazo o rescisión de esta Sección 6.03, ni la adopción de ninguna condición de este Certificado de Incorporación o de los Estatutos de la Corporación, ni, hasta donde lo permite la Ley de Delaware, ninguna modificación de la ley, debe eliminar o reducir el efecto de esta Sección 6.03 respecto a ninguno de los actos u omisiones que ocurran antes de tal alteración, enmienda, rechazo, rescisión, adopción o modificación.

ARTICULO 7

SECCION 7.01, *Sección 203 de la Ley de Delaware*. Por la presente la Corporación elige no ser gobernada por la Sección 203 de la Ley de Delaware.

ARTICULO 8

SECCION 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación cesé de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define en la Sección 8.05) y Roche puede entrar en actividades o líneas de negocios semejantes o similares y tener un interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus relaciones contractuales, corporativas y de negocios con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades concomitantes a cualquier director, quien desea y se propone satisfacer completamente tales deberes fiduciarios del director, al determinar el alcance completo de tales deberes en cualquier situación particular, las condiciones de este artículo 8 se establecen para regular, definir y guiar la conducta de ciertas cuestiones de la Corporación ya que pueden involucrar a Roche y sus funcionarios y directores, y los poderes, derechos, deberes y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con éste.

SECCION 8.02. *Actividades en Negocios Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc. pueda de otra forma acordarlo por escrito,

(a) Roche no tendrá el deber de abstenerse de entrar directamente o indirectamente en actividades de negocios o líneas de negocios semejantes o similares a las de la Corporación, y

(b) ni Roche ni ninguno de sus funcionarios o director de la misma será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar cualquier deber fiduciario por razón de alguna de tales actividades de Roche o de la participación de tal persona en las mismas.

En el evento que Roche adquiera conocimientos de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa tanto para Roche como para la Corporación, Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario como accionista de la Corporación o la persona que controla a un accionista por razón del hecho

que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma, dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información respecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.03. *Oportunidades Corporativas.* En el evento que un director, funcionario o empleado de la Corporación quien también es director, funcionario o empleado de Roche adquiera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (ya se si esta transacción o materia potencial es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación o no), tal director, funcionario o empleado debe tener el derecho a ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o Roche como tal director, funcionario o empleado los considere apropiado bajo las circunstancias de su discreción, y tal director, funcionario o empleado no será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario o deber de lealtad o faltar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de ningún beneficio personal inapropiado por razón del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de a la Corporación) o no comunicó información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche busca o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 8.

SECCION 8.05. *Definiciones.* Para propósitos de este Artículo 8 y el Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" debe significar la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido y otras entidades en las cuales la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de voto o intereses de voto similares, y (ii) el término "**Roche**" debe significar Roche Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son "**afiliados**" (como se

2X

define en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó) de Roche Holdings, Inc.

SECCION 8.06, *Finalización: Efecto Obligante*. Son consideración con nada en este Certificado de Incorporación que lo contradiga, las condiciones anteriores de este Artículo 8 deberán expirar en la fecha que Roche cese de poseer con beneficios Acciones Comunes que representen al menos 5% del número de acciones vigentes de las Acciones Comunes de la Corporación y nadie que se director o funcionario de la Corporación sea también director o funcionario de Roche. Ni tal vencimiento, ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 8 así como tampoco ninguna condición de este Certificado de Incorporación Enmendado y Vuelto a Redactar inconsistente con alguna de las condiciones de este Artículo 8 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 respecto a cualquier materia, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, excepto por este Artículo 8, pueda acaecer o surgir, antes de tal vencimiento, alteración, enmienda o adopción.

SECCION 8.07. *Artículo 9*. Las condiciones de este Artículo son adicionales a las condiciones del Artículo 9.

ARTICULO 9

SECCION 9.01. *Contratos no nulos*. Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización de los mismos) entre la Corporación y Roche será nulo u anulable solamente por razón de que Roche es parte del mismo, o solamente porque cualquiera de los directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados a Roche están presentes en o participan en la reunión de la Junta Directiva o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito, pero cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernado por las condiciones de este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "*Corporación*" y "*Roche*" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.

SECCION 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que son también directores o funcionarios de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo). Las acciones vigentes de las Acciones Comunes de propiedad de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de accionistas que autorice o apruebe tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo).

SECCION 9.03. *No responsabilidad por acciones de buena fe.* Ni Roche ni ningún funcionario o director de la misma será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar cualquiera de los deberes fiduciarios o deberes de lealtad o por fallar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o por derivación de cualquier beneficio personal por razón del hecho que Roche o un funcionario o director de la misma de buena fe tome cualquier acción o ejerza cualquier derecho o de o retenga cualquier consentimiento en conexión con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto dado u otra acción tomada por cualquier persona que es un funcionario, director o representante de Roche, donde el voto o acción es tomado por tal persona en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho o un consentimiento de Roche para los propósitos de cualquiera de tal acuerdo o contrato.

SECCION 9.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 9.

SECCION 9.05. *Contratos cubiertos.* Para propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o cualquier corporación, sociedad, sociedad de riesgo conjunto, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) el cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poderes de voto o intereses de voto similares vigentes se considerará un contrato, acuerdo o transacción con la Corporación.

SECCION 9.06. *Efecto obligante.* Ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 9 ni la adopción de alguna condición inconsistente con cualquier condición de este Artículo 9 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 respecto a cualquier materia que ocurra, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, a no ser por este Artículo 9, pueda acaecer o surgir, antes de tal alteración, enmienda, cambio, rechazo o adopción.

SECCION 9.07. *Artículo 8.* Las condiciones de este Artículo 9 son adicionales a las condiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, el cual ha sido adoptado de acuerdo con las secciones 242 y 245 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware y por consentimiento escrito de el único accionista de la Corporación de acuerdo con la sección 228 de Ley General de Corporación del Estado de Delaware, ha sido ejecutado este 22 de Julio de 1999.

GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente

Consejo General y Secretaría

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

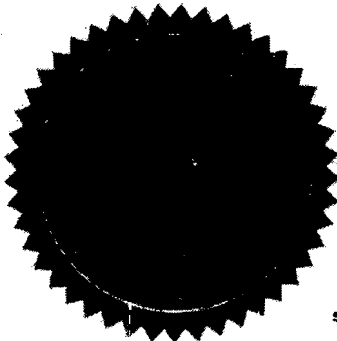
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254031

9. Seal/Stamp;

10. Signature:



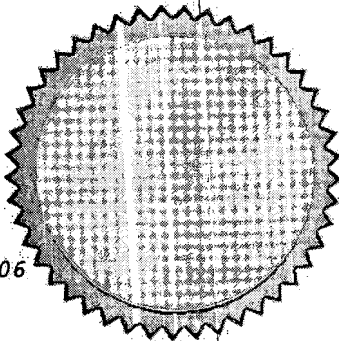
Harriet Smith Windsor
Secretary of State

Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900385

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

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 Harriet Smith Windsor
- 3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
- 4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

- 5. en Dover, Delaware
- 6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
- 7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
- 8. No. 0254031
- 9. Sello/timbre
- 10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOQUINTO DIA DE MAYO, A. D. 2000, A LAS 5 EN PUNTO DE LA TARDE.

Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900385

FECHA: 05 - 24 - 05

37

CERTIFICADO DE ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de setecientos millones (700,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Seiscientos millones (600,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254033
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



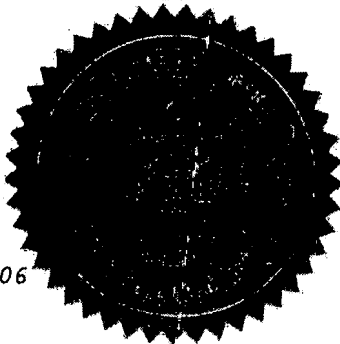
Harriet Smith Windsor
Secretary of State

Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor
Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900387

DATE: 05-24-05

27
State of Delaware
Secretary of State
Division of Corporations
Delivered 07:44 PM 04/16/2004
FILED 07:39 PM 04/16/2004
SRV.040281669 - 2112549 FILE

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

Section 4.01, *Capital Stock*. (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

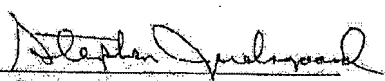
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

GENENTECH, INC.

By: 

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Executive Vice President, General Counsel
and Secretary

#153087

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

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 Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254033
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL
ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES
UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE
"GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOSEXTO DIA
DE ABRIL, A. D. 2004, A LAS 7:39 EN PUNTO DE LA TARDE.

Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor - Secretaria de Estado

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación está autorizada a emitir es de tres mil cien millones (3,100,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3,000,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente.

35

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

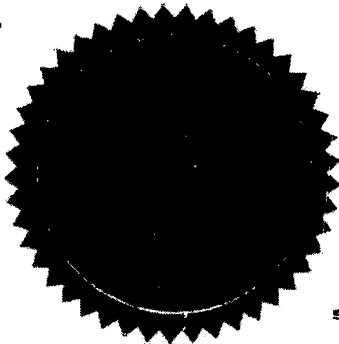
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254032

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State

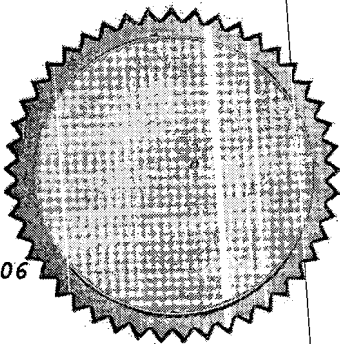
26

Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900386

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

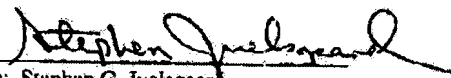
THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

By:



Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

27

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

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 Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254032
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMO DIA DE MAYO, A. D. 2001, A LAS 2:05 EN PUNTO DE LA TARDE.

Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900386

FECHA: 05 - 24 - 05

28

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de mil trescientos millones (1,300,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Mil doscientos millones (1,200,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.

121486
39

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
9 March 2006 (09.03.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/026759 A3

(51) International Patent Classification:

C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2005/031401

(22) International Filing Date:

2 September 2005 (02.09.2005)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/607,377 3 September 2004 (03.09.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENEN-
TECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco,
California 94080-4990 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DENNIS, Mark,
S. [US/US]; 120 Plymouth, San Carlos, California 94070
(US). FONG, Sherman [US/US]; 19 Basinside Way,
Alameda, California 94502 (US).

(74) Agent: CONLEY, Deirdre, L.; MS 49, 1 DNA Way,
South San Francisco, California 94080 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
5 October 2006

(15) Information about Correction:

Previous Correction:

see PCT Gazette No. 20/2006 of 18 May 2006

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2006/026759 A3

(54) Title: HUMANIZED ANTI-BETA7 ANTAGONISTS AND USES THEREFOR

(57) Abstract: The invention provides therapeutic anti-beta7 antibodies, compositions comprising, and methods of using these antibodies

ANTAGONISTAS ANTI-BETA7 HUMANIZADOS Y USOS PARA ESTOS

Esta es una solicitud no provisional presentada bajo la 37 CFR § 1.53 (b) (1), que reivindica prioridad bajo la 35 U.S.C. § 119(e) a la solicitud provisional serie No. 60/607,377, presentada en Septiembre 3, 2004, cuyos contenidos completos se incorporan aquí como referencia.

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se relaciona de manera general con los campos de la biología molecular y la regulación del factor de crecimiento. Más específicamente, la invención se relaciona con moduladores de la actividad biológica de integrinas que contienen la subunidad beta7, y usos de dichos moduladores

ANTECEDENTES

Las integrinas son receptores de superficie celular α/β heterodimérico involucrados en numeroso procesos celulares provenientes de adhesión de célula para regulación de gen (Hynen donde, R.O., Cell, 1992, 69:11-25; y Hemler, M.E., Annu. Rev. Immunol., 1990, 8:365-368). Varias integrinas han estado implicadas en los procesos de la enfermedad y han generado amplio interés como blancos potenciales para el descubrimiento de droga (Sharar, S.R. et al., Springer Semin. Immunopathol., 1995, 16:359-378). En el sistema inmune, las integrinas están involucradas en el tráfico de leucocitos, la adhesión e infiltración durante los procesos inflamatorios (Nakajima, H. et al., J. Exp. Med., 1994, 179:1145-1154). La expresión diferencial de las integrinas regula las propiedades adhesivas de las células y diferentes integrinas están involucradas en diferentes respuestas inflamatorias. (Butcher, E.C. et al., Science, 1996, 272:60-66). Las integrinas beta7 (es decir alfa4 beta7 (es decir alfa4beta7 ($\alpha 4\beta 7$) y alfaEbata7 ($\alpha E\beta 7$)) se expresan principalmente en monocitos, linfocitos, eosinófilos, basófilos, y macrófagos pero no en neutrófilos. (MJ. et al., Cell, 1990, 60:577-584). Los ligandos primarios para la integrina $\alpha 4\beta 7$ son moléculas de adición celular de adresina mucosal de proteínas de superficie endotelial (MAdCAM) y moléculas de adhesión de célula vascular (VCAM-I) (Makarem, R. et al., J. Biol. Chem., 1994, 269:4005-4011). La unión del $\alpha 4\beta 7$ a MAdCAM y/o VCAM expresadas sobre los endotelios venosos

altos (HEVs) en los sitios de inflamación da como resultado la adhesión firme del leucocito al endotelio seguido por la extravasación en el tejido inflamado (Chuluyan, H.E. et al., Springer Semin. Immunopathol., 1995, 16:391-404). Un ligando primario para la integrina $\alpha E\beta 7$ en la proteína de la superficie del linfocito intra-epitelial (IEL), E-cadhereina, que facilita la adherencia de la célula que lleva $\alpha E\beta 7$ a los linfocitos Epiteliales. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra $\alpha 4\beta 7$, MAdCAM o VCAM han mostrado ser moduladores efectivos en modelos de animales de enfermedades inflamatorias crónicas como el asma (Laberge, S. et al., Am. J. Res. Dis. Crit. Care Med., 1995, 151:822-829.), artritis reumatoide (RA; Barbadillo, C. et al., Springer Semin. Immunopathol., 1995, 16:375-379), colitis (Viney et al., J. Immunol., 1996, 157: 2488-2497) y enfermedades inflamatorias del intestino (IBD; Podalski, D.K., N. Eng. J. Med., 1991, 325:928-937; Powrie, F. et al., Ther. Immunol., 1995, 2:115-123). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la subunidad beta7 han mostrado la unión a la subunidad integrina (Tidswell, M. et al. (1997) J. Immunol. 159: 1497- 1505) pero como anticuerpos no humanos o no humanizados, a ellos les falta utilidad clínica.

Existe la necesidad de compuestos altamente específicos, tales como anticuerpos humanizados o fragmentos de unión que inhiben la interacción entre la integrina alfa4beta7 y sus ligandos MAdCAM y/o VCAM así como también la interacción entre la integrina alfaEbeta7 y su ligando E-cadherina. Estos compuestos son útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas talen donde como asma, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, diabetes, complicaciones de transplante de órganos, y trastornos relacionados con aloinjerto.

Todas las referencias citadas aquí, que incluyen las solicitudes patente y publicaciones, se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención está en parte basada en la identificación de una variedad de antagonistas de sendas biológicas que involucran las integrinas que contienen beta7, que son generalmente procesos biológicos/celulares que se presentan como un blanco terapéutico importante y ventajoso. Tales sendas biológicas incluyen, sin limitación, inflamación, particularmente trastornos de inflamación

crónica tales como asma, alergias, BBD, diabetes, trasplante y trastornos de injerto Vs. Huésped. La invención suministra composiciones y métodos basados en la interferencia con la adhesión celular mediada por beta7 integrina y/o reclutamiento, incluyendo pero no estando limitado a la interferencia con MAdCAM y VCAM-I que se una a la porción extra celular de la integrina alfa4beta7 y la interacción de E-cadherina con la interacción de integrina alfaEbeta7. Los antagonistas de la invención, como se describen aquí, suministran agentes terapéuticos y de diagnóstico importantes para uso en condiciones patológicas blanco asociadas con señalización anormal o no deseada por vía de una integrina beta7. De acuerdo con esto, la invención suministra métodos, composiciones, kits de artículos de elaboración relacionados con la modulación de las celdas mediadas por integrina beta7, que incluye la modulación de la unión de MAdCAM-alfa4beta7 y el reclutamiento de leucocito al epitelio gastrointestinal, unión y energía, asma, IBD (tal como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa), diabetes, inflamación asociada con trasplante, trastorno de injerto vs. Huésped y/o trastornos con aloinjerto y otras actividades biológicas/ fisiológicas mediadas por la integrina beta7.

En un aspecto, la invención suministra agentes terapéuticos anti-beta7 adecuados para uso terapéutico y capaz de efectuar varios grados de irrupción de las celdas mediadas por integrina beta7. Por ejemplo, en una modalidad, la invención suministra un anticuerpo anti-beta7 humanizado en donde el anticuerpo como un fragmento FAB tiene sustancialmente la misma afinidad de unión al beta7 humano que el fragmento deseado de murino que comprende, consiste o consiste en esencialmente de una secuencia de dominio variable de cadena ligera y cadena pesada como se describen las figuras 1A y 1B o en las figuras 9A y 9B. En otra modalidad, la invención suministra un anticuerpo anti-beta7 humanizado en donde el anticuerpo como fragmento de clave tiene una afinidad de unión al beta7 humano que es inferior, por ejemplo al menos 3, al menos 5, al menos 7 o al menos 10 veces inferior, que aquella del fragmento de clave de murino o rata que comprende, consiste o consiste esencialmente de una secuencia de dominio variable de cadena ligera y cadena pesada como se describió en la figura 1A y 1B o las secuencias de dominio variable descritas en las figuras 9A y 9B. Alternativamente, un anticuerpo anti-beta7 humanizado o un fragmento de unión beta7 de estos, de la invención exhibe afinidad monovalente al beta7 humano, cuya afinidad en donde sustancialmente la misma o mayor que la afinidad

monovalente al beta7 humano de un anticuerpo que comprende las secuencias variables de cadena ligera y cadena pesada como se describió en la figura 1A (Seq Id No 2:10) y/o Fig. 1B (SEQ ID No: 11), o Fig. 9A (SEQ ID No: 12) y/o Fig. 9B (SEQ ID No: 13). El fragmento de anticuerpo o de unión de estos que tiene gran afinidad al beta7 humano exhibe una afinidad que en donde al menos dos veces donde, al menos cinco veces donde, al menos diez veces donde, al menos cincuenta veces donde, al menos cien veces donde, al menos quinientas veces donde, al menos mil veces donde, al menos cinco mil veces donde, o al menos diez mil veces mayor que un anticuerpo que comprende las secuencias de cadena ligera y cadena pesada descritas en la figura 1A (SEQ ID No: 10) y/o Fig. 1B (SEQ ID No: 11), o Fig. 9A (SEQ ID No: 12) y/o Fig. 9B (SEQ ID No: 13).

En otra modalidad, la presente invención suministra un anticuerpo humanizado anti-beta7 en donde el anticuerpo como fragmento deseado tiene una afinidad de unión al beta7 humano que es mayor, por ejemplo al menos tres, al menos cinco, al menos siete, al menos nueve, al menos diez, al menos quince, al menos veinte, o al menos cien veces mayor que aquella de un fragmento deseable de roedor (tal como rata o murino) que comprende, consiste o consiste esencialmente de una secuencia de dominio variable de cadena ligera y cadena pesada como se describió en la figura 1A y 1B, respectivamente. En una modalidad, dicho fragmento deseado de roedor tiene la afinidad de unión de un fragmento FAB que comprende las secuencias de dominio variable de un anticuerpo de rata designado FIB504.64 producido mediante la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso ATCC HB -293 del American Type Culture Collection. En una modalidad adicional, el fragmento FAB humanizado de la invención tiene la afinidad de unión del fragmento FAB que comprende las secuencias de dominio variable del anticuerpo producido por cualquiera de los anticuerpos anti-beta7 humanizados de la invención. Como está ya establecido en la técnica, la afinidad de unión de un ligando a su receptor se puede determinar utilizando cualquier variedad de ensayos, y expresado en términos de una variedad de valores cuantitativos. De acuerdo con esto, en una modalidad, la afinidad de unión se expresa como los valores K_d y refleja la afinidad de unión intrínseca (por ejemplo con los defectos de avidéz minimizados). En general y preferiblemente, la afinidad de unión se mide in Vitro, sea en un conjunto libre de célula o asociado a célula. Como se describe con mayor detalle aquí, la diferencia de plegamiento en la afinidad de unión se puede cuantificar en los términos de la proporción del valor de

afinidad de unión de un anticuerpo humanizado en la forma FAB y el valor de afinidad de unión de un anticuerpo FAB de referencia/comparado (por ejemplo un anticuerpo de murino que tiene unas secuencias de región hipervariable donadora), en donde los valores de afinidad de unión se determinan bajo condiciones de ensayo similares. Así, en una modalidad, la diferencia de plegamiento en la afinidad de unión se determina como la proporción de los valores Kd del anticuerpo humanizado en la forma FAB y dicho anticuerpo FAB de referencia/comparador. Cualquier número de ensayos conocidos en la técnica, que incluyen aquellos descritos aquí se pueden utilizar para obtener mediciones de afinidad de unión, incluyendo por ejemplo, Biacore®, (Biacore International Ab, Uppsala, Sweden) y ELISA.

En sus varios aspectos y modalidades, el anticuerpo antagonista beta7 de la invención está dirigido al siguiente conjunto de reivindicaciones potenciales para esta solicitud: anticuerpo que comprende un anticuerpo anti-beta7 o un fragmento de unión beta7 de estos que comprende:

(a) Al menos, uno, dos, tres, cuatro, o cinco secuencias de región hipervariable (HVR) seleccionadas del grupo que consiste de:

(i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A11, en donde A1-A11 es RASESVDTYLH (SEQ DD NO: 1)

(ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B8, en donde B1-B8 KYASQSIG (SEQ ID NO:2)

(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, en donde C1-C9 QQGNSLPNT (SEQ ID NO:3)

(iv) HVR-H1 que comprende la secuencia DI-DIO, en donde DI-DIO GFFITNNYWG (SEQ ID NO:4)

(v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E17, en donde E1-E17 GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO:5); y

(vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F2-F11, en donde F2-F11 MTGSSGYFDF (SEQ ID NO:6).

En una modalidad del polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 1, el polipéptido o anticuerpo comprende al menos una variante HVR, en donde la secuencia HVR variante comprende la modificación de al menos un residuo de al menos una de las secuencias descritas en las SEQ ID Nos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9.

En otra modalidad de la reivindicación 1 o reivindicación 2, la invención comprende como un anticuerpo anti-beta7 o fragmento de unión beta7 de estos que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis regiones hipervariables (HVR) seleccionadas del grupo que consiste de HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, en donde:

(i) HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácido RASESVDTYLH (SEQ ID NO: 1); RASESVDSLLH (SEQ ID NO:7), RASESVDTLLH (SEQ ID NO:8), o RASESVDDLH (SEQ ID NO:9);

(ii) HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácido KYASQSIG (SEQ ID NO:2), RYASQSIG (SEQ ID NO:67, o XYASQSIG (SEQ ID NO:68, en donde X representa cualquier aminoácido),

(iii) HVR-L3 comprende QGNSLPNT (SEQ ID No:3),

(iv) HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácido GFFITNNYWG (SEQ ID No:4),

(v) HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácido GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID No: 5), y

(vi) HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácido MTGSSGYFDF (SEQ ID No:6) o RTGSSGYFDF (SEQ ID No:66) para posiciones relativas F2-F11; o comprende la secuencia de aminoácido FI-FII, en donde FI-FII en donde AMTGSSGYFDF (SEQ ID No:63), ARTGSSGYFDF (SEQ ID No.64), o AQTGSSGYFDF (SEQ ID No:65).

En aún otra modalidad de la reivindicación 1 o cualquiera de las modalidades, la invención comprende un anticuerpo anti-beta7 o un fragmento de unión beta7 de estos que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables(HVR) seleccionadas del grupo que consiste de HVR-L1,, HVR-L2, HVR- L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, en donde:

(i) HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácido A1-A11, en donde A1-A11 es RASESVDTYLH (SEQ ID NO: 1); RASES VDSLLH (SEQ ID NO:7), RASESVDTLLH (SEQ ID NO:8), o RASESVDDLH (SEQ ID NO:9) o una variante de la SEQ ID NOs: 1, 7, 8 o 9 en donde el aminoácido A2 se selecciona del grupo que consiste de A, G, S, T, y V y/o el aminoácido A3 se selecciona del grupo que consiste de S, G, I, K, N, P, Q, R, y T, y/o A4 se selecciona del grupo que consiste de E, V, Q, A, D, G, H, I, K, L, N, y R, y/o el aminoácido A5 se selecciona del grupo que consiste de S, Y, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, y V, y/o el aminoácido A6 se selecciona del grupo que consiste de V, R, I, A, G, K, L, M, y Q, y/o el aminoácido A7 se selecciona del grupo que consiste de D, V, S, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, y T, y/o el aminoácido A8 se selecciona del grupo que consiste de D, G, N, E, T, P y S, y/o el aminoácido A9 se selecciona del grupo que consiste de L, Y, I y M, y/o el aminoácido A10 se selecciona del grupo que consiste de L, A, I, M, y V y/o el aminoácido A11 se selecciona del grupo que consiste de H, Y, F, y S;

(ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido B 1-B8, en donde B 1-B8 es KYASQSIG (SEQ ID No:2), RYASQSIG (SEQ ID No:67, o XYASQSIG (SEQ ID No:68, donde X representa cualquier aminoácido) o una variante de la SEQ ID Nos:2, 67 o 68 en donde el aminoácido B1 se selecciona del grupo que consiste de K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y y X (donde X representa cualquier aminoácido), y/o el aminoácido B4 se selecciona del grupo que consiste de S y D, y/o el aminoácido B5 se selecciona del grupo que consiste de Q y S, y/o el aminoácido B6 se selecciona del grupo que consiste de S, D, L, y R, y/o el aminoácido B7 se selecciona del grupo que consiste de I, V, E, y K;

(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido C1-C9, en donde C1-C9 es QQGNLSPNT (SEQ ID No:3) o una variante de la SEQ ID No:3 en donde el aminoácido C8 se selecciona del grupo que consiste de N, V, W, Y, R, S, T, A, F, H, I, L, M, y Y;

(iv) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido DI-DIO en donde DI-DIO es GFFFTNNYWG (SEQ ID No:4),

(v) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido E1-E17 en donde E1-E17 es GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID No:5), o una variante de la SEQ ID NO:5 en donde el aminoácido E2 se selecciona del grupo que consiste de Y, F, V, y D, y/o el aminoácido E6 se selecciona del grupo que consiste de S y G, y/o el aminoácido E10 se selecciona del grupo que consiste de S y Y, y/o el aminoácido E12 se selecciona del grupo que consiste de N, T, A, y D, y/o el aminoácido 13 se selecciona del grupo que consiste de P, H, D, y A, y/o el aminoácido E15 se selecciona del grupo que consiste de L y V, y/o aminoácido E17 se selecciona del grupo que consiste de S y G, y

(vi) HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácido F2-F11 en donde F2 -FI 1 es MTGSSGYFDF (SEQ ID No:6) o RTGSSGYFDF (SEQ ID No:66); o comprende la secuencia de aminoácido FI-FI 1, en donde FI-FI 1 es AMTGSSGYFDF (SEQ ID No:63), ARTGSSGYFDF (SEQ ID No:64), o AQTGSSGYFDF (SEQ ID No:65), o una variante de la SEQ ID Nos:6, 63, 64, 65, o 66 en donde el aminoácido F2 is R, M, A, E, G, Q, S, y/o el aminoácido FI1 se selecciona del grupo que consiste de F y Y.

En una modalidad de la reivindicación 1 o cualquiera de los antibióticos de la invención, del aminoácido en la posición de la estructura de cadena pesada 71 (de acuerdo con el sistema de numeración Kabat) se selecciona del grupo que consiste de R, A, y T, y/o el aminoácido en la posición de una estructura de cadena pesada 73 (sistema de numeración Kabat) del grupo que consiste de N y T, y/o el aminoácido en la posición de la estructura de cadena pesada 78 (Sistema de numeración Kabat) se selecciona del grupo que consiste de F, A, y L.

En una modalidad de la reivindicación 1 o cualquiera de los anticuerpos de la invención, HVR-L1 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia SEQ ID NO: 1. En una modalidad, HVR- L2 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia SEQ ID NO: 2. En una modalidad, el HVR-L3 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia SEQ ID NO: 3.

En una modalidad, HVR-H1 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de la SEQ ID NO:4. En una modalidad, el HVR-H2 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia SEQ ID NO: 5. En una modalidad, el HVR-H3 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia SEQ ID Nos: 6 o 66 para las posiciones relativas F2-F11 o SEQ ID NOs: 63, 64, o 65 para las posiciones relativas FI-FI 1. En una modalidad, HVR-L1 comprende RASESVDSLLH (SEQ ID No: 7). En una modalidad, HVR-L1 comprende RASESVDTLH (SEQ ID No: 8).

En una modalidad, HVR-L1 comprende RASESVDDLH (SEQ ID No:9). En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende estas secuencias (en combinación como se describe aquí) es humanizado o humano.

En un aspecto, la invención suministra un anticuerpo que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVRs, en donde cada HVR comprende, consiste o consiste esencialmente de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID Nos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, y en donde la SEQ ID No:1, 7, 8 o 9 corresponde al HVR-L1, SEQ ID No:2 corresponde a un HVR-L2, SEQ ID No:3 corresponde a un HVR-L3, SEQ ID No:4 corresponde a un HVR-H1, SEQ ID No:5 corresponde a un HVR-H2, y la SEQ ID Nos:6 corresponde a un HVR-H3. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, en donde cada uno, en orden, comprende la SEQ ID No: 1, 2, 3, 4, 5 y 6. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende el HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR- HI, HVR-H2, y HVR-H3, en donde cada uno, en orden, comprende SEQ ID No: 7, 2, 3, 4, 5 y 6. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, en donde cada uno, en orden, comprende la SEQ ID No: 8, 2, 3, 4, 5 y 6. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR- HI, HVR-H2, y HVR-H3, en donde cada uno, en orden, comprende la SEQ ID No: 9, 2, 3, 4, 5 y 6. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR- HI, HVR-H2, y HVR-H3, en donde cada uno, en orden, comprende la SEQ ID No:9, 2, 3, 4, 5 y 66, o SEQ ID No:9, 2, 3, 4, 5, 63 o SEQ ID No:9, 2, 3, 4, 5, 64 o SEQ ID No:9, 2, 3, 4, 5, y 65 o SEQ ID No:9, 67, 3, 4, 5, 64 o SEQ ID No:9, 68, 3, 4, 5, 64.

1. La variante de los HVRs en un anticuerpo de la invención puede tener modificaciones de uno o más residuos dentro del HVR y los HVR y/o las regiones de estructura pueden ser humanizadas. En las modalidades de la invención en las cuales existe un HVR y/o una modificación de estructura se incluye, sin limitación, las siguientes reivindicaciones potenciales para esta solicitud:

2. El anticuerpo de la reivindicación 1 o cualquiera de sus modalidades en donde A8 es una variante HVR-L1 es S, D o T y A9 es L.

3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o cualquiera de sus modalidades, en donde el anticuerpo es humanizado.

4. El anticuerpo de la reivindicación 1 o cualquiera de sus modalidades, en donde al menos una porción de la secuencia de estructura es una secuencia de estructura de consenso humana.

5. El anticuerpo de la reivindicación 1 o cualquiera de sus modalidades, en donde dichas modificaciones es la sustitución, inserción o supresión.

6. El anticuerpo de la reivindicación 1 o cualquiera de sus modalidades en donde una variante de HR-L1 comprende 1-10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) sustituciones en cualquiera combinación de las siguientes posiciones:

A2 (G, S, T, o V); A3 (G, I, K, N, P, Q, R, o T), A4 (A, D, G, H, I, K, L, N, Q, R, o V), A5 (A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, V, o Y), A6 (A, G, I, K, L, M, Q, o R), A7 (A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, 15 T, o V), A8 (S, D, E, G, P, o N) y A9 (L, I, o M), A10 (A, I, M, o V), y A11 (F, S, o Y).

7. El anticuerpo de la reivindicación 1 o cualquiera de sus modalidades, en donde una variante HVR-L2 comprende 1-4 (1, 2, 3, o 4) sustituciones en cualquiera combinación de las siguientes posiciones: B1 (N), B5 (S), B6 (R o L), y B7 (T, E, K, o V).

8. El anticuerpo de la reivindicación 1 o cualquiera de sus modalidades, en donde una variante HVR-L3 comprende al menos una sustitución en la posición C8 (W, Y, R, S, A, F, H, I, L, M, N, T, o V).

JD

9. El anticuerpo de la reivindicación 1 o cualquiera de sus modalidades, en donde la variante HVR-H2 comprende 1-7 (1,2, 3, 4, 5, 6, o 7) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: E2 (V, D, o F), E6 (G), E10 (Y), E12 (A, D, o T), E13 (D, A, o H), E15 (V), E17 (G).
10. El anticuerpo de la reivindicación 1 o cualquiera de sus modalidades, en donde la variante HVR-H3 comprende en 1 o 2 sustituciones en cualquiera combinación de las siguientes posiciones F2 (A, E, G, Q, R, o S), y F11 (Y).
11. El anticuerpo de la reivindicación 1 o cualquiera de sus modalidades, comprende un HVR-L1 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:7.
12. El anticuerpo de la reivindicación 1 o cualquiera de sus modalidades, que comprende un HVR-L1 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:8.
13. El anticuerpo de la reivindicación 1 o cualquiera de sus modalidades, que comprende HVR-L1 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:9.
14. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13 que comprende una secuencia de estructura de consenso de cadena pesada III del subgrupo humano de cadena pesada que comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78.
15. El anticuerpo de la reivindicación 14, en donde la sustitución es R71 A, N73T y/o N78A.
16. El anticuerpo de la reivindicación 1 o cualquiera de sus modalidades, que comprende un HVR-L3 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:3.
17. El anticuerpo de la reivindicación 1 o cualquiera de sus modalidades, en donde A8 en una variante HVR-L1 es S.
18. El anticuerpo de la reivindicación 1 o cualquiera de sus modalidades, en donde A8 en una variante HVR-L1 es D.

19. El anticuerpo de la reivindicación 1 o cualquiera de sus modalidades, en donde A9 en una variante HVR-L1 es L.
20. El anticuerpo de la reivindicación 1 o cualquiera de sus modalidades, en donde la secuencia de estructura entre la secuencia E1-E17 y FI-FI I es HFR3-1-HFR3-31 y en donde HFR3-6 is A o R, HFR3-8 es N o T, y HFR3-13 es L o A o F.
21. Un anticuerpo anti-beta7 humanizado en donde la afinidad monovalente del anticuerpo al beta7 humano es sustancialmente el mismo que la afinidad monovalente del anticuerpo de rata que comprende una secuencia variable de cadena ligera y de cadena pesada como se describió en la figura 9.
22. Un anticuerpo anti-beta7 humanizado en donde la afinidad monovalente del anticuerpo al beta7 humano es al menos tres veces mayor que la afinidad monovalente de un anticuerpo de rata que comprende una secuencia variable de cadena ligera y de cadena pesada como se describió en la figura 9.
23. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 21 o 22 en donde el anticuerpo de rata se produce mediante la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso ATCC con designación HB-293 del American Type Culture Collection.
24. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 21-23 en donde la afinidad de unión se expresa como un valor Kd.
25. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 21-24 en donde la afinidad de unión se mide mediante Biacore™ o radio inmuno ensayo.
26. El anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende la secuencia de estructura de consenso de cadena ligera del sub grupo κ humano.
27. El anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende la secuencia de estructura de consenso de cadena pesada del sub grupo III humano de cadena pesada.
28. El anticuerpo de la reivindicación 27 en donde la secuencia de estructura comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78.

29. El anticuerpo de la reivindicación 28 dicha sustitución es R71A, N73T y/o N78A o en donde el aminoácido sustituido de la posición 71 es R o A, y/o la sustitución de aminoácido en la posición 78 es N o T, y/o la sustitución de aminoácido en la posición 78 es L o A o F.

30. El anticuerpo de la reivindicación 28 en donde dicha sustitución es L78F o A78F o A78L o L78A.

31. Un método para inhibir la interacción de la subunidad de integrina beta7 humana con una segunda subunidad de integrina y/o un ligando al contactar el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-30 con la segunda subunidad de integrina y/o de ligando.

32. El método de la reivindicación 31, en donde la segunda subunidad de integrina es una subunidad de integrina alfa4, y en donde el ligando es MAdCAM, VCAM o fibroalectina.

33. El método de la reivindicación 32, en donde la subunidad de integrina alfa4 es humana.

34. El método de la reivindicación 33 en donde el ligando es humano.

35. El método de la reivindicación 22, en donde la segunda subunidad de integrina es la subunidad de integrina alfaE, y en donde el ligando es E-cadereina

36. El método de la reivindicación 35, en donde la subunidad de integrina alfa E es humana.

37. El método de la reivindicación 36, en donde el ligando es humano.

38. El método de la reivindicación 31 en donde la inhibición deduce o alivia los síntomas de un trastorno seleccionado de inflamación, asma, y enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Chron, colitis ulcerativa, diabetes, inflamación resultante de trasplante de órgano, trastorno de injerto Vs. Huésped e inflamación asociada con trastornos de alo injerto

53

Las modalidades adicionales de la invención incluyen sin limitación las siguientes: en una modalidad, un HV-L1/ de la SEQ ID NO:1, 7, 8, o 9 o una variante HVR-L1 de la SEQ ID NO:1, 7, 8, o 9 que comprende 1-10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) sustituciones en las posiciones relativas A1-A11, en cualquier combinación de las siguientes posiciones: A2 (A, G, S, T, o V); A3 (S, G, I, K, N, P, Q, R, o T), A4 (E, A, D, G, H, I, K, L, N, Q, R, o V), A5 (S, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, V, o Y), A6 (V, A, G, I, K, L, M, Q, o R), A7 (D, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, T, o V), A8 (T, S, D, E, G, P, or N) y A9 (Y, L, I, o M), A10 (L, A, I, M, o V), y A11 (H, F, S, o Y). En una modalidad, un HVR-L2 es la SEQ ID NO:2, 67, o 68 o una variante HVR-L2 de la SEQ ID NO:2, 67, o 68 cuya variante HVR-L2 comprende 1-4 (1, 2, 3, 4, 4 o 5) sustituciones en las posiciones relativas B1-B8, en cualquier combinación de las siguientes posiciones : B1 (K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y o X (donde X representa cualquier aminoácido), B4 (S), B5 (Q o S), B6 (S, R o L), y B7 (I, T, E, K, o V). En una modalidad, un HVR-L3 es la SEQ ID NO: 3 o una variante HVR-L3 de la SEQ ID NO: 3 que comprende al menos una sustitución en las posiciones relativas C1-C8, tales como las posiciones C8 (W, Y, R, S, A, F, H, I, L, M, N, T, o V). En una modalidad, un HVR-H1 es la SEQ ID NO: 4. En una modalidad, un HVR-H2 es la SEQ ID NO:5 o una variante HVR-H2 de la SEQ ID NO:5 cuya variante HVR-H2 comprende 1-7 (1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7) sustituciones en las posiciones relativas E1-E17 en cualquier combinación de las siguientes posiciones: E2 (Y, V, D, o F), E6 (S o G), E10 (S o Y), E12 (N, A, D, o T), E13 (P, D, A, o H), E15 (L o V), E17 (S o G). En una modalidad, un HVR-H3 es la SEQ ID NOs:6, 63, 64, 65, o 66 o una variante HVR-H3 de la SEQ ID NOs:6, 63, 64, 65, o 66 que comprende las posiciones relativas F1-F11 para la SEQ ID NOs:63, 64, y 65 o las posiciones relativas F2-F11 para la SEQ ID NOs:6 y 66, 1 o 2 sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones : F2 (M, A, E, G, Q, R, o S), y F11 (F o Y). La letra o letras en paréntesis luego de cada posición indican una sustitución ilustrativa (es decir reemplazo) de aminoácido por un consenso u otro aminoácido como sería evidente para un experto en la técnica, adecuadamente de otros aminoácidos como sustitución de aminoácidos den el contexto descrito aquí puede ser rutinariamente evaluadas utilizando técnicas conocidas en el arte y/o descritas aquí.

En una modalidad, un HVR-L1 comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1. En una modalidad, el A8 en una variante HVR-L1 es D. En una modalidad, el A8 en

una variante HVR-L1 es S. En una modalidad, el A9 en una variante HVR-L1 es L. En una modalidad, A8 en una variante HVR-L1 es D y A9 en una variante HVR-L1 es L. En una modalidad, A8 en una variante HVR-L1 es S y A9 en una variante HVR-L1 es L. En algunas modalidades de la invención comprende estas variaciones en el HVR-L1, el HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3 comprende o consiste o consiste esencialmente en orden de la SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, y 6. En algunas modalidades, HVR-H3 comprende o consiste o consiste esencialmente de la SEQ ID NO: 6 o 66 (para las posiciones relativas F2-F11) o la SEQ ID NO: 63 o 64 o 65 (para las posiciones relativas FI-FII).

En una modalidad, A8 en una variante HVR-L1 es I y el A9 en una variante HVR-L1 es L, cuya variante comprende además el HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, cada HVR comprende, consiste o consiste esencialmente de, en orden, la SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, y 6.

En una modalidad, A8, A9, y A10 en una variante HVR-L1 son D, L, y V, respectivamente cuya variante comprende además el HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, cada HVR comprende, consiste de, o consiste esencialmente, en orden, la SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, y 6.

En una modalidad, A8 y A9 en una variante HVR-L1 son N y L, respectivamente, cuya variante comprende además el HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, cada HVR comprende, consiste o consiste esencialmente de, en orden como la SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, y 6.

En una modalidad, A8 y A9 en una variante HVR-L1 es P y L, respectivamente, y B6 y B7 en una variante HVR-L2 es R y T, respectivamente, cuya variante comprende además el HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, cada HVR comprende, consiste de, o consiste esencialmente de, en orden de la SEQ ID NO: 3, 4, 5, y 6.

En una modalidad, A2, A4, A8, A9, y A10 en una variante HVR-L1 son S, D, S, L, y V, respectivamente, cuya variante comprende además el HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, cada HVR comprende, consiste de, o consiste esencialmente de, en orden la, SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, y 6.

En una modalidad, A5 y A9 en una variante HVR-L1 son D y T, respectivamente cuya variante comprende además el HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, cada HVR comprende, consiste de, o consiste esencialmente de, en orden la SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, y 6.

En una modalidad, A5 y A9 en una variante HVR-L1 son N y L, respectivamente, cuya variante comprende además el HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, cada HVR comprende. Consiste de, o consiste esencialmente de, en orden la SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, y 6.

En una modalidad, A9 en una variante HVR-L1 es L respectivamente, cuya variante comprende además el HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, cada HVR comprende. Consiste de, o consiste esencialmente de, en orden la, SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, y 6.

En una modalidad, el anticuerpo o péptido - anti-beta7 de la invención comprende un HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, cada HVR comprende. Consiste de, o consiste esencialmente de, en orden la, SEQ ID NO: 9, 2, 3, 4, 5, y 64. En otra modalidad, cada HVR comprende. Consiste de, o consiste esencialmente de, en orden la, SEQ ID NO: 9, 67, 3, 4, 5, y 64. En otra modalidad, cada HVR comprende. Consiste de, o consiste esencialmente de, en orden la, SEQ ID NO: 9, 68, 3, 4, 5, y 64. En otra modalidad, cada HVR comprende. Consiste de, o consiste esencialmente de, en orden la, SEQ ID NO: 9, 2 o 67 o 68, 3, 4, 5, y 66.

En algunas modalidades, dichas variantes de anticuerpo HVR-L1 variante comprende además HVR-L2, HVR-L3, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, en donde cada uno comprende, en orden, la secuencia descrita en la SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 5, y 6. Donde la variante HVR-L1 A8(P) y A9(L) y HVR-L2 B6(R) y B7(T), en algunas modalidades dicho cada variante HVR-L1, HVR-L2 comprende además HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, en donde cada una comprende, en orden, la secuencia descrita en la SEQ ID NOs: 3, 4, 5, y 6.

En algunas modalidades, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de consenso de estructura de cadena pesada del sub grupo III humano. En una modalidad de estos anticuerpos, la secuencia de consenso de estructura

comprende la sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas modalidades de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En algunas modalidades, estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de consenso de estructura de cadena ligera κ l humano.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende un HVR-L1 que comprende SEQ ID NO:1. En una modalidad, un anticuerpo variante de la invención comprende una variante HVR-L1 en donde A10 es V. En una modalidad, dicho anticuerpo variante comprende además HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en donde cada una comprende, en orden, las secuencia descrita en la SEQ ID NOs:2, 3, 4, 5 y 6. En algunas modalidades, estos anticuerpos comprenden además las secuencias de consenso de estructura de cadena pesada III humana. En una modalidad de estos anticuerpos, la secuencia consenso de estructura comprende la sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas modalidades de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una modalidad de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de consenso de estructura de cadena ligera κ l humana.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende un HVR-L3 que comprende la SEQ ID NO:3. En una modalidad, un anticuerpo variante de la invención comprende una variante HVR-L3 en donde el C8 es L. En una modalidad, dicho anticuerpo variante comprende tradicionalmente un HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en donde cada una comprende, en orden, la secuencia descrita en la SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 5 y 6. En una modalidad un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-L3 en donde C8 es W. En una modalidad, dicho anticuerpo variante comprende además HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en donde cada una comprende, en orden, la secuencia HVR-L1 descrita en la SEQ ID NO:7, 8, o 9. En algunas modalidades, estos anticuerpos, comprenden además una secuencia de consenso de estructura de cadena pesada sub grupo III humana. En una modalidad de estos anticuerpos, la secuencia consenso de estructura comprende la sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas modalidades de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En algunas modalidades de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de estructura de cadena ligera κ l humana.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende un HVR-H3 que comprende la SEQ ID NO:6. En una modalidad, una variante de dicho anticuerpo comprende una variante HVR-H3 en donde FI es Q. En una modalidad, una variante de dicho anticuerpo comprende una variante HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 y HVR-H2, en donde cada una comprende, en orden, la secuencia descrita en la SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, y 5. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-H3 en donde FI es R. En una modalidad, dicho anticuerpo variante comprende además HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 y HVR-H2, en donde cada una comprende, en orden, la secuencia descrita en la SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, y 5. En una modalidad HVR-L1 comprende la SEQ ID NO:7, 8, o 9. En algunas modalidades, estos anticuerpos comprenden además la secuencia de consenso de estructura de cadena pesada de sub grupo III humana.

En una modalidad de estos anticuerpos, la secuencia de consenso de estructura comprende la sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas modalidades de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una modalidad de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de consenso de estructura de cadena ligera kl humana.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende un HVR-L1 que comprende la SEQ ID NO:1. En una modalidad, el anticuerpo comprende una variante HVR-L1 en donde A4 es Q.

En una modalidad, dicho anticuerpo variante comprende además HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en donde cada una comprende, en orden, la secuencia descrita en la SEQ ID NOs:2, 3, 4, 5, y 6. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-L1 en donde A6 es I.

En una modalidad, dicho anticuerpo variante comprende además HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en donde cada una comprende, en orden, la secuencia descrita en la, SEQ ID NOs:2, 3, 4, 5, y 6.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-L1 en donde A7 es S. En una modalidad, dicho anticuerpo variante comprende además HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en donde cada una comprende, en orden, la secuencia descrita en la SEQ ID NOs:2, 3, 4, 5, y 6.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-L1 en donde A8 es D o L. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-L1 en donde A8 es D o L. En una modalidad, dicho anticuerpo variante comprende además HVR-L2, HVR-L3, HVR-1, HVR-H2 y HVR-H2, en donde cada una comprende, en orden, la secuencia descrita en la SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 5, y 6. En algunas modalidades, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de estructura de cadena pesada sub grupo III humana. En una modalidad de estos anticuerpos, la secuencia de consenso de estructura comprende la sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas modalidades de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una modalidad de estos anticuerpos, estas modalidades comprenden además una secuencia consenso de estructura de cadena ligera κ humana.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende un HVR-L2 que comprende la SEQ ID NO: 2. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-L2 en donde B 1 es N. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-L2 en donde B5 es S. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-L2 en donde B6 es L. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-L2 en donde B7 es V. In En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-L2 en donde B7 es E o K. En algunas modalidades, dicho anticuerpo variante comprende además HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en donde cada una comprende, en orden la secuencia descrita en la SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, y 6. En algunas modalidades, HVR-L1 comprenden la SEQ ID NO: 7, 8, o 9. En algunas modalidades, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de consenso de estructura de cadena pesada sub grupo III humana.

En una modalidad de estos anticuerpos, la secuencia consenso de estructura comprende la sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas modalidades de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una modalidad de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de consenso de estructura de cadena ligera κ humana.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende un HVR-L3 que comprende SEQ ID NO:3. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-L3 en donde C8 es W, Y, R, o S. En algunas modalidades, dicho anticuerpo variante comprende además HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en donde cada una comprende, en orden, la secuencia descrita en la SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 5, y 6. En algunas modalidades HVR-L1 comprende la SEQ ID NO:7, 8, o 9. En algunas modalidades, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de consenso de estructura de cadena pesada sub grupo III humana. En alguna modalidad de estos anticuerpos, la secuencia de consenso de estructura comprende la sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas modalidades de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una modalidad de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de consenso de estructura de cadena ligera kl humana.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende un HVR-H2 que comprende la SEQ ID NO:5. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-H2 en donde E2 es F. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-H2 en donde E2 es V o D. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-H2 en donde E6 es G. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-H2 en donde E10 es Y. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-H2 en donde E12 es A, D, o T. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-H2 en donde E13 es D, A, o N. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-H2 en donde E15 es V. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-H2 en donde E17 es G. En algunas modalidades, dicho anticuerpo variante comprende además HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 y HVR-H3, en donde cada uno comprende, en orden, la secuencia descrita en la SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, y 6. En algunas modalidades, HVR-L1 comprende la SEQ ID NO:7, 8, o 9. En algunas modalidades, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de estructura de cadena pesada de sub grupo III humana. En una modalidad de estos anticuerpos, la secuencia de consenso de estructura comprende la sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas modalidades de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En alguna modalidad de estos anticuerpos,

40

estos anticuerpos comprenden además una secuencia de consenso de estructura de cadena ligera kl humana.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende un HVR-H3 que comprende la SEQ ID NO:6. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una variante HVR-H3 en donde FI 1 es Y. En algunas modalidades, dicho anticuerpo variante comprende además HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 y HVR-H3, en donde cada una comprende, en orden, la secuencia descrita en la SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, y 6. En algunas modalidades, HVR-L1 comprende la SEQ ID NO:7, 8, o 9. En algunas modalidades estos anticuerpos comprenden además una secuencia de consenso de estructura de cadena pesada de sub grupo III humana. En una modalidad de estos anticuerpos, la secuencia de consenso de estructura comprende la sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas modalidades de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En alguna modalidad de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de consenso de estructura de cadena ligera kl humana.

En algunas modalidades, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de consenso de estructura de cadena pesada sub grupo III humana. En una modalidad de estos anticuerpos, la secuencia de consenso de estructura comprende sustitución en la posición 71, 73 y/o. en algunas modalidades estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es D y/o 78 es A. en una modalidad de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de consenso de estructura de cadena ligera kl humana.

Un agente terapéutico para uso en un sujeto huésped preferiblemente elicitaba poca o ninguna respuesta inmunogénica contra el agente en dicho sujeto. En una modalidad, la invención suministra tal agente. Por ejemplo, en una modalidad, la invención suministra un anticuerpo humanizado que elifica y/o se espera que elifique una respuesta de anticuerpo anti roedor humana (tal como la respuesta de anti ratón o anti rata) o una respuesta antihumana a un nivel sustancialmente reducido comparado con el anticuerpo que comprende la secuencia que comprende la SEQ ID NOs: 10 y/o 11 (Figs. 1A y 1B) i la SEQ ID NOs: 12 y/o 13 (Figs. 9A y 9B que describe las secuencias de aminoácido Fib504 anti ratón de rata) en un sujeto huésped. En otro ejemplo la invención suministra un anticuerpo humanizado que elicitaba y/o se espera que elicitara una respuesta de anti roedor no

67

humana (tal como la anti ratón humana (HAMA) anti ratón humana) o antihumana humana.

Un anticuerpo humanizado de la invención puede comprender una o más secuencias humanas y/o de región no hipervariable de consenso humano. Se espera elicitare una respuesta de anticuerpo anti roedor humano (tales como el anti ratón humano (HAMA) o anti ratón humano) o anti humano humano (HAHA).

Un anticuerpo humanizado de la invención puede comprender uno o más secuencias humanas o de región no hipervariable de consenso humana (por ejemplo estructuras) en su dominio variable de cadena pesada y/o ligera. En algunas modalidades, una o más modificaciones adicionales están frecuentes dentro de las secuencias humanas y/o de región hipervariable de consenso humano. En una modalidad, el dominio de variable de cadena pesada de un anticuerpo de la invención comprende una secuencia de estructura de consenso humana, que en una modalidad es la secuencia de estructura de consenso del sub grupo III. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una secuencia de estructura de consenso su grupo III variante modificada en al menos una posición de aminoácido. Por ejemplo, en una modalidad, una secuencia de estructura de consenso de sub grupo III variante puede comprender una sustitución en una o más de las posiciones 71, 73, 78 y/o 94. En una modalidad, dichas sustituciones R71A, N73T, L78A, y/o R94M, en cualquier combinación de estas.

Como es conocido en la técnica, y se describe con mayor detalle adelante, la posición / límite del aminoácido que delinea una región hipervariable de un anticuerpo, puede variar, dependiendo del contexto de las varias definiciones conocidas en la técnica (como se describen adelante). Algunas posiciones dentro de un dominio variable pueden visualizar como posiciones hipervariables híbridas porque estas posiciones pueden ser consideradas por estar dentro de una región hipervariable bajo un conjunto de criterios aunque estando considerados por fuera de la región hipervariable bajo un conjunto diferente de criterios. Como es conocido en la técnica, y como se describe con mayor detalle adelante, la posición / límite del aminoácido que delinea una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y de las varias definiciones conocidas en la técnica (como se describe adelante). Algunas posiciones dentro del dominio

variable se pueden visualizar como posiciones hipervariables híbridas porque estas posiciones pueden ser consideradas dentro de una región hipervariable y bajo un conjunto de criterios mientras que pueden ser consideradas por fuera de una región hipervariable bajo otro conjunto de criterios. Una o más de estas posiciones se puede encontrar en las regiones hipervariables extendidas (como se define adicionalmente adelante). La invención suministra anticuerpo que comprenden modificaciones en estas posiciones hipervariables híbridas. En una modalidad, estas posiciones hipervariables híbridas incluyen una o más posiciones 26-30, 33-35B, 47-49, 49, 57- 65, 93, 94 y 102 en un dominio variable de cadena pesada. En una modalidad, estas posiciones hipervariables híbridas incluyen una o más posiciones 24-29, 35-36, 46-49, 49, 56 y 97 en el dominio variable de cadena ligera. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una secuencia de estructura de consenso del sub grupo humano variante modificado en una o más posiciones hipervariables. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de estructura de consenso sub grupo III humano variante modificado en una o más posiciones 28-35, 49, 50, 52a, 53, 54, 58-61, 63, 65, 94 y 102. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución T28F, F29I, S30T, S31N, Y32N, A33Y, M34W, y S35G. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución S49G, en una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución V50F o V50D o V50Y. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución G53Y. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución G54S. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución Y58S. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución A60N o A60D o A60T. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución D61P o D61A o D61H. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución B63L. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución G65S. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución R94M. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución R94A o R94B o R94G o R94Q o R94S. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución G95T. En una modalidad, el anticuerpo comprende una o más de las sustituciones en las posiciones 28-35, 49, 50, 52a, 53, 54, 58-61, 63, 65, 94 y 102 y además comprende una o más de las sustituciones en las posiciones R71A o N73T o L78A o L78F. En una modalidad el anticuerpo comprende una sustitución Y102F. Esta se puede ver como referencia a la figura

1b que estas sustituciones están en el HVR-H1, HVR-H2, y/o HVR-H3 de la cadena pesada.

En una modalidad, el anticuerpo de la invención comprende un dominio variables de cadena ligera y comprende una secuencia de estructura de consenso sub grupo I humano variante modificado en una o más posiciones 27, 29-31, 33, 34, 49, 50, 53-55, 91 y 96. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución Q27E. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución 129B. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución S30D. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución N31T o N31S o N31D. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución Y32L. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución A34H. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución Y49K. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución A50Y. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución S53Q. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución R54S. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución E55I o E55E. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución Y91G. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución W96N o W96L. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución A25S. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución A25G, S, T o E. En una modalidad, el anticuerpo comprende una modificación seleccionada de uno o más de los siguientes grupos de sustituciones. Por ejemplo, En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución S26AG, I, K, N, P, Q o T. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución Q27AE, A, D, G, H, I, L, M, Q, R o V. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución S28A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, V, o Y. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución I29A, B, A, G; K; L, M; Q o R. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución S30 a D; A; E; G, H; I; N; P, S, T o V. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución N31 a D, T, E, o G. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución Y32 a L, I o M. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución L33 a A, I, M o V. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución A34 a H, F, Y o S. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución Y49 a K o N. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución A50Y. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución S53Q. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución L54S. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución E55 a V, I o K. En una modalidad, el anticuerpo comprende una

sustitución Y91G. En una modalidad, el anticuerpo comprende una sustitución W96 a N, L, W, Y, R, S, A, F, H, I, M, N, R, S, T, V o Y. Esto se puede ver como referencia a la Figura . 1A que estas sustituciones están en el HVR-L1, HVR-L2, y/o HVR-L3 de la cadena ligera.

Un anticuerpo de la invención puede comprender cualquiera de las secuencias humanas o de estructura de cadena ligera de consenso humano, siempre y cuando el anticuerpo exhiba las características biológicas deseadas (por ejemplo la afinidad de unión deseada). En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende al menos una producción (o todas) de las secuencias de estructura de la cadena ligera kl humana. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende al menos una porción (o todas) de la secuencia de consenso de estructura del sub grupo I kl humana.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada y/o ligera que comprende las secuencias de estructura descritas en la SEQ ID NOS: 34-41 y en las figuras 1, 7 y 8, siempre y cuando las posiciones 49 de la cadena ligera y 94 de la cadena pesada estén incluidas en los HVRs extendidos, y siempre y cuando dicha posición 49 sea K y dicha posición 94 sea preferiblemente pero no necesariamente N y pueda ser R.

Los antagonistas de la invención se pueden utilizar para modular uno o más aspectos de efectos asociados a beta7, que incluyen pero no están limitados a la asociación con la subunidad de integrina alfa4, la asociación con la subunidad de integrina alfaE, que se une a la integrina alfa4 beta7 MAdCAM, VCAM-1 o fibronectina y que se une de la integrina alfaEbeta7 a E-caderina. Estos efectos se pueden modular por cualquier mecanismo biológicamente relevante, que incluye la errupción de la unión de ligando a la subunidad beta7 o a la integrina dimérica alfa4beta7 o alfaEbeta, y/o al irrumpir la asociación entre las subunidades de integrina alfa y beta de tal forma de se inhiba la formación de la integrina dimérica. De acierto con esto, en una modalidad de la invención suministra un anticuerpo antagonista beta7 que inhibe la unión del alfa4 al beta7. En una modalidad, el anticuerpo antagonista beta7 de la invención irrumpie la unión del alfa4beta7 al MAdCAM. En una modalidad, un anticuerpo antagonista beta7 de la invención irrumpie la unión del alfa4beta7 al VCAM-1. En una modalidad, el anticuerpo antagonista beta7 de la invención irrumpie la unión del alfa4beta7 a la

fibroneptina. En una modalidad, el anticuerpo antagonista beta7 de la invención irrumpe la unión del beta7 al alfaE. En una modalidad, el anticuerpo antagonista beta7 de la invención irrumpe la unión de la integrina alfaEbeta7 a la E-caderina. La interferencia puede ser directa o indirecta. Por ejemplo un anticuerpo antagonista beta7 se puede unir al beta7 dentro de una secuencia de la región de dimerización alfa4beta7 o alfaEbeta7, y de esta manera inhibir la interacción de las subunidades de integrina y la formación de un dímero de integrina. En un ejemplo adicional, un anticuerpo antagonista beta7 se puede unir a una secuencia dentro del dominio de unión de ligando de la subunidad beta7 y de esta manera inhibir la interacción de dicho dominio de unión con su compañero de unión (tal como la fibroneptina, VCAM, y/o MAdCAM para la integrina alfa4beta7; o la -cadherina para la integrina alfaEbeta7). En otro ejemplo, el anticuerpo antagonista beta7 se puede unir a una secuencia que no está dentro del dominio de dimerización de la subunidad de integrina o un dominio de unión de ligando, pero en donde dicho anticuerpo antagonista beta7 que une los resultados en la erupción de la capacidad del dominio beta7 a interactuar con su compañero de unión (tal como una subunidad de integrina alfa4 o alfaE y/o un ligando tal como la fibroneptina, VCAM, MAdCAM, o E-cadereina). En una modalidad, un anticuerpo antagonista de la invención se une al beta7 (por ejemplo, el dominio extra celular) de tal forma que la dimerización beta7 con la subunidad alfa4 o alfaE es irrumpe. En una modalidad, el anticuerpo antagonista de la invención se une al beta7 de tal forma que la capacidad del beta7 y/o la integrina alfa4beta7 y/o alfaEbeta7 a unirse a su respectivo ligando o ligandos se irrumpe. Por ejemplo, en una modalidad, la invención suministra un anticuerpo antagonista que luego de unirse a la molécula beta7 inhibe la dimerización de dicha molécula. En una modalidad, el anticuerpo antagonista beta7 de la invención específicamente se une a una secuencia en el ligando del dominio de unión del beta7. En una modalidad, el anticuerpo antagonista beta7 de la invención se une específicamente a una secuencia del dominio de unión de ligando del beta7 de tal forma que la unión del ligando (es decir la fibroneptina, VCAM, y/o MAdCAM) a la integrina alfa4beta7 se irrumpe. En una modalidad, el anticuerpo antagonista beta7 de la invención se une específicamente e una secuencia en el dominio de guión de ligando del beta7 de tal forma que la unión de ligando (es decir E-cadereina) a la integrina alfaEbeta7 es irrumpe.

En una modalidad, el anticuerpo antagonista de la invención irrumpe la dimerización beta7 que comprende la hetero dimerización (la dimerización beta 7 con una molécula de subunidad de integrina alfa4 o alfaE).

En una modalidad, el anticuerpo antagonista de la invención se une a un epítipo sobre la subunidad de integrina beta7 que mapea a los aminoácidos 172-237. En otra modalidad, el anticuerpo antagonista de la invención se une al mismo epítipo sobre la integrina beta7 que es sustancialmente el mismo epítipo que el Fib504.64 (ATCC HB-293). La determinación del epítipo que se une mediante sus técnicas estándar que incluye sin limitación al margen de unión de competición.

En un aspecto, la invención suministra un anticuerpo que comprende una combinación de uno, dos, tres, cuatro, cinco, o todas las secuencias HVR descritas en la tabla de sustitución de aminoácido en la figura 3.

Un agente terapéutico para uso en un sujeto huésped preferiblemente elicit poco o ninguna respuesta inmunogénica contra el agente en dicho sujeto. En otra modalidad, la invención suministra tal agente. Por ejemplo, en una modalidad, la invención suministra un anticuerpo humanizado que elicit y/o se espera que elicit una respuesta de anticuerpo anti rata humana o anti ratón humano o anti humano humano a un nivel sustancialmente reducido comparado con el anticuerpo que comprende la secuencia de la SEQ ED NOS: 10, 11, 12 y/o SEQ ID NO: 13 (Fib504 anti ratón de rata (ATCC HB-293), FIGS. 1 y 9) en un sujeto huésped. En otro ejemplo, la invención suministra un anticuerpo humanizado que elicit y/o se espera que elicit una respuesta de anticuerpo anti ratón humana, anti rata humana, o anti humano humano.

Un anticuerpo humanizado de la invención puede comprender una o más secuencias de regiones humanas o no hipervariables de consenso humano en su dominio variable de cadena pesada y/o ligera. En algunas modalidades, una o más modificaciones adicionales están presentes dentro de las secuencias de región no hipervariable de las secuencias de región humana y/o no hipervariables de consenso humano. En una modalidad, el dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo de la invención comprende una secuencia de estructura de consenso humana, la cual en una modalidad es la secuencia de estructura de

consenso el sub grupo III. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende una secuencia de estructura de consenso del sub grupo III variante modificada en al menos una posición de aminoácido. Por ejemplo, en una modalidad, la secuencia de estructura de consenso del sub grupo III variante puede comprender una sustitución en una o más posiciones 71,73, 78 y/o 94, aunque la posición 94 es parte de una región hipervariable de cadena pesada extendida H3 de la presente invención. En una modalidad, dicha sustitución es R71A, N73T, N78A, y/o R94M, en cualquier combinación de estas.

Un anticuerpo de la invención puede comprender cualquiera de las secuencias humanas o de estructura de cadena ligera de consenso humano, siempre y cuando el anticuerpo exhiba las características biológicas deseadas (por ejemplo una filial de unión deseada). En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende al menos una posición (o todas) de las secuencias de estructura de la cadena ligera kl humana. En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende al menos una posición (o todas) de la secuencia del consenso de estructura de sub grupo I kl humano.

Los antagonistas de la invención se pueden utilizar para modular uno o más aspectos de los efectos asociados beta7. Por ejemplo, un anticuerpo antagonista beta7 se puede unir a beta7 dentro de una secuencia de los efectos asociados. Por ejemplo, un anticuerpo antagonista beta7 se puede unir al beta7 dentro de una secuencia de la región de dimerización alfa4beta7 o alfaEbeta7, y de esta manera inhibir la interacción de las subunidades de integrina y la formación de un dímero de integrina. En un ejemplo adicional, un anticuerpo antagonista beta7 puede unirse a una secuencia dentro del dominio de unión de ligando de la subunidad beta7 y de esta manera inhibir la interacción de dicho dominio de unión con su compañero de unión (tal como fibroneptina, VCAM, y/o MAdCAM, para la integrina alfa4beta7; o la integrina E-cadereina para el alfaEbeta7). En otro ejemplo, el anticuerpo antagonista beta7 se puede unir a una secuencia que no está dentro del dominio de dimerización de la subunidad integrina o el dominio de unión de ligando, pero en donde dicha unión de anticuerpo antagonista beta7 da como resultado la irrupción de la capacidad del dominio beta7 para interactuar con su compañero (tal como una subunidad de integrina alfa4 o alfaE y/o un ligando tal como fibroneptina, VCAM, MAdCAM, o E-cadereina). En una modalidad, un antagonista de anticuerpo de la invención se une al beta (por ejemplo, el dominio

extra celular,) de tal forma que la dimerización beta7 con la subunidad alfa4 o alfaE es irrupida. En una modalidad, un anticuerpo antagonista de la invención se une a beta7 de tal forma que la capacidad de la integrina beta7 y/o una alfa4beta7 y/o una alfaEbeta7 a unirse a sus respectivos ligando o ligandos se interrumpe. Por ejemplo, en una modalidad, la invención suministra un anticuerpo antagonista que luego de unirse a una molécula beta7 inhibe la dimerización de dicha molécula. En una modalidad, un anticuerpo antagonista beta7 de la invención se une específicamente a una secuencia en el dominio de unión del ligando de beta7. En una modalidad, el anticuerpo antagonista beta7 de la invención se une específicamente a una secuencia en el dominio de unión del ligando de beta7 de tal forma que la unión del ligando (es decir, la fibronectina, VCAM, y/o MAdCAM) a la integrina alfa4beta7 se rompe. En una modalidad, un anticuerpo antagonista beta7 de la invención, se une específicamente a una secuencia en el dominio de unión del ligando de beta7 de tal forma que la unión del ligando (es decir E-caderina) a la integrina alfaEbeta7 se rompe.

En una modalidad, un anticuerpo antagonista de la invención rompe la dimerización beta7 que comprende la heterodimerización (es decir, la dimerización beta7 con una molécula subunitaria de integrina alfa4 o alfaE).

En algunos casos, puede ser ventajoso tener un anticuerpo antagonista beta7 que no interfiera la unión de un ligando (tal como fibronectina, VCAM, MAdCAM, o alfaE) a la subunidad beta7 como parte de una integrina o ahora integrina alfa4beta7 o una integrina alfaEbeta7, como un dímero. De acuerdo con esto, en una modalidad, la invención suministra un anticuerpo que no se une a una fibronectina, VCAM, MAdCAM, y o un sitio de E-caderina, sobre beta7, pero un su lugar, inhibe la interacción entre la subunidad beta7 y la subunidad alfa (de tal forma que la subunidad de integrina alfa4 o alfaE) de tal forma que se evita la formación de la integrina biológicamente activa. En un ejemplo, un anticuerpo antagonista de la invención, se puede utilizar en conjunto con no más de otros antagonistas, en donde los antagonistas son disparados a procesos diferentes y/o funciones dentro del eje de la integrina beta7. Así, en una modalidad, el anticuerpo antagonista beta7 de la invención se une a un epítipo del beta7 diferente del epítipo unido por otro beta7 o un antagonista de integrina alfa/beta, (tal como un anticuerpo alfa4beta7, que incluye anticuerpo monoclonal o un anticuerpo, tal como un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo monoclonal derivado de y/o que

tiene la misma o efectivamente las mismas características de unión o especificidad que un anticuerpo derivado que un anticuerpo de murino.

En una modalidad, la invención suministra un anticuerpo antagonista beta7 que rompe la multimerización beta7-alfa4 o alfaE en la respectiva integrina así como también la unión del ligando. Por ejemplo, un anticuerpo antagonista de la invención que inhibe la dimerización beta7 con la subunidad de integrina alfa4 o alfaE puede comprender además en capacidad competir con el ligando para unirse al beta7 o al número de integrina (por ejemplo puede interferir con la unión de fibronectina, VCAM y/o MAdCAM a beta y/o alfa4beta7; o puede interferir con la unión de E-cadherina a beta7 o alfaEbata7.

En una modalidad del anticuerpo antagonista beta7 de la invención, la unión del antagonista a beta7 y mide la adhesión unión celular activada por la unión del ligando. En otra modalidad de un anticuerpo antagonista beta7 de la invención, que une al antagonista a beta7 en una célula, inhibe el reclutamiento de la célula a las células y/o tejido en el cuál se expresa la integridad que contiene beta 7.

En una modalidad, un anticuerpo antagonista beta7 de la invención, se une específicamente a al menos una porción de los aminoácidos 176-250 (ver opcionalmente los aminoácidos 176-237) del dominio extracelular beta7 (Tidswell, M. et al. (1997) J. Immunol. 159: 1497-1505), o una variante de éste, y reduce o bloquea la unión de los ligandos MAdCAM, VCAM-1, fibronectina y/o E-caderina. En modalidad, tal bloqueo de la unión del ligando rompe, reduce y/o evita la adhesión de una célula que expresa el ligando a la célula que expresa el ligando que contiene beta7. En una modalidad, un anticuerpo antagonista de la invención se une específicamente a una secuencia de aminoácido de beta7 que comprende los residuos 176-237. En una modalidad, un anticuerpo antagonista de la invención, se une específicamente a una secuencia de aminoácido de beta7 que comprende los residuos 176-237. En una modalidad un anticuerpo antagonista de la invención, se une específicamente a un epítipo conformacional formado por parte o todo de al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste de los residuos 176-237 de beta7. En una modalidad, un anticuerpo antagonista de la invención se ue específicamente a una secuencia de aminoácido que tiene al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al monees 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99% de identidad o similitud de

secuencia con la secuencia de aminoácido de los residuos 176-237, o los residuos 176-250 del beta7 humano. En una modalidad, el antagonista de anticuerpo anti-beta7 de la invención se une al mismo epítipo que el anticuerpo anti-beta7 Fib504 producido por el hibridoma ATCC HB-293. En un aspecto.

La invención suministra composiciones que comprenden uno o más anticuerpos antagonistas de la invención y un vehículo. En una modalidad, el vehículo es farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención suministra ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo antagonista beta7 de la invención.

En un aspecto, la invención suministra vectores que comprenden un ácido nucleico de la invención.

Un vector puede ser de cualquier tipo, o por ejemplo un vector recombinante tal como un vector de expresión. Cualquiera de una variedad de células huéspedes se puede utilizar. En una modalidad, la célula huésped es una célula procariótica, por ejemplo, E. coli. En una modalidad, una célula huésped es una célula eucariótica, por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO).

En un aspecto, la invención suministra métodos para elaborar un antagonista de la invención. Por ejemplo, la invención suministra un método para elaborar un anticuerpo antagonista beta7 (el cual, como se define aquí incluye la longitud completa o fragmentos de éstos) dicho método comprende expresar en una célula huésped adecuada a un vector recombinante de la invención que codifica dicho anticuerpo (o un fragmento de éste), y recupera dicho anticuerpo.

En un aspecto, la invención suministra un artículo de manufactura que comprende un recipiente; y una composición contenida dentro del recipiente, en donde la composición comprende uno o más anticuerpos antagonistas beta7 de la invención. En una modalidad, la composición comprende un ácido nucleico de la invención. En una modalidad una composición que comprende un anticuerpo antagonista además comprende un vehículo el cual en algunas modalidades es farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, un artículo de elaboración de la

invención comprende además instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, el anticuerpo antagonista al sujeto).

En un aspecto, la invención suministra un kit que comprende un primer recipiente que comprende una composición que comprende uno o más anticuerpos antagonistas beta7 de la invención; y un segundo recipiente que comprende un amortiguador. En una modalidad el amortiguador es farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, una composición que comprende un anticuerpo antagonista, comprende además un vehículo, que en algunas modalidades es farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, un kit comprende además, instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, el anticuerpo antagonista) a un sujeto.

Las integrinas beta7 y sus ligandos, son variadamente expresados en estados de enfermedad [la expresión del MAdCAM-1 sobre el endotelio del intestino se incrementa en sitios de inflamación de mucosa en pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino (UC y CD) y una lámina propia colónica de pacientes UC y CD, también muestra células CD3+ y a4b7+ incrementado comparados con los controles IBS (ver Souza H., et al., Gut 45:856 (1999)). La expresión MAdCAM-1 se observó que estaba asociada con una inflamación en el tracto portal en enfermedades del hígado y puede ser importante en el reclutamiento de alfa4beta7 más linfocitos, al hígado durante la inflamación. (Hillan, K., et al., Liver. 19(6):509-18 (1999)) MAdCAM-1 sobre vasos hepáticos soporta la adhesión e linfocitos a4b7+ de pacientes con IBD y colangitis esclerosante primaria. La adhesión fue medida por el anti-MAdCAM-1, anti-alfa4beta7 fue inhibida por los anticuerpos anti-MAdCAM-1, anti-alfa4beta7 o anti-alfa4. (Grant AJ. et al., Hepatology. 33(5): 1065-72 (2001)). El MAdCAM-1, VCAM-1 y E-cadherina se expresa en células endoteliales del cerebro y/o sobre microvasos en el sistema nervioso central inflamado. Las integrinas beta7 contribuyen a la enfermedad desmielinizante del SNC (Kanwar et al., J. Neuroimmunology 103, 146 (2000)). La expresión de alfa4beta7 fue significativamente superior en el LPL del CD que en los controles o pacientes con UC (Oshitani, N. et al., International Journal of Molecule Medicine 12, 715-719 (2003)). Los pacientes IEL de CD pueden ser estimulados crónicamente y el reclutamiento de la periferia ((Meresse, B., et al., Human Immunology, 62, 694-700 (2001)). En la enfermedad del hígado humano las células T alfaEbeta7 (CD4+ y CD8+) son acumuladas preferencialmente en los

hígados humanos donde la E-cadherina se expresa sobre los hepatocitos y el epitelio del ducto biliar (Shimizu, Y., et al., *Journal of Hepatology* 39, 918-924 (2003)). En pancreatitis crónica las células T CD8+ más CD103+, análogas a los linfocitos intraepiteliales del intestino, infiltran el páncreas en pancreatitis crónica ((Matthias, P., et al., *Am J Gastroenterol* 93:2141-2147 (1998)). La regulación positiva del alfaEbeta7 se encontró en pacientes eritematosos de lupus sistémico con involucramiento epitelial específico (Pang et al., *Arthritis & Rheumatism* 41:1456-1463 (1998)). En el síndrome de Sjogren, las células T CD8+alfaEbeta7 se adhieren y mata las células epiteliales acinara al inducir apoptosis (Kroneld et al., *Scand J Rheumatol* 27:215- 218, 1998). La integrina alfa4beta7 y alfaEbeta7 juega un papel en el epidermotropismo de la célula T, durante la inflamación de la piel y contribuye al rechazo de aloinjerto de piel (Sun et al., *Transplantation* 74, 1202, 2002). Teraki y Shiohara mostraron expresión preferencial de la integrina aEc7 sobre las células T CD8+ en epidermis consoriacis (Teraki and Shiohara, *Br. J. Dermatology* 147, 1118, 2002). Los linfocitos T de espoto son activados por los IEL (CD69+CD103+) es asma, COPD y sujetos normales (Leckie et. al., *Thorax* 58, 23, 2003). CD103+ (aEb7+) el CTL se acumula con el epitelio de injerto durante, el rechazo del renal clínico ((Hadley et al., *Transplantation* 72, 1548, 2001). Así, en un aspecto, la invención suministra el uso de un anticuerpo beta7 antabolista beta7 para inhibir en la interacción integrada y obligando beta7, para reducir o aliviar la enfermedad, tal como una o más de los estados de enfermedad anteriormente descritos. En una modalidad, el anticuerpo de la invención se utiliza en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como enfermedad inflamatoria que incluye sin limitación enfermedad inflamatoria del intestino (tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa), enfermedad inflamatoria del hígado, inflamación del SNC, pancreatitis crónica, lupus sistémico eritematoso, síndrome de Sjogren, soriasis e inflamación de la piel, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad pulmonar intersticial, alergia, enfermedad auto inmune, rechazo de transplante, rechazo de injerto renal, enfermedad de injerto versus huésped, diabetes y cáncer.

En un aspecto, la invención suministra el uso de un ácido nucleico de la invención, en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un trastorno inmune (tal como auto inmune o inflamatorio) sin limitación, y de la enfermedad inflamatoria del intestino

(tal como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerativa) y la reacción alérgica (tal como los trastornos del sistema respiratorio, la piel, articulaciones, asma alérgico, y otros órganos afectados por la reacción alérgica mediada por una integrina que contiene beta7).

En un aspecto, la invención suministra el uso de un vector de expresión de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un trastorno inmune (tal como auto inmune o inflamatorio) sin limitación, la enfermedad inflamatoria del intestino (tal como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerativa), y la reacción alérgica (tal como los trastornos del sistema respiratorio, la piel, las articulaciones, y otros órganos afectados por la reacción alérgica mediada por la integrina que contiene beta7).

En un aspecto, la invención suministra el uso de una célula huésped de la invención, en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un trastorno inmune (tal como auto inmune o inflamatorio) que incluye sin limitación, enfermedad inflamatoria del intestino (tal como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerativa), y la reacción alérgica (tal como el trastorno del sistema respiratorio, la piel, articulaciones, y otros órganos afectados por la reacción alérgica mediada por la integrina que contiene beta7).

En un aspecto, la invención suministra el uso de un artículo de elaboración de manufactura de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un trastorno inmune (tal como auto inmune, o inflamatorio), que incluye sin limitación, enfermedad inflamatoria del intestino (tal como la enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa), y reacciones alérgicas (tales como los trastornos del sistema respiratorio, piel, articulaciones y otros órganos afligidos por reacción alérgica mediada por integrina que contiene beta7).

En un aspecto, la invención suministra el uso de un kit de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un trastorno inmune (tal como auto inmune, o inflamatorio), que incluye sin limitación, enfermedad inflamatoria del intestino (tal

como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerativa), y la reacción alérgica (tales como los trastornos del sistema respiratorio, piel, articulaciones y otros órganos afectados por la reacción alérgica mediada por integrina que contiene beta7).

La invención suministra métodos y composiciones útiles para la modulación de estados enfermedad que tiene que ver con la desregulación del proceso de interacción célula-célula mediado por integrina beta7. Las integrinas beta7, están involucradas en múltiples funciones biológicas y fisiológicas, que incluyen, por ejemplo, trastornos inflamatorios y reacciones alérgicas. Así, en un aspecto, la invención suministra un método que comprende administrar a un sujeto un anticuerpo de la invención.

En un aspecto, la invención suministra un método para inhibir la inflamación mediada por integrina beta7, dicho método comprende poner en contacto una célula o tejido con una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención, por medio del cual la interacción del linfocito o la célula B, y que se une a una célula que expresa integrina beta7 se inhibe.

En un aspecto, la invención suministra un método, para tratar una condición patológica asociada con la desregulación de la integrina beta7 que se unen un sujeto. Dicho método comprender administrar al sujeto una cantidad efectiva de anticuerpo de la invención, por medio de la cuál, dicha condición es tratada.

En un aspecto, la invención suministra un método, para inhibir la unión de un linfocito que expresa un ligando de integrina beta7 (tal como una célula que expresa MAdCAM, VCA,, E-cadherina o fibronectina) a una célula que expresa la integrina beta7 (tal como integrina alfa4beta7 o alfaEbeta7), dicho método comprende poner en contacto dicha célula con un anticuerpo de la invención, inhibiendo de ésta manera, o evitando la adición de las células. Y originando una reducción de la reacción inflamatoria.

En un aspecto, la invención suministra un método para tratar o prevenir, un trastorno inflamatorio asociado con la expresión incrementada o la actividad de la integrina beta7, o la interacción incrementada entre una integrina beta7 sobre una célula, y un receptor de integrina beta7 sobre otra célula, dicho método comprende administrar a un sujeto necesitado de tal tratamiento una cantidad efectiva de un

28

anticuerpo de la invención, tratando de ésta manera efectivamente o previniendo dicho trastorno inflamatorio. En una modalidad, dicho trastorno inflamatorio es enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). En otra modalidad, dicho trastorno inflamatorio es una reacción alérgica.

Los métodos de la invención se pueden utilizar para afectar cualquier estado patológico adecuado, como por ejemplo, células, y/o tejidos asociados con la desregulación de la senda de unión de la integrina beta7. Las integrinas beta7, son expresadas primariamente sobre leucocitos (Tidswell, M. et al. (1997) supra). En una modalidad, un leucocito es apuntado en un método de la invención que se evita de la unión a una célula que expresa un ligando, de una integrina beta7. Por ejemplo, un linfocito intra-epitelial, que expresa E-cadherina se evita, de acuerdo con la invención, de la unión de una célula que expresa alfaEbeta7 por medio de un anticuerpo anti-beta7 antagonista. Las células que expresan MAdCAM, VCAM-1 o fibronectina, se evitan mediante un anticuerpo anti-beta7 antagonista de la invención de la unión de un leucocito que expresa alfa4beta7.

Los métodos de la invención, pueden además comprender en las etapas de tratamiento adicionales. Por ejemplo, en una modalidad, el método comprende además una etapa en donde la célula blanco y/o el tejido (por ejemplo, una célula endotelial del recubrimiento intestinal) expone a un anticuerpo anti-TNF o un agente terapéutico de molécula pequeña que incluye sin limitación los compuestos 5-ASA (que incluyen sin limitación).

Como se describió aquí, las integrinas beta7, median procesos biológicos importantes, cuyas desregulaciones conducen a numerosas condiciones patológicas. De acuerdo con esto, es una modalidad o método de la invención, la célula que apuntada (por ejemplo, una célula endotelial) es una en la cual la adhesión de una célula que expresa un ligando de integrina beta7 de la integrina beta7 (donde la célula, puede ser sin limitación, un linfocito, y el ligando puede ser MAdCAM, VCAM, o E-caderina), se rompe, inhibe, o evita comparado con las células en la ausencia de los antagonistas anti-beta7 de la invención. En una modalidad, un método de la dimensión inhibe el retorno al linfocito, y viviendo de ésta manera la inflamación del sitio de la expresión de integrina beta7. Por ejemplo, el contacto con un antagonista de la invención, puede resultaren la

incapacidad de la célula a adherirse a una célula que expresa un ligando de una integrina beta7.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS PROBLEMAS

Las figs. 1A y 1B describen el alineamiento de las secuencias de la luz variable y las cadenas pesadas para lo siguiente: la secuencia de consenso Kapa 1, del subgrupo mano de cadena ligera (fig. 1A SEQ ID NO: 23), la secuencia de consenso subgrupo III humano de cadena pesada (Fig. 1B, SEQ ID NO:24), cadena ligera variable de anticuerpo beta7 anti-ratón de rata (Fib504) (Fig. 1A, SEQ ID NO: 10), cadena pesada variable de anticuerpo beta7 de anti-ratón de rata (Fib504) (cis Fig. 1B, SEQ ID NO: 11), y variantes de anticuerpo humanizado: cadena variable ligera de injerto hu504K humanizado (Fig. 1A, SEQ ID NO: 25), cadena pesada variable de injerto (Fig. 1B, SEQ ID NO: 26), variante hu504.5 (variaciones de aminoácido del injerto hu504K humanizado, se indica en la Fig. 1A (cadena ligera) y Fig. 1B (cadena pesada) para las variantes hu504.5, hu504.16, y hu504.32. Las sustituciones de aminoácido adicionales en el HVR-H1 y HVR-H2 del injerto hu504K que resultaron en los anticuerpos de unión beta7 están indicados en la Fig. 1C.

Las Figs. 2A y 2B, describen la secuencia de longitud completa de la cadena ligera de secuencia del subgrupo III de consenso humano (Fig. 2A, SEQ ID NO: 27) y la cadena pesada (Fig. 2B, SEQ ID NO: 28). Los HVR están subrayados.

Las figs. 3A y 3B, describen la secuencia de longitud completa de las regiones hipervariables Fib504 de rata que contienen injerto humanizado 504 (como se describió aquí), insertado en la cadena ligera de secuencia consenso capa I humana (Fig. 3A, SEQ ID NO: 29) y en la cadena pesada de la secuencia consenso subgrupo III humano (Fig. 3B, SEQ ID NO: 30). Los HVR están subrayados.

Las figs. 4A y 4B describen la secuencia de longitud completa del injerto 504K humanizado en el cual la posición 49 de la cadena ligera del injerto hu504 es una sustitución Y49K. La cadena ligera hu504Kgraft se describe mediante la SEQ ID NO: 31 y la cadena pesada hu504Kgraft se describe mediante la SEQ ID NO: 30. Los HVR están subrayados.

27

Las figs. 5A y 5B, describen la secuencia de longitud completa del injerto hu504K-RF en cuyas posiciones 71 y 78 de la cadena pesada del injerto hu504 está una sustitución A71R y una sustitución A78F proveniente de la secuencia hu504Kgraft. La cadena ligera de injerto hu504K-RF, se describe mediante la SEQ ID NO: 31, y la cadena pesada de injerto hu504K-RF, se describe mediante la SEQ ID NO: 32. Los HVR están subrayados.

Las figs. 6A y 6B, describen la secuencia de longitud completa de la variante hu504.32 que comprende la cadena pesada del injerto hu504K-RF (SEQ ID NO: 32) y las sustituciones T31D y Y32L, en la cadena ligera del hu504Kgraft (SEQ ID NO: 33). Los HVR están subrayados.

La fig. 7A - la fig. 7B y la fig. 8A - la fig. 8B, describen secuencias de estructura de consenso humana aceptadoras de ejemplo, para uso en la práctica de la presente invención con identificadores de secuencia conocidos:

Estructuras de consenso ligeras variables (VL) (FIG. 7 A, B)

Estructura de consensos subgrupo I, capa VL humano (SEQ ID NO: 14)

Estructura de consensos subgrupo I, capa VL humano menos extendida HVR-L2 (SEQ ID NO: 15)

Estructura de consensos subgrupo II, capa VL humano (SEQ ID NO: 16)

Estructura de consensos subgrupo III, capa VL humano (SEQ ID NO: 17)

Estructura de consensos subgrupo IV, capa VL humano (SEQ ID NO: 18)

Las regiones sombreadas representan cadenas ligeras HVR (indicados como LI, L2, y L3).

Estructuras de consenso pesadas variables (VH) (FIG. 8A, B)

Estructura de consensos subgrupo I, VH humano, menos CDR kabat (SEQ ID NO: 19)

Estructura de consensos subgrupo I, VH humano, menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 20-22)

Estructura de consensos subgrupo II, VH humano, menos CDR Rabat (SEQ ID NO: 48)

Estructura de consensos subgrupo II, VH humano, menos las regiones hipervariables (SEQ ID NOs: 49-51)

Estructura de consensos subgrupo III, VH humano, menos los CDR kabat (SEQ ID NO: 52)

Estructura de consensos subgrupo III, VH humano, menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 53-55)

La estructura aceptadora VH humana, menos los CDR kabat (SEQ ID NO: 56)

La estructura aceptadora VH humana, menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 57-58)

La estructura aceptadora 2 VH humana, menos los CDR kabat (SEQ ID NO: 59)

La estructura aceptadora 2 VH humana, menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 60-62)

Las figs. 9A y 9B despiden una secuencia de aminoácido de las cadenas variables del anticuerpo Fib504 beta7 de integrina anti-ratón de rata, reducido mediante el hibridoma ATCC HB-293. Los HVR están subrayados. La cadena ligera variable se describe en la Fig. 9A (SEQ ID NO: 12), y la cadena pesada variable se describe en la Fig. 9B (SEQ ID NO: 13).

La fig. 10A describe posiciones de aminoácido en la cadena pesada de varias secuencias de consenso (subgrupos hu I-III). La secuencia de consenso utilizada para el desarrollo del anticuerpo anti-HER2 Herceptin®, las estructuras Fib504 de rata, y hu504-RL y hu504-RF se describen en los ejemplos aquí. La Fig. 10B es una gráfica de barras que muestra la unión relativa del anticuerpo alfa4beta7 a hu504graft y el anticuerpo hu504Kgraft como una función de la estructura "RL" o "RF" como se describió en el ejemplo una parte.

Las figs. 11A-11C. La fig. 11A tabula los cambios HVR que resultan de la maduración de afinidad desarrollada al ofrecer un rango limitado de las sustituciones de aminoácido en la variante hu504.16. Los resultados son de librerías con los HVR individualmente modificados en la variante hu504.16, como se describió en el ejemplo 2 aquí. Las abreviaturas del aminoácido de las cajas son aminoácidos encontrados más frecuentemente en los anticuerpos que unen beta7 (anticuerpos seleccionados fago). Las figs. 11B y 11C, son gráficas de barras de los resultados de la fig. 11A que indica el número y el tipo de sustitución de aminoácido en la variante hu504.16 (cadena ligera, Fig. 11B; cadena pesada,

Fig. 11C), detectable mediante mutagénesis y métodos de selección del ejemplo 2.

La fig. 12 tabula los resultados de la maduración de afinidad desarrollada al ofrecer un amplio rango de posibles sustituciones de aminoácido en los HVR de la variante hu504.32 como se describió en el ejemplo 2. Las cajas sombreadas indican al aminoácido que se detectó más frecuentemente en anticuerpos detectados como anticuerpos de unión beta7, mediante la mutagénesis y los métodos de selección del ejemplo 2.

La fig. 13 describe las secuencias HVR del Fib504 anti-rata (ATCC-293), y el consenso humano (columnas izquierdas). Ejemplos de las sustituciones de aminoácidos observadas para cada posición HVR (no significan que sean limitantes), mediante los ensayos descritos en los ejemplos (sustituciones de aminoácido observadas mediante aleatorización de aminoácido suave, exploración de sustitución de aminoácido amplio, y exploración de sustitución de aminoácido limitado), se muestran a la derecha, (un método útil para modificar los HVR para la humanización, aplicable a variantes de la presente invención, se encuentran en la solicitud US Serial No. 60/545,840, presentada en Febrero 19, 2004).

La fig. 14 es una representación gráfica de ejemplo de la figura Fib504 y la variante de un anticuerpo variante al MAdCAM como una función de la concentración del anticuerpo como se describió en el ejemplo 3. Se determinaron los valores IC_{50} e IC_{90} para los anticuerpos determinados.

La fig. 15 describe la secuencia de aminoácido HVR de cadena ligera y pesada para el anticuerpo anti-beta7 504.32R con respecto a la posición de acuerdo al sistema de numeración Rabat en un sistema de numeración relativo (A-F) para los seis HVR del anticuerpo. Los aminoácidos en las posiciones 71, 73, y 78 de la región FR3 de cadena pesada también se describe. Las sustituciones de aminoácido útiles también se listan para muchas de las posiciones en los HVR de la región FR3 de cadena pesada.

La fig. 16 muestra unas gráficas de barras de la capacidad relativa de los anticuerpos 504.32M y 504.32R, para bloquear el retorno de las células T radio

marcadas al colon de ratones que experimentan enfermedad inflamatoria del hígado.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

La invención suministra métodos, composiciones, kits y artículos de elaboración para identificar y/o utilizar inhibidores de la celda de señalización beta7.

Los detalles de éstos métodos, composiciones, kits y artículos de elaboración se suministran aquí.

Técnicas Generales

La práctica de la presente invención empleada, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (que incluyen técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que hacen parte del conocimiento del experto. Tales técnicas son completamente explicadas en la literatura, tales como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001).

Definiciones

Por "subunidad beta7" o "subunidad $\beta 7$ ", significa una subunidad de integrina $\beta 7$ humana (Erie et al., (1991) J. Biol. Chem. 266:11009-11016). La subunidad beta7 se asocia con la subunidad de integrina alfa4, tales como la subunidad $\alpha 4$ humana (Kilger and Holzmann (1995) J. Mol. Biol. 73:347-354). La integrina alfa4beta7, se expresa en la mayoría de los linfocitos maduros, así como también una población pequeña de timocitos, células de médula ósea y células madre. (Kilshaw and Murant (1991) Eur. J. Immunol. 21:2591-2597; Gurish et al, (1992) 149: 1964-1972; and Shaw, S.K. and Brenner, M.B. (1995) Semin. Immunol. 7:335). La subunidad

beta7 también se asocia con la subunidad alfaE, tal como la subunidad de integrina alfaE humana (Cepek, K.L, et al. (1993) J. Immunol. 150:3459). La integrina alfaEbeta7 es expresada sobre los epitelios linfocitos intra-intestinales (los iEL) (Cepek, K.L. (1993) supra). La subunidad beta7 que se une al anticuerpo anti-beta7 humanizado de la invención puede ser de ocurrencia natural y puede ser soluble o localizada a la superficie de la célula.

Mediante "subunidad alfaE" o "subunidad integrina alfaE" o " subunidad α E" +o "subunidad de integrina α E" o "CD 103" significa una subunidad de integrina encontrada para estar asociada con la integrina beta7 sobre los linfocitos intra-epiteliales, cuya integrina alfaEbeta7 media la unión de los iEL al epitelio intestinal que expresa la E-cadherina (Cepek, K.L. et al. (1993) J. Immunol. 150:3459; Shaw, S.K. and Brenner, M.B. (1995) Semin. Immunol. 7:335).

Los "MAdCAM" o "MAdCAM-I" se utilizan intercambiabilmente en el contexto de la presente invención, y se refieren a la molécula 1 de adhesión de célula de adresina mucosal de proteína, que es polipéptido de cadena simple que comprende una cola citoplasmática corta, una región de transmembrana u una secuencia extracelular compuesta de tres dominios similares a immuno globulina. Los cDNAs para MAdCAM-1 de murino, humano y macaco, han sido clonados (Briskin, et al, (1993) Nature, 363:461-464; Shyjan et al, (1996) J. Immunol. 156:2851-2857).

Los "VCSM-1" o "la molécula 1 de adhesión celular vascular" "CD106" se refieren a un ligando de alfa4beta7 y alfa4beta1, expresado sobre endotelio activado e importantes endotelaciones de leucocito endotelial tales como la unión y la trasmigración de leucocitos durante la inflamación.

La "E-caderina", se refiere a un miembro de la familia de las caderinas, en donde la E-cadherina se expresa sobre las células epiteliales. La E-cadherina es un ligando de la integrina alfaEbeta7, y media la unión del alfaEbeta7 expresado en iEL al epitelio intestinal, aunque su función en el retorno de linfocito no es clara (expresión de E-cadherina es regulada positivamente por el TGF-beta1).

"Fibronectina" se refiere a la fibronectina que está involucrada en la reparación del tejido, embriogénesis, coagulación de la sangre, y migración/adhesión de célula.

Este sirve como un ligador en el ECM (matriz extracelular), y como dímero encontrado en el plasma (fibronectina de plasma). La forma del plasma, se sintetiza mediante los hepatocitos, mientras que la forma ECM se hace mediante fibroblastos, condrocitos, células endoteliales, macrófagos, así como también ciertas células epiteliales. En éste contexto, éste interactúa con la integrina $\alpha 4 \beta 7$, para mediar aspectos del retorno o adición del linfocito. La forma ECM de la fibronectina, sirve como una molécula de adhesión celular general, mediante células ancla al colágeno o a los sustratos de proteoglican. La fibronectina, también puede servir para organizar las interacciones celulares con el ECM al unir a diferentes componentes de la matriz extracelular y a los receptores de fibronectina unidos a membrana sobre las superficies celulares. Finalmente, la fibronectina es importante en los eventos de migración de célula durante la embriogénesis.

“Los trastornos inflamatorios gastrointestinales” son un grupo de trastornos crónicos que originan la inflamación y/o ulceración en la membrana de mucosa. Estos trastornos incluyen por ejemplo, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, colitis indeterminada, y colitis infectiva), mucositis (por ejemplo, mucositis oral, mucositis gastrointestinal, mucositis nasal y proctitis), enterocolitis necrotizante y esofagitis.

“Enfermedad inflamatoria del intestino” o “IBD” se utiliza intercambiamente aquí para referirse a enfermedades del intestino que originan la inflamación y/o ulceración e incluyen sin limitación la enfermedad de Crohn, y la colitis ulcerativa.

“La enfermedad de Crohn (CD)” o “Colitis ulcerativa (UC)” son las enfermedades crónicas inflamatorias del intestino de etiología desconocida. La enfermedad de Crohn, a diferencia de la colitis ulcerativa, puede afectar cualquier parte del intestino. La característica más prominente de la enfermedad de Crohn es el engrosamiento edematoso rojizo-púrpura granular de la pared del intestino. Con el desarrollo de la infección, estos granulomas, a menudo pierden sus bordes circunscritos y se integran con el tejido circundante. La diarrea y la instrucción del intestino son las características clínicas predominantes. Como con la colitis ulcerativa, el curso de la enfermedad de Crohn puede ser continuo o relaxante, medio o severo, pero a diferencia de la colitis ulcerativa, la enfermedad de Crohn no es curable, mediante recepción del segmento involucrado del intestino. La

mayoría de los pacientes con enfermedad de Crohn requiere cirugía en cualquier punto, pero el relapsus subsecuente es común y el tratamiento médico continuo es usual.

La enfermedad de Crohn puede involucrar cualquier parte, desde el tracto alimentario, desde la boca hasta el ano, aunque típicamente éste aparece en las regiones ileocólica del intestino delgado, o del anorectal-colónica. Histopatológicamente, la enfermedad se manifiesta mediante granulomas discontinuos, accesos encriptados, fisuras y úlceras aftosas. El infiltrado inflamatorio es mezclado, que consiste de linfocitos (tanto de células T como de células B), células de plasmas, macrófagos, y neutrófilos. Existe un incremento desproporcionado en las células de plasma que secreta IgM- y IgG, los macrófagos y los neutrófilos.

Drogas antiinflamatorias sulfasalazina y ácido 5- aminosalicílico (5-ASA) son útiles para tratar la enfermedad crónica de Crohn y está comúnmente prescrita para mantener la remisión de la enfermedad. El metroidazol y ciprofloxacina son similares en la eficacia a la sulfasalazina y parecen ser particularmente útiles para el tratamiento de enfermedad perianal. En casos más severos, los corticosteroides son efectivos para tratar las exacerbaciones activas y pueden mantener aún la remisión. La azatriopina y la 6-mercaptopurina también han mostrado éxito en pacientes que requieren administración crónica de corticoesteroides. También es posible que estas drogas jueguen un papel en la profilaxis de largo plazo. Desafortunadamente, puede ser una demora muy larga (hasta de 6 meses) antes del efecto de acción en algunos pacientes.

Las drogas antidiarreicos también suministran alivios sintomáticos en algunos pacientes. La terapia nutricional o la dieta elemental pueden mejorar el estado nutricional de los pacientes e inducir mejora sintomática de la enfermedad aguda, pero esto no induce remisiones clínicas sostenidas. Los antibióticos son utilizados para atacar sobrecrecimiento secundario bacteriano en el intestino delgado y tratamiento de complicaciones piogénicas.

La "colitis ulcerativa (UC)" aflige el intestino grueso. El curso de la enfermedad puede ser continuo o relapsante, medio o severo. La lesión más temprana es una infiltración inflamatoria con formación de acceso en la base de las criptas de

Lieberkuhn. La coalescencia de estas criptas distendidas y separadas tiende a separar la mucosa traslapante de su suministro de sangre, conduciendo a ulceración. Los síntomas de la enfermedad incluyen espasmos, dolor abdominal inferior, sangrado rectal y descargas frecuentes sueltas que consisten principalmente de sangre, pus y moco con partículas fecales escasas. Una colectomía total se puede requerir para una colitis aguda, severa o crónica, no remitiente.

Las características clínicas de la UC son altamente variables, y la afectación ataque puede ser insidiosa o adulta, y puede incluir diarrea, tenesmus y sangrado rectal relaxante con involucramiento fulminante del colon completo,. Megacolon tóxico, y puede ocurrir una emergencia que amenace la vida. Las manifestaciones extraintestinales incluyen artritis, pioderma gangrenoum, uveitis, y eritema nodosum.

El tratamiento para la UC incluye sulfasalazina y drogas relacionadas que contienen salicilato para casos medios y drogas corticosteroides en casos severos. La administración tópica de los salicilatos o de los corticosteroides es algunas veces efectiva, particularmente cuando la enfermedad está limitada al intestino distal, y está asociada con la dilución de efectos colaterales comparados con el uso sistémico. Con mediciones de soporte tales como la administración de hierro y agentes antidiarreicos es algunas veces indicada. La azatioprina, 6-mercaptopurina y metotrexato son algunas veces también prescritos para uso en casos refractarios dependientes de corticosteroides.

Una "modificación" de un residuo /posición de aminoácido, como se utiliza aquí, se refiere a un cambio de una secuencia de aminoácido primaria comparada con la secuencia de aminoácido de partida, en donde el cambio da como resultado de una alteración de la secuencia que involucra dicho residuo/posiciones de aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones típicas incluyen la sustitución del residuo (o en dicha posición) con otro aminoácido (por ejemplo una sustitución conservadora y no conservadora), inserción de uno o más (generalmente menos de 5 o 3) aminoácidos adyacentes a dicho residuo/posición, y la supresión de dicho residuo/posición. Una "sustitución aminoácido", o variación de este, se refiere al reemplazo de un residuo de aminoácido existente en una secuencia de aminoácido predeterminada (de partida) con un residuo de aminoácido diferente.

En general y preferiblemente, la modificación da como resultado la alteración de al menos una actividad fisicobioquímica de los polipéptidos variantes comparados con un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de partida para (o "tipo silvestre"). Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo, una actividad fisicobioquímica que se altera puede ser la afinidad de unión, capacidad de unión y/o el efecto de unión luego de la molécula blanco.

El término "aminoácido" dentro del alcance de la presente invención se utiliza en su sentido más amplio y significa y pretende incluir los L α -aminoácidos o residuos de ocurrencia natural. Las abreviaturas comúnmente utilizadas de una a tres letras para los aminoácidos de ocurrencia natural también se utilizan aquí (Lehninger, A.L. *Biochemistry*, 2d ed., pp. 71-92, (Worth Publishers, New York, New York, 1975). El término incluye los D-aminoácidos así como también los aminoácidos químicamente modificados tales como análogos de aminoácido, los aminoácidos de ocurrencia natural que no son usualmente incorporados dentro de las proteínas tales como la norleucina, y los compuestos químicamente sintetizados que tienen propiedades conocidas en la técnica por ser característica de un aminoácido. Por ejemplo, los análogos o miméticos de fenilalanina o prolina, que permiten la misma fisión conformacional de compuestos de péptido como Phe o Pro están incluidos dentro de la definición de aminoácido. Tales análogos y miméticos se denominan aquí "equivalentes funcionales" de un aminoácido. Otros ejemplos de aminoácido están listados por Roberts y Vellacio, *The peptides: Análisis, Síntesis, Biology*, Gross and Meiehofer, Eds., Vol.5, p. 341 (Academia Press, Inc., New York, New York, 1983), que se incorpora aquí en la referencia. Donde se utiliza una letra simple para designar uno de los aminoácidos de ocurrencia natural, las designaciones son como se encuentran comúnmente en la literatura relevante (ver, por ejemplo, Alberts, B. et al. *Molecular Biology of Cell*, 3rd ed., Garland Publishing, Inc. 1994, page 57).

Un anticuerpo "aislado" es aquel que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con el diagnóstico o usos terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En modalidades preferidas, el anticuerpo será purificado (1) a más del 95% del peso del anticuerpo determinado mediante el método Lowry, y más preferiblemente más del 99% en

peso (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácido N-terminal o internal mediante el uso de un secuenciador de copa gigante (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul coomassie o, (3) preferiblemente, tío de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de las células recombinantes aunque al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. De manera ordinaria, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

El término "enumeración del dominio variable como en Kabat" o "numeración de la posición de aminoácido como en Kabat", y variaciones de estas, se refiere al sistema de numeración utilizado para dominios variables de cadena pesada y los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácido lineal actual puede contener más pocos adicionales aminoácidos que corresponden al acortamiento de, o inserción en, un FR o CDR de dominio variable. Por ejemplo, una cadena de dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de aminoácido simple (residuo 52 de acuerdo a Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo residuos 82a, 82b, y 82c etc. de acuerdo a Kabat) después del residuo FR de cadena pesada 82. La numeración Kabat de los residuos se puede determinar para un anticuerpo dado mediante el alineamiento de las regiones de homología o de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada Kabat "estándar".

La frase "sustancialmente similar", o "sustancialmente la misma", como se utiliza aquí, denota suficientemente alto grado de similitud entre los dos valores numéricos (generalmente uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparado) de tal forma que un experto en la técnica consideraría una diferencia entre los dos valores como poca o sin significado biológico y/o estadístico dentro del contexto de las características biológicas medidas por dichos valores (por ejemplo valores K_d). La diferencia entre dichos dos valores es preferiblemente menos de aproximadamente 50%, preferiblemente menos de aproximadamente 40%, preferiblemente menos de aproximadamente 30%, preferiblemente menos de aproximadamente 20%,

preferiblemente menos de aproximadamente 10% como una función del valor para el anticuerpo de referencia/comparador.

“Afinidad de unión” se refiere generalmente a la resistencia de la suma total de las interacciones no covalentes entre un sitio de unión simple de una molécula (un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo un antígeno). A menos que se indique otra cosa, como se utiliza aquí “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de unión de una molécula X para su compañía Y puede generalmente ser representado mediante la constante de disociación (K_d). La afinidad se puede medir mediante los métodos comunes conocidos en el arte, incluyendo los descritos aquí. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente unen antígeno lentamente y tienden a disociarlo fácilmente, mientras los anticuerpos de alta afinidad unen generalmente antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos por más tiempo. Una variedad de métodos para medir la afinidad de unión son conocidos en la técnica, cualquiera de los cuales se puede utilizar para los propósitos de la presente invención. Las modalidades ilustrativas específicas están descritas en lo siguiente. En una modalidad, el valor “ K_d ” o “valor K_d ” de acuerdo con la invención se mide mediante un ensayo de unión antígeno radiomarcado (RIA) desarrollado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describió mediante el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión de solución de los Fabs para el antígeno al equilibrar el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado (^{125}I) mediante una serie de titulaciones de un antígeno no marcado, luego capturando el antígeno de unión con una placa de cubierta con anticuerpo anti-Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293: 865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas de microtítulo (Dynex) son recubiertas durante toda la noche con 5 ug/ml de un anticuerpo anti-Fab captitante (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9.6), y subsecuentemente bloqueado con un 2% (w/v) de suero albúmina bovino en PBS por dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no absorbente (Nunc#269620), 100 pM o 26 pM [125]- antígeno son mezclados con diluciones seriadas de un Fab de interés (por ejemplo, consistente con la evaluación de un anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). El Fab de interés es incubado durante toda la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un largo periodo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar que se

alcance el equilibrio. Posteriormente, la mezcla es transferida a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). La solución es luego removida y la placa lavada ocho veces con 0.1% Tween-20 en PBS. Cuando las placas se han secado, se agregan 150ul/pozo de scintillan (MicroScint-20; Packard), y las placas son contadas sobre un contador Topcount gamma (Packard) por diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan menos o igual al 20% de unión máxima son escogidos para uso en ensayos de unión competitiva. De acuerdo con otra modalidad el K_d o el valor K_d se mide al utilizar un ensayo de resonancia de plasmol de superficie utilizando un BIAcoreTM-2000 o un BIAcoreTM-3000 (BiaCore, Inc., Picataway, NJ) a 25°C con chips CM5 antígeno inmovilizado a ~ 10 unidades de respuesta (RU). En resumen, los chips biosensores dextran decarboximetilados (CM5, BIAcore Inc.) son activados con hidroclicida N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo a las instrucciones del suministrador. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4.8, en 5ug/ml (~0.2 uM) antes de la inyección a una tasa de flujo de 5ul/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Luego de la inyección del antígeno, se inyecta 1M de etanolamina a los grupos no reaccionados en bloque. Para mediciones simétricas, dos diluciones seriales de Fab (0.78 nM a 500 nM) se inyectan en PBS con 0.05% Tween 20 (PBST) a 25°C a una tasa de flujo de aproximadamente 25 ul/min. Las tasas de asociación (K_{on}) y las tasas de disociación (K_{off}) se calculan usando un modelo de unión Langmuir uno a uno simple (BIAcore Evaluation Software versión 3.2) al ajustar de manera simultánea el sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calcula como el radio $K_{prendido}/K_{apagado}$. Ver, por ejemplo, Chen Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. la tasa prendida $10^6 M^{-1} S^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmol de superficie anterior, luego la tasa de prendido se puede determinar al utilizar la técnica de apagado fluorescente que mide el incremento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación=295nm; emisión=340 nm, 16 nm de paso de banda) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20nM (Forma Fab) en PBS, pH 7.2, en la presencia de concentraciones crecientes de antígeno medido en un espectrómetro, tal como el espectrofotómetro de flujo de parada (Instrumentos Aviv) o un espectrofotómetro 8000 serie SLM-Aminco (Termoespectrónico) con una cubeta roja de agitación.

Una "tasa prendida" o "tasas de asociación" o "tasas de asociación" o " K_{on} " de acuerdo a esta dimensión también se puede determinar con la misma técnica de resonancia de plasmol de superficie anteriormente descrita utilizando un BIAcoreTM-2000 o un BIAcoreTM-3000 (BiaCore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 antígeno hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo a las instrucciones del suministrador. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4.8, en 5 µg/ml (~0.2 µM) antes de la inyección a una tasa de flujo de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Luego de la inyección de etanolamina 1M para bloquear los grupos no reaccionados. Para las mediciones cinéticas, dos diluciones seriales de Fab (0.78 nM a 500 nM) se inyectan en PBS con 0.05% Tween 20 (PBST) a 25°C a una tasa de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (K_{on}) y las tasas de disociación (K_{off}) se calculan usando un modelo de unión Langmuir 1:1 simple (BIAcore Evaluation Software version 3.2) al ajustar simultáneamente el sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación (K_d) se calculó como la tasa radio $K_{prendido}/K_{apagado}$. Ver, por ejemplo, Chen Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Sin embargo, si la tasa prendida $10^6 M^{-1} S^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmol de superficie anterior, entonces la tasa de prendido se puede determinar al utilizar la técnica de apagado fluorescente que mide el incremento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación=295nm; emisión=340 nm, 16 nm de paso de banda) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20nM (Forma Fab) en PBS, pH 7.2, en la presencia de concentraciones crecientes de antígeno medido en un espectómetro, tal como el espectrofotómetro equipado con flujo de parada (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro serie 8000 SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada. El valor " K_d " o "valor K_d " de acuerdo con la invención es una modalidad medida mediante un ensayo de unión antígeno radiomarcado (RIA) desarrollado con la versión Fab de un anticuerpo y la molécula de antígeno como se describió en el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión de solución de los Fabs para el antígeno al equilibrar el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado (^{125}I) mediante una serie de titulaciones de un antígeno no marcado, capturando luego el antígeno de unión con una placa de cubierta con anticuerpo anti-Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293: 865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas de microtitulación (Dyner) son recubiertas durante toda la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab captitante (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9.6), y subsecuentemente bloqueado con

un 2% (w/v) de suero albúmina bovino en PBS por dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no absorbente (Nunc#269620), 100 pM o 26 pM [125]- antígeno son mezclados con diluciones seriadas de un Fab de interés (por ejemplo, consistente con la evaluación de un anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). El Fab de interés es incubado durante toda la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un largo periodo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar que se alcance el equilibrio. Posteriormente, la mezcla es transferida a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente durante una hora. La solución es luego removida y la placa lavada ocho veces con 0.1% Tween-20 en PBS. Cuando las placas se han secado, se agregan 150ul/pozo de scintillan (MicroScint-20; Packard), y las placas son contadas sobre un contador Topcount gamma (Packard) por diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan menos o igual al 20% de unión máxima son escogidos para uso en ensayos de unión competitiva. De acuerdo con otra modalidad el K_d o el valor K_d se mide al utilizar un ensayo de resonancia de plasmol de superficie utilizando un BIAcoreTM-2000 o un BIAcoreTM-3000(BiaCore, Inc., Picataway, NJ) a 25°C con chips CM5 antígeno inmovilizado a ~ 10 unidades de respuesta (RU). En resumen, los chips biosensores de dextran decarboximetilados (CM5, BIAcore Inc.) son activados con clorhidrato N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo a las instrucciones del suministrador. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4.8, en 5ug/ml(~ 0.2 uM) antes de inyección a una tasa de flujo de 5ul/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Luego de la inyección del antígeno, se inyecta 1M de etanolamina a los grupos no reaccionados en bloque. Para mediciones cinéticas, diluciones en serie de dos veces de Fab (0.78 nM a 500 nM) se inyectan en PBS con 0.05% Tween 20 (PBST) a 25°C a una tasa de flujo de aproximadamente 25 ul/min. Las tasas de asociación (K_{prendido}) y las tasas de disociación (K_{apagado}) se calculan usando un modelo de unión Langmuir uno a uno simple (BIAcore Evaluation Software versión 3.2) al ajustar de manera simultánea el sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calcula como el radio $K_{\text{prendido}}/K_{\text{apagado}}$. Ver, por ejemplo, Chen Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Si la tasa prendida $10^6 M^{-1} S^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmol de superficie anterior, entonces la tasa de prendido se puede determinar al utilizar la técnica de apagado fluorescente que mide el incremento o disminución de la intensidad de emisión de

fluorescencia (excitación=295nm; emisión=340 nm, 16 nm de paso de banda) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20nM (Forma Fab) en PBS, pH 7.2, en la presencia de concentraciones crecientes de antígeno medido en un espectómetro, tal como el espectrofotómetro equipado con flujo de parada (Instrumentos Aviv) o un espectrofotómetro 8000 serie SLM-Aminco (Thermospectronic) con una cubeta roja de agitación.

En una modalidad, una "tasa de prendido" o "tasa de asociación" o "tasa de asociación" o " K_{on} " de acuerdo con esta invención se determina con la misma técnica de resonancia de plasmol de superficie anteriormente descrita utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BiaCore, Inc., Picataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmoviliado a ~10 unidades de respuesta (RU). En resumen, los chips biosensores de dextran decarboximetilados (CM5, BIAcore Inc.) son activados con clorhidrato N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo a las instrucciones del suministrador. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4.8, en 5µg/ml (~0.2 µM) antes de inyección a una tasa de flujo de 5µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Luego de la inyección de 1M etanolamina para bloquear los grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, diluciones en serie de dos veces de Fab (0.78 nM a 500 nM) se inyectan en PBS con 0.05% Tween 20 (PBST) a 25°C a una tasa de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación ($K_{prendido}$) y las tasas de disociación ($K_{apagado}$) se calculan usando un modelo de unión Langmuir uno a uno simple (BIAcore Evaluation Software versión 3.2) al ajustar de manera simultanea el sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calcula como el radio $K_{prendido}/K_{apagado}$. Ver, por ejemplo, Chen Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Si la tasa de prendido $10^6 M^{-1} S^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmol de superficie anterior, entonces la tasa de prendido se puede determinar al utilizar la técnica de apagado fluorescente que mide el incremento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación=295nm; emisión=340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20nM (Forma Fab) en PBS, pH 7.2, en la presencia de concentraciones crecientes de antígeno medido en un espectrofómeto, tal como el espectrofotómetro equipado con flujo de parada (Instrumentos Aviv) o un espectrofotómetro serie 8000 SLM-Aminco (Thermospectronic) con una cubeta agitada.

La frase "sustancialmente reducida", o "sustancialmente diferente", como se utilizan aquí, denota un alto grado de diferencia entre los dos valores numéricos (generalmente uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparador) de tal forma que un experto en la técnica consideraría las diferencias entre los dos valores por ser de significancia estadística dentro del contexto de las características biológicas medidas mediante dichos valores (por ejemplo, valores K_d , respuesta HAMA). Las diferencias entre dichos dos valores es preferiblemente mayor que aproximadamente 10%, preferiblemente mayor que aproximadamente el 20%, preferiblemente mayor que aproximadamente el 30%, preferiblemente mayor que el aproximadamente 40%, preferiblemente mayor que el aproximadamente 50% como una función del valor para el anticuerpo de referencia/comparador.

"La identidad porcentual de secuencia de aminoácido (%)" con respecto a l péptido o secuencia de polipéptidos se define como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidato que son idénticos con los residuos de aminoácido en la secuencia de péptido o polipéptido específica, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr la identidad de secuencia porcentual máxima, y no considerando ninguna sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para propósitos de determinar la identidad de secuencia de aminoácido porcentual se puede lograr de varias maneras que corresponden al experto en la técnica, por ejemplo, utilizando un software de computadora disponible tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (ENASTAR). Aquellos expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmos necesarios para lograr el alineamiento máximo sobre la longitud completa de la secuencia que está siendo comparada. Para los propósitos de esta, sin embargo, los valores de identidad porcentual de aminoácidos son generados utilizando un programa de computadora de comparación de secuencia ALIGN-2, en donde el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se suministra en la tabla A adelante. El programa de computadora de comparación de secuencia ALIGN-2 fue elaborado por Genentech, Inc y el código fuente mostrado en la tabla A adelante ha sido presentado con documentación de usuario en la oficina de derechos de autor en los Estados Unidos, Washington D.C., 20559, donde ésta se registró bajo el

93

registro de derecho de autor No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible mediante Genentech, Inc., South San Francisco, California o se puede compilar del código fuente suministrado en la figura 8 de adelante. El programa ALIGN-2 se debe compilar para uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente un UNIX V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencia se establecen mediante el programa ALIGN-2 y no varían.

En la situación donde ALIG-2 se emplea para la comparación de secuencia de aminoácido, la identidad de secuencia de aminoácido porcentual de una secuencia de aminoácido A dado, con, o contra una secuencia de aminoácido B dada (que puede alternativamente ser fraseada como una secuencia de aminoácido A dada que tiene o comprende una cierta identidad de secuencia de aminoácido porcentual a, con, o contra una secuencia dada de aminoácido B) se calcula como sigue:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

En donde X es el número de residuos de aminoácidos calificados como de coincidencia idéntica mediante el programa de alineación de secuencia ALIGN-2 y en la alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácido A no es igual a la longitud de la secuencia del aminoácido B, la identidad de secuencia del aminoácido % de A a B no igualará la identidad de secuencia de aminoácido porcentual de B a A.

Al menos que específicamente se establezca otra cosa, todos los valores % de identidad de secuencia del aminoácido utilizados aquí se obtendrán como se describe en el párrafo inmediatamente precedente utilizando el programa de computador ALIGN-2.

Tabla A

```

/*
*
* C-C increased from 12 to 15
* Z is average of EQ
* B is average of ND
* match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
*/
#define _M    -8    /* value of a match with a stop */

int    _day[26][26] = {
/*    A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},

```

```

/* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */ {0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */ {0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ {M, M, M, M, M, M, M, M, M, M, M, M, M, M,
0, M, M, M, M, M, M, M, M, M, M, M, M},
/* P */ {1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */ {0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */ {1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */ {1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */ {0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ {0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */ {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */ {0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ {0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

/*
*/

#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS 1024 /* max jmps in an path */
#define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT 3 /* value of matching bases */
#define DMIS 0 /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0 8 /* penalty for a gap */
#define DINS1 1 /* penalty per base */
#define PINS0 8 /* penalty for a gap */

```

```

#define PINS1      4      /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int            score;      /* score at last jmp */
    long           offset;     /* offset of prev block */
    short          ijmp;       /* current jmp index */
    struct jmp     jp;         /* list of jmps */
};

struct path {
    int            spc;        /* number of leading spaces */
    short          n[JMPs];    /* size of jmp (gap) */
    int            x[JMPs];    /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char              *ofile;      /* output file name */
char              *namex[2];   /* seq names: getseqs() */
char              *prog;       /* prog name for err msgs */
char              *seqx[2];     /* seqs: getseqs() */
int               dmax;         /* best diag: nw() */
int               dmax0;        /* final diag */
int               dna;          /* set if dna: main() */
int               endgaps;      /* set if penalizing end gaps */
int               gapx, gapy;    /* total gaps in seqs */
int               len0, len1;    /* seq lens */
int               ngapx, ngapy;  /* total size of gaps */
int               smax;         /* max score: nw() */
int               *xbm;         /* bitmap for matching */
long              offset;       /* current offset in jmp file */
struct diag       *dx;          /* holds diagonals */
struct path       pp[2];        /* holds path for seqs */

```

```

char      *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char      *getseq(), *g_calloc();

```

```

/* Needleman-Wunsch alignment program

```

```

*
* usage: progs file1 file2
*   where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
*   The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
*   Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
*   Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
*   A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
*   Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/

```

```

#include "nw.h"
#include "day.h"

```

```

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

```

```

static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

```

```

main(ac, av)

```

```

    int    ac;
    char   *av[];

```

```

main

```



```

prog = av[0];
if (ac != 3) {
    fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
    fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
    fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
    fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
    fprintf(stderr, "Output is in the file 'align.out'\n");
    exit(1);
}
namex[0] = av[1];
namex[1] = av[2];
seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

endgaps = 0;                /* 1 to penalize endgaps */
ofile = "align.out";        /* output file */

nw();                       /* fill in the matrix, get the possible jumps */
readjumps();                /* get the actual jumps */
print();                    /* print stats, alignment */

cleanup(0);                 /* unlink any tmp files */
}

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()
{
    nw

```

```

char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
int       *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
int       ndelx, delx;       /* keep track of delx */
int       *tmp;              /* for swapping row0, row1 */
int       mis;               /* score for each type */
int       ins0, ins1;        /* insertion penalties */
register   id;                /* diagonal index */
register   ij;                /* jmp index */
register   *col0, *col1;      /* score for curr, last row */
register   xx, yy;            /* index into seqs */

dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

smax = -10000;
if (endgaps) {
    for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
        ndely[yy] = yy;
    }
    col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
}
else
    for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
        dely[yy] = -ins0;

/* fill in match matrix
*/
for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
    /* initialize first entry in col
    */

```

100

```

if (endgaps) {
    if (xx == 1)
        col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
    else
        col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
    ndelx = xx;
}
else {
    col1[0] = 0;
    delx = -ins0;
    ndelx = 0;
}

...flw

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongoing del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);

```

```

        ndely[yy] = 1;
    } else
        ndely[yy]++;
}

/* update penalty for del in y seq;
 * favor new del over ongoing del
 */
if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (coll[yy-1] - ins0 >= delx) {
        delx = coll[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else {
        delx -= ins1;
        ndelx++;
    }
} else {
    if (coll[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
        delx = coll[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else
        ndelx++;
}

```

```

/* pick the maximum score; we're favoring
 * mis over any del and delx over dely
 */

```

...llw

```

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    coll[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    coll[yy] = delx;
}

```

102

```

ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (1dna || (ndelx >= MAXJMP
&& xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
    dx[id].ijmp++;
    if (++ij >= MAXJMP) {
        writejms(id);
        ij = dx[id].ijmp = 0;
        dx[id].offset = offset;
        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
    }
}
dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
dx[id].jp.x[ij] = xx;
dx[id].score = delx;
}
else {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
dx[id].jp.n[0] && (1dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
&& xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
    dx[id].ijmp++;
    if (++ij >= MAXJMP) {
        writejms(id);
        ij = dx[id].ijmp = 0;
        dx[id].offset = offset;
        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
    }
}
dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
dx[id].jp.x[ij] = xx;
dx[id].score = dely[yy];
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
}

```

```

        if (coll[yy] > smax) {
            smax = coll[yy];
            dmax = id;
        }
    }
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)coll);
}

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */

```

```

#define P_SPC 3      /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int    olen;        /* set output line length */
FILE   *fx;          /* output file */

print()
{
    int    lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
}

```

106

```

    pr_align();
}

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly;                                /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap;                        /* leading trailing overlap */
{
    int        nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char        outx[32];
    double      pct;
    register    n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;

```



```

        n0++;
        siz1--;
    }
    else {
        if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A'])
            nm++;
        if (n0++ == pp[0].x[i0])
            siz0 = pp[0].n[i0++];
        if (n1++ == pp[1].x[i1])
            siz1 = pp[1].n[i1++];
        p0++;
        p1++;
    }
}

/* pct homology:
 * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
 * else, knock off overhangs and take shorter core
 */
if (endgaps)
    lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
else
    lx = (lx < ly)? lx : ly;
pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
fprintf(fx, "\n");
fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base": "residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}

```

...getmat

```

fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINS0, PINS1);
if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
    fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;        /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];       /* jmp index for a path */
static      nc[2];       /* number at start of current line */
static      ni[2];       /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char  *ps[2];      /* ptr to current element */
static char  *po[2];      /* ptr to next output char slot */
static char  out[2][P_LINE]; /* output line */
static char  star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */

```

static

pr_align()

pr_align

{

int nn; /* char count */

int more;

register i;

for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {

nn = stripname(name[i]);

if (nn > lmax)

lmax = nn;

nc[i] = 1;

ni[i] = 1;

siz[i] = ij[i] = 0;

ps[i] = seqx[i];

po[i] = out[i]; }

for (nn = nm = 0, more = 1; more;) {

...pr_align

for (i = more = 0; i < 2; i++) {

/*

* do we have more of this sequence?

*/

if (!*ps[i])

continue;

more++;

if (pp[i].spc) { /* leading space */

*po[i]++ = ' ';

pp[i].spc--;

}

else if (siz[i]) { /* in a gap */

*po[i]++ = ' ';

siz[i]--;

}

```

else {          /* we're putting a seq element
                */
    *po[i] = *ps[i];
    if (islower(*ps[i]))
        *ps[i] = toupper(*ps[i]);
    po[i]++;
    ps[i]++;

    /*
     * are we at next gap for this seq?
     */
    if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
        /*
         * we need to merge all gaps
         * at this location
         */
        siz[i] = pp[i].n[ij[i]]++;
        while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
            siz[i] += pp[i].n[ij[i]]++;
    }
    ni[i]++;
}

}

if (++nn == olen || !more && nn) {
    dumpblock();
    for (i = 0; i < 2; i++)
        po[i] = out[i];
    nn = 0;
}

}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
dumpblock

```

```

{
    register    i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '0';

    (void) putc('\n', fx);
    for (i = 0; i < 2; i++) {
        if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
            if (i == 0)
                nums(i);
            if (i == 0 && *out[1])
                stars();
            putline(i);
            if (i == 0 && *out[1])
                fprintf(fx, star);
            if (i == 1)
                nums(i);
        }
    }
}

```

...dumpblock

```

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
    int    ix;    /* index in out[] holding seq line */
{
    char    nline[P_LINE];
    register    i, j;
    register char    *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
}

```

nums

```

for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
    if (*py == ' ' || *py == '-')
        *pn = ' ';
    else {
        if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
            j = (i < 0)? -i : i;
            for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                *px = j%10 + '0';
            if (i < 0)
                *px = '-';
        }
        else
            *pn = ' ';
        i++;
    }
}
*pn = '\0';
nc[ix] = i;
for (pn = nline; *pn; pn++)
    (void) putc(*pn, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
    int ix;
{
    int i;
    register char *px;

    for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
        (void) putc(*px, fx);
}

```

putline

...putline

```

for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)

```

stars

113

```

        cx = '!';
    else
        cx = ' ';
    }
    else
        cx = ' ';
    *px++ = cx;
}
*px++ = '\n';
*px = '\0';
}

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
    char *pn; /* file name (may be path) */
{
    register char *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

```

stripname


```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX";          /* tmp file for jumps */
FILE *fj;

int cleanup();                             /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                cleanup
{
    int i;
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)                          getseq
{
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */

```

```

char        line[1024], *pseq;
register char *px, *py;
int         natgc, tlen;
FILE        *fp;

if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
    fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
    exit(1);
}

tlen = natgc = 0;
while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++)
        if (isupper(*px) || islower(*px))
            tlen++;
}

if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
    fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
    exit(1);
}

pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

...getseq

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))

```

```

        *py++ = toupper(*px);
    if (index("ATGCU",*(py-1)))
        natgc++;
    }
}
*py++ = '\0';
*py = '\0';
(void) fclose(fp);
dna = natgc > (flen/3);
return(pseq+4);
}

char *
g_calloc(msg, nx, sz)                                g_calloc
{
    char *msg; /* program, calling routine */
    int nx, sz; /* number and size of elements */

    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx,
sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;
}

```

readjmps

```

if (fj) {
    (void) fclose(fj);
    if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
        cleanup(1);
    }
}

for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
    while (1) {
        for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
            ;

        ...readjumps

        if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
            (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
            dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
        }
        else
            break;
    }

    if (i >= JMPS) {
        fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
        cleanup(1);
    }

    if (j >= 0) {
        siz = dx[dmax].jp.n[j];
        xx = dx[dmax].jp.x[j];
        dmax += siz;
        if (siz < 0) { /* gap in second seq */
            pp[1].n[i1] = -siz;
            xx += siz;
            /* id = xx - yy + len1 - 1
             */
            pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        }
    }
}

```

168

```

        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
)

```

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejumps(ix)                                writejumps
{
    int    ix;

    char    *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

El término "vector" como se utiliza aquí, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual este ha sido ligado. Un tipo de vector es un "plásmido" que se refiere a un aro circular de ADN de hebra doble en el cual los elementos de ADN adicionales pueden estar ligados. Otro tipo de vector es un vector fago. Otro tipo de vector es un vector de unión, en donde los elementos de DN adicionales se pueden ligar en un genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la cual ellos están introducidos (por ejemplo vector y materiales que tienen origen bacterial de replicación y vectores de mamífero episomales). Otros vectores, (por ejemplo los vectores de mamífero no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped luego de la introducción en la célula huésped y de esta manera ser replicados juntos con los genomas huésped. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales ellos están operablemente ligados. Tales vectores son denominados aquí como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión de utilidad y técnicas de ADN recombinantes están a menudo en la forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y

“vector” se pueden utilizar intercambiamente en la medida en que plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector.

“Polinucleótido”, o “ácido nucleico”, como se utiliza intercambiamente aquí, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxiribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificadas, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en un polímero mediante ADN O ARN polimerasa, o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación a la estructura del nucleótido se puede impartir antes o después de montar el polímero. La secuencia de nucleótido se puede interrumpir por, mediante componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede ser adicionalmente modificado después de síntesis tal como mediante conjugación con una marca. Otros tipos de modificación incluyen, por ejemplo, “caps” sustitución de uno o más de los nucleótidos de ocurrencia natural con análogo, modificaciones inter nucleótido tales como, por ejemplo aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo metil fosfonato, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados, por ejemplo fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.) aquellos que contienen porciones pendientes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal ply-lisina, etc.), aquel o los con intercaladores (por ejemplo acridina, soralen, etc.), aquellos que contienen quemadores (por ejemplo metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, oxidantes, etc.), aquellos que contienen alquiladores, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo ácidos nucleicos alfa numéricos, etc.), así como también formas no modificadas de polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo habitualmente presentes en los azúcares se puede reemplazar, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándar, o activados para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales so pueden estar conjugados a soportes sólidos o semisólidos. El OH terminal 5' y 3' puede ser fosforilado o sustituido con aminas o porciones de grupos capaces orgánicos o de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también se pueden derivar a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de ribosa y azúcar desoxirubosa que sean generalmente conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil, 2'-fluoro o 2'-ácido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares alfa

m

numéricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosas, azúcares furanosos, sefoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósido abásico tales como metil ribosita. Uno o más enlaces fosfodiéster se puede reemplazar por grupos enlazantes alternativos. Estos grupos enlazantes alternativos incluyen, pero no están limitados a, modalidades en donde el fosfato es reemplazado por P(O) S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR. sub.2 ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH. sub. 2 ("formacetal"), en el cual cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20C). Opcionalmente contiene un enlace éter (-O-) arilo, alquénilo, cicloalquilo, cicloalquénilo, o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precedente aplica a todos los polinucleótidos a que se hace referencia aquí incluyendo ARN y ADN.

"Oligonucleótido", como se utiliza aquí, generalmente se refiere a polinucleótido de hebra simple generalmente sintéticos que son en general, pero no necesariamente, menores de 200 nucleótidos de longitud.

Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente exclusivos la descripción anterior para polinucleótidos es completamente aplicable a oligonucleótidos.

Los términos "anticuerpo" y "inmunoglobulina" se utilizan intercambiabilmente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa o monoclonales intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplos, anticuerpos biespecíficos tan largos que ellos exhiben la actividad biológica deseada) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpo (como se describió con mayor detalle aquí). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o de afinidad madurada.

"Fragmentos de anticuerpo" comprenden sólo una porción de un anticuerpo intacto, en donde la porción preferiblemente retiene al menos uno, preferiblemente la mayoría o todos, y las funciones normalmente asociada con aquella porción presente en el anticuerpo intacto. En una modalidad, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión de antígeno del anticuerpo intacto y así retiene la capacidad de unir antígeno. En otra modalidad, el fragmento de anticuerpo de

m

anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc retiene al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como unión de FcRn, modulación de vida media de anticuerpo, función ADCC y unión de complemento. En una modalidad, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una vida media *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, tal fragmento de anticuerpo puede comprender sobre un brazo que se une a antígeno ligado a una secuencia Fc capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de ocurrencia natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un antígeno simple. Además, en contraste a las preparaciones de anticuerpo policlonal que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un determinante simple sobre el antígeno.

Los anticuerpos monoclonales aquí específicamente incluyen anticuerpos "quiméricos" en los cuales la porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a secuencias correspondientes y en anticuerpos derivados de especies particulares que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras el resto de la cadena o cadenas es idéntica con u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase de anticuerpo o subclase, así como también fragmentos de tales anticuerpos entre tanto ellos exhiban la actividad biológica deseada (U.S. Patente No. 4,816,567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci, Usa* 81:6851-6855 (1984)).

Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo murino) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en la cual los residuos de la región hipervariable del receptor son reemplazados por residuos de una región hipervariable de especies no humanas (anticuerpo donador) tal como ratón, rata,

conejo o primate no humano que tiene la especificad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de estructura (FR) de la inmunoglobulina humana son reemplazados por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones son hechas para refinar adicionalmente el desempeño de anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo o al menos una, y típicamente dos, dominios de variable, en los cuales todos o sustancialmente todos los aros hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los FR son aquellos de una secuencia de inmunoglobulina. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de la inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, ver Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Ver también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas aquí: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allegry, Asthuma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)

Un "antígeno" es un antígeno predeterminado en el cual un anticuerpo puede ser selectivamente unido. El antígeno blanco puede ser polipéptido, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, haptén, u otro compuesto de ocurrencia natural o sintético. Preferiblemente, el antígeno blanco es un polipéptido. Una "estructura humana aceptadora" para los propósitos de ésta es una estructura que comprende una secuencia de aminoácido de una estructura VL o VH derivada de una estructura de inmunoglobulina humana, o de una estructura de consenso humana. Una estructura humana aceptadora "derivada de" una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura de consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácido de ésta o puede contener cambios de secuencias de aminoácido preexistentes. Cuando los cambios de aminoácido preexistentes están presentes, preferiblemente no más de 5 y preferiblemente cuatro o menos, o tres o menos cambios de aminoácido preexistentes están presentes. Donde los cambios de aminoácido preexistentes están presentes en un VH, preferiblemente aquellos cambios están solamente en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H. Por ejemplo, los residuos de aminoácido en aquellas posiciones pueden ser 71A,

73T y/o 78A. En una modalidad, la estructura humana aceptadora VL es idéntica a la secuencia de estructura de inmunoglobulina humana VL o a la secuencia de estructura de consenso humana.

Una "estructura de consenso humana" es una estructura que representa el residuo de aminoácido de ocurrencia más común en una selección de secuencias de estructura VL o VH de inmunoglobulina humana. La selección de la inmunoglobulina humana. En general, la selección de las secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana viene de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de las secuencias es un grupo como en Rabat *et al.* En una modalidad, para el VL es el subgrupo kappa I como en Rabat *et al.* En una modalidad, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Rabat *et al.*

Una "estructura de consenso de subgrupo I VL" comprende la secuencia de consenso obtenida de la secuencia de aminoácido en un subgrupo I capa ligero variable de Rabat *et al.* La secuencia de aminoácido de la estructura de consenso del subgrupo I VL comprende al menos una porción de todas de cada una de las siguientes secuencias:

DIQMTQSPSSLSAVGDRVITC (SEQ ID NO: 34)-LI-WYQQKPGKAPKLLI (SEQ ID NO: 35)- L2-GVPSRFSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 36)-L3-FGQGTVKIKR (SEQ ID NO: 37).

Una "estructura de consenso del subgrupo III VH" comprende la secuencia de consenso obtenida de las secuencias de aminoácido en el subgrupo presado variable III de Rabat *et al.* En una modalidad, la secuencia de aminoácido de la estructura de consenso del subgrupo III VH comprende al menos una porción o todas de cada una de las siguientes secuencias: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 38)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 39)-H2-RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 40)-H3-WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 41).

Una "estructura humana no modificada" es la estructura humana que tiene la misma secuencia de aminoácido que la estructura humana aceptadora, por

ejemplo, le falta el o las sustituciones de aminoácido humano a no humano en la estructura humana aceptadora.

Una "región hipervariable alterada" para los propósitos de esta es una región hipervariable que comprende una o más sustitución o sustituciones de aminoácido (por ejemplo 1 a aproximadamente 16) en esta.

Una "región hipervariable no modificada" para los propósitos de esta es una región hipervariable que tiene la misma secuencia de aminoácido que un anticuerpo no humano del cual este se deriva, es decir, al que le falta una o más sustituciones de aminoácido en este.

El término "región hipervariable", "HVR, o "HV", cuando se utiliza aquí se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o forman estructuralmente aros definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en el VH (H1, H2, H3), Y tres en el VI (L1, L2, L3). Un número de delineaciones de región hipervariable están en uso y están comprendidas en esta. Las regiones determinantes de complementariedad Kabat (CDR) están basadas en la variabilidad de secuencia y son los más comúnmente utilizados (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en su lugar a la localización de los aros estructurales (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). La región hipervariable AbM representa un compromiso entre los CDR Kabat y las regiones estructurales Chothia, y son utilizadas por el software de modelamiento de anticuerpo AbM de Oxford Molecular's. Las regiones hipervariables "de contacto" están basadas en análisis de las estructuras de cristal complejo disponibles. Los residuos de cada una de estas regiones hipervariables se anotan adelante.

Tabla 1

Aro	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1 numeración Rabat	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1 numeración	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35

Chothia				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las regiones hipervariables pueden comprender, regiones hipervariables extendidas "como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 49-56 o 50-56 o 52-56 (L2) y 89-97 (L3) en el VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en el VH. Los residuos de dominio variable están numerados de acuerdo a Kabat et al., supra para cada una de estas definiciones.

"estructura" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable diferentes de los residuos de región hipervariable como se definieron aquí.

Un "anticuerpo humano" es aquel que posee una secuencia de aminoácido que corresponde a aquella de un anticuerpo producido por un humano y/o ha sido hecha utilizando cualquiera de las técnicas para elaborar anticuerpos humanos como se describió aquí. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión de antígeno no humanos.

Un "anticuerpo madurado de afinidad" es aquel con una o más alteraciones en uno o más de los CDR de estos que resulta en una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, comparado con el anticuerpo padre que no posee aquella o aquellas alteraciones. Los anticuerpos madurados de afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o aun picomolares para el antígeno blanco. Los anticuerpos madurados de afinidad son producidos mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración de afinidad mediante barajamiento del dominio VH y VL. Una mutagénesis aleatoria de CDR y/o los residuos de estructura se describen en: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); and Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que exhibe o reduce la actividad de lógica del antígeno a que este se une. Los anticuerpos

127

bloqueantes preferidos o los anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

Un "anticuerpo antagonista" como se utiliza aquí es un anticuerpo que semeja al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

Un "desorden" es una condición que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Este incluye trastornos crónicos y agudos o enfermedades que incluyen aquellas condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

Ejemplos no limitantes de trastornos a ser tratados aquí incluyen tumores malignos y benignos; malignidades no leucemias y linfoides; neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicas y otros trastornos glandulares, macrófagos, epiteliales, estromales y blastocelicos; y trastornos inflamatorios, inmunológicos y otros relacionados con angiogénesis.

El término "enfermedad inmune relacionada" significa una enfermedad en la cual un componente del sistema inmune de un mamífero origina, mediante o contribuye de otra forma a la morbilidad en el mamífero. También incluidos están las enfermedades en las cuales el estímulo o la intervención de la respuesta inmune tiene un efecto de mejora sobre la progresión de la enfermedad. Incluidos dentro de ese término están las enfermedades inflamatorias mediadas por inmunidad, enfermedades inflamatorias no mediadas por inmunidad, enfermedades infecciosas, enfermedades de inmunodeficiencia, neoplasia, etc.

Ejemplos de enfermedades relacionadas con la inmunidad e inflamatorias, algunas de las cuales son mediadas por inmunidad o célula T, que se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (escleroderma) miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobulinuria nocturna paroxismal), trombocitopenia autoinmune (trombocitopenia idiopática púrpura, trombocitopenia mediada por inmunidad), tiroiditis (enfermedad de Grave's, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes melitus, enfermedad renal mediada

por inmunidad (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinisantes del sistema nervioso central y periférico tales como esclerosis múltiple, síndrome de polineuropatía desmielinizante idiopática, o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria, enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E Y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis activa crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y colangitis esclerosante, enfermedad inflamatoria del intestino (colitis ulcerativa: enfermedad de Crohn), enteropatía sensible a gluten, y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunes o mediadas por inmunidad que incluyen enfermedades de la piel bulosa, dermatitis multiforme de eritema y contacto, soriasis, enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a los alimentos y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón tal como neumonías eosinófilicas, fibrosis pulmonar idiopática, y neumonitis de hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplante que incluyen rechazo de injerto y enfermedad de injerto versus huésped.

Las enfermedades infecciosas incluyen enfermedades virales tales como SIDA (infección por VIH), hepatitis A, B, C, D Y E, herpes, etc, infección bacterial, infecciones fúngicas, infecciones de protozoarios y infecciones de parásitos.

Un "trastorno autoinmune" o a una "enfermedad autoinmune" como se utiliza intercambiabilmente aquí es una enfermedad no maligna o trastorno que surge y está dirigida contra los tejidos propios del individuo. Las enfermedades autoinmunes descritas aquí excluyen específicamente las enfermedades malignas o cancerosas o condiciones, particularmente que excluyen el linfoma de célula B, la leucemia linfoblástica aguda, (ALL), la leucemia linfocítica crónica (CLL), la leucemia de célula vellosa, y la leucemia mieloblástica crónica. Ejemplos de enfermedades autoinmunes o trastornos incluyen, pero no están limitados a, respuestas inflamatorias tales como enfermedades inflamatorias de la piel que incluyen soriasis y dermatitis (por ejemplo dermatitis atópica); esclerodermia sistémica y esclerosis; respuestas asociadas con enfermedades inflamatorias del intestino (tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa); síndrome de estrés respiratorio (que incluye síndrome de estrés respiratorio en adultos; ARDS); dermatitis; meningitis; encefalitis; uveítis; colitis; glomérulo nefritis; condiciones alérgicas tales como eccema y asma y otras condiciones que involucran la infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas; aterosclerosis;

deficiencia de adición de leucocito; artritis reumatoide; lupus eritematoso sistémico (SLE); diabetes melitus (por ejemplo diabetes melitus tipo 1 o diabetes melitus dependiente de insulina); esclerosis múltiple; síndrome de Reynaud; tiroiditis autoinmune; encefalomiелitis alérgica; síndrome de Sjorgen diabetes de ataque juvenil; y respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y retrasada medida por citoquinas y linfocitos T típicamente encontrados en tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, granulomatosis y vasculitis; anemia perniciosa (enfermedad de Addison); enfermedades que involucran diapedesis de leucocito; trastorno inflamatorio del sistema nerviosa central (SNC); síndrome de daño de órgano múltiple; anemia hemolítica (Que incluye, pero no esta limitado a crioglobulinemia o anemia positiva Coombs); miastenia gravis; enfermedades mediadas por complejo de antígeno-anticuerpo; enfermedad de membrana de base anti-glomerular; síndrome de antifosfolipido; neuritis alergia; enfermedad de Graves; síndrome miasténica Lambert-Eaton; bolo pemfigoide; pemfigus; poliendocrinopatías autoinmunes; enfermedad de Reiter; síndrome de hombre rígido; enfermedad de Behcet; artritis de célula gigante; nefritis de complejo inmune; nefropatía IgA; polineuropatías IgM; trombocitopenia púrpura inmune (ITP) o trombocitopenia autoinmune etc.

El término "trastornos inflamatorios gastrointestinales" es un grupo de trastornos crónicos que origina la inflamación y/o la euceracion de la membrana de mucosa. Como tales, los términos incluyen enfermedad inflamatoria del intestino (enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, colitis indeterminada y colitis infecciosa) mucositis (por ejemplo mucositis oral, mucositis gastrointestinal, mucositis nasal y proctitis), enterocolitis necrotizante y esofagitis.

El término "trastorno proliferativo de células" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que están asociados con algún grado de proliferación celular anormal. En una modalidad, el trastorno proliferativo de la célula es cáncer.

"tumor", como se utilizan aquí se refiere a todos los crecimientos celulares neoplásicos y de proliferación sean malignos o benignos, y a todos las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer" "canceroso", "trastorno proliferativo de células", "trastorno proliferativo" y "tumor" como se tratan aquí.

El término "cáncer" y "canceroso" se refiere o describe la condición fisiológica en los mamíferos que está típicamente caracterizada por el crecimiento/proliferación de células no reguladas. Ejemplos de cáncer incluyen pero no es limitado a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cánceres de célula escamosa, cáncer pulmonar de célula pequeña, cáncer pulmonar de célula no pequeña, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer del hígado, cáncer de la vejiga, epiteloma y cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

La desregulación de la Angiogénesis puede conducir a muchos trastornos que se pueden tratar mediante las composiciones y métodos de la invención. Esos trastornos incluyen tanto condiciones no neoplásicas como neoplásicas. Las neoplásicas se incluyen pero no están limitadas a aquellas descritas anteriormente. Los trastornos no neoplásicos se incluyen pero no están limitados a hipertrofia indeseada o aberrante, artritis, artritis reumatoide (RA), soriasis, placas soriáticas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, retinopatías diabéticas y otras proliferativas que incluyen retinopatía de premadurez, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización de la córnea, neovascularización del injerto corneal, rechazo de injerto corneal, neovascularización de la retina/cloroidal, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, restenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (AVM), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias de tiroides (incluyendo enfermedad de Grave), trasplante de córnea y otro tejido, inflamación crónica, inflamación del pulmón, daño del pulmón agudo/ARDS, sepsis, hipertensión pulmonar primaria, efusiones pulmonares malignas, edema cerebral (por ejemplo asociado a ataque agudo/daño de cabeza cerrada/trauma), inflamación sinovial, formación de pannus en RA, miositis osificante, formación de hueso hipertrófica, osteoartritis (OA), ascites refractaria, ovariana policística, endometriosis, tercer desplazamiento de enfermedades de fluidos (pancreatitis, síndrome de compartimiento, quemaduras, enfermedad del intestino), fibrosis uterinos, trabajo prematuro, inflamación crónica

tal como IBD (enfermedad de Crohn y colitis ulcerativas), rechazo de autoinjerto renal, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome nefrótico, crecimiento de masa de tejido no deseada o aberrante (no cáncer), articulaciones homofílicas, peladuras hipertróficas, inhibición de crecimiento de cabello, síndrome de Osler-Weber, fibroplastias retrolentales de granuloma piogénico, escleroderma, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, ascites, efusión pericardial (tal como aquella asociada con pericarditis), y efusión pleural.

Como se utilizan aquí, "tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural de los individuos o las células que están siendo tratadas, y se pueden desarrollar por profilaxis durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseados del tratamiento incluyen prevenir la ocurrencia u recurrencia de enfermedad, alivio de síntomas, disminución de cualesquier consecuencias directas o indirectas de la enfermedad, metástasis preventiva, disminución de la tasa de progresión de enfermedad, mejoramiento o paliamiento del estado de enfermedad, y remisión o prognosis mejorada. En algunas modalidades como los anticuerpos de la invención son utilizados para retrasar el desarrollo de una enfermedad o desorden.

Una "Cantidad efectiva" se refiere a una cantidad efectiva en dosis durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de una sustancia/molécula de la invención, agonista o antagonista puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula, agonista o antagonista a elicitar la respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también aquella en la cual los efectos tóxicos o de detrimento de la sustancia/molécula, agonista o antagonista son compensados por los efectos terapéuticamente benéficos. Una "Cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva en dosis y durante períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, pero no necesariamente, en razón a que utiliza la dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor de la cantidad terapéuticamente efectiva.

El término "Agente citotóxico" como se utiliza aquí se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o origina la destrucción de células. El término está destinado a incluir isótopos radiactivos (por ejemplo At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos por ejemplo metotrexato, adriamicina, alcaloides Vinca (vincristina, vinblastina, etoposida), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina, y otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de estos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de bacterias, hongos, plantas y de origen animal, que incluyen fragmentos y/o variantes de éstos, y agentes antitumorales o anticancerígenos varios descritos adelante. Otros agentes citotóxicos se describen adelante. Un agente tumoricida origina la destrucción de las células tumorales.

Un "Agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN®, ciclofosfamida; alquil sulfonatos tales como busulfan, improsulfan, y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenomelamina, trietilenefosforamida, trietilenotiofosforamida, y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (que incluye topotecan análogo sintético (HYCAMTIM®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo su aadozelesina; carzelesina y análogos sintéticos de biselesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposida, criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (que incluye los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucil, clornafacina, colofosfamida, estramustina; ifosfamida; mecloretamina; hidrocloreto de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorosotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como antibióticos de enediina (ejemplo caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma11 y

caliqueamicina omegal1 (ver, ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); la dinemicina, incluye dinemicina A; una esperamicina; así como también cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de enedina cromoproteína), aclasinomicinas, actinomicina, antramicina, azerina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN®, doxorubicina (que incluye morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomecina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptosocina, tubercidina, ubenimex, sinostatina, sorubicina antimetabólicos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metrotexato, teropterina, trimetrexato,; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, asacitidina, 6-asauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, dromostanolona propionato, epitiostanolm mepitioetano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotane, trilostano; rellenos de ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; aldofosmamida glicósido; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diasiquona; elformitina; acetato de eliptinio; y epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; yonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocina; mitoguanina; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrácida; procarbasina; PSK® complejo de polisacárido (JHS Natura Products=, Eugene, OR); razoxano; rizoxin; sizofiran; espirogermanium; ácido tenuazónico; triasicona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; tricotexenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindecina (ELDESINE®, FILDESIN®); dacarbasina; manomustina, mitobronitos; mitolactol, pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides; por ejemplo TAXOL®; paclitaxel (Bristol-Myers Squibb oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ formulación de nanopartículas de ingeniería de albúmina libres de cremóforo de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y TAXOTERE® doxetaxel (Rhone-Poulenc Rorer, Anthony, France); cloranbucil; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina, metotrexato; análogos de platino tales

como cisplatina y carboplatina; vinblastina (VELBAN®); platino; etoposido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatina; leucovovina; vinorelbina (NAAVELBINE®); novantrona; edatrezato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidores de topoisomerasa RFS 2000; difluorometil ornitina (DMFO); retinoles tales como ácido retinóico; capecitabina (XELODA®); sales farmacéuticamente aceptables, ácidos derivados de cualquiera de los anteriores; así como también combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para el régimen de tratamiento con oxaliplatina (ELOXATIN™) combinada con 5-FU y leucovovina.

También incluidas en esta definición están agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento de cáncer; y están a menudo en la forma de un tratamiento sistémico, o de cuerpo entero. Ellos pueden ser hormonas mismas. Ejemplos incluyen anti-estrógenos y moduladores de receptor de estrógeno selectivo (SRM), que incluye, por ejemplo, tamoxifen, (que incluye NOLVADEX® EVISTA® raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxofeno, queoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® toremifeno; anti-progesteronas; sub-reguladores del receptor de estrógeno (ERD); agentes que funcionan para suprimir o cortar los ovarios; por ejemplo, agonistas de hormona de liberación de hormona leutinizante (LHRH) tal como LUPRON® y ELIGARD® acetato de leuprolide, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterequina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasa para inhibir la enzima de aromatasa que regula la producción de estrógeno en glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4 (5) -imidazoles, aminogluetimida, MEGASE® megestrol acetato AROMASIN® exemestano, folestane, fadrosol, REVISOR® verozol, FEMARA® letrozol, Y ARIMIDEX® anastrozol, Además, tales definiciones de agentes quimioterapéuticos incluyen bifosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® U OSTAC® DIDOCAL® ETIDRONATO, NE-58095, ZOMETA® ácido zoledrónico/zoledronato FOSAMAX® alendronato, AREDIA® pamidronato, SKELID® tiludronato o ACTONEL® risedronato; así como también troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleosido citosina, oligonucleótidos contra sentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes sendas de señalización implicadas en la proliferación de célula

aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) ; vacunas tales como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia de gen, por ejemplo, la vacuna ALLOVETIN®, la vacuna LEUVECTIN®, Y LA VACUNA vaxid®, el inhibidor de topoisomerasa I LURTOTECAN®; ABARELIX® mRH; ditioxilato de lapatinib (un ErB-2 y EGFR también conocido como GW57201); y sales farmacéuticamente aceptables ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. Un "agente inhibidor de crecimiento" cuando se utiliza aquí se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula cuyo crecimiento es dependiente de la activación $\beta 7$ bien sea in Vitro o in vivo. Así, el agente inhibidor del crecimiento puede ser aquel que reduce significativamente el porcentaje de células dependientes de $\beta 7$ en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo de la célula (en un lugar diferente de la fase S), tales como agentes que inducen la disminución G1 y la disminución de fase M. Bloqueadores de clase M fase incluyen las vincas, (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de tipoisomerasas II tales como doxorubicina epirubicina, daunorubicina, etopoxido, y bleomicina. Aquellos agentes que disminuyen G1 también que se vierten en la disminución de fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluoracilo, y ara-C. Información adicional se puede encontrar en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds, Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" By Murakami et al., (WB saunders: Philadelphia, 1995), especialmente p.13 Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son drogas anti cáncer ambas derivadas del árbol de tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone, Poulenc Rorer) se deriva del Europeo es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL® Bristol-MyersSquibb. El Paclitaxel y el docetaxel promueven el montaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabiliza los microtubulos al evitar la despolimerización que da como resultado la inhibición de la mitosis en las células.

"Doxorubicina" es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de la doxorubicina es (8S-cis 10+ [de la 3-amino -2,3,6-trideoxi- α -L-Lixo-hexapiranosilo) oxil]-7, 8, 9, 10 tetrahidro-6, 8, 11, -trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5, 12 -naftacenodiona.

Los compuestos útiles en la terapia de combinación con los antagonistas del anticuerpo anti- β de la invención incluyen anticuerpos (que incluyen si limitación otros anticuerpos antagonistas incluyendo beta7 (Fib 21, 22, 27, 30 (Tidswell, M. (1997) supra) o derivados humanizados de estos), los anticuerpos anti-alfa 4 (ANTEGEN®), anti-TNF (REMICADE®)) o compuestos sin proteína que incluyen sin limitación compuestos 5-ASA, ASACOL®, PENTASA™, ROWASA™, COLAZAL™, y OTROS COMPUESTOS TALES COMO Purinetol y esteroides tales como prednisona. En una modalidad, la invención comprende un método para tratar un paciente, tal como un paciente humano, con el antagonista de del anticuerpo anti-beta 7 de la invención solo o en combinación con un segundo compuesto que también es útil en el tratamiento de inflamación. En una modalidad el segundo compuesto se selecciona del grupo que consiste de Fib 21, 22, 27, 30, o derivados humanizados de estos), anticuerpos anti-alfa4, ANTEGEN®, anti-TNF, REMICADES® compuesto 5-ASA, ASACOL®, PENTASA™, ROWASA™, COLAZAL™, purinetol, esteroides y prednisona. En una modalidad de la invención, la administración del anticuerpo anti-beta 7 antagonista de la invención reduce sustancialmente la dosis del segundo compuesto. En una modalidad, dicha reducción en la dosis del segundo compuesto es al menos el 30 al menos el 40%, al menos 50%, al menos 60, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%. En una modalidad de la invención, la combinación del anticuerpo de la invención y la dosis reducida del segundo compuesto alivia los síntomas en el paciente a sustancialmente el mismo grado o mejor que la administración del segundo compuesto solo.

Generación de anticuerpos variantes que exhiben respuesta de HAMA reducida o ausente.

Reducción o eliminación de HAMA (respuesta anti-ratón humana (también aplicable ante rata humana o antihumano humano) es un aspecto significativo del desarrollo clínico de los agentes terapéuticos adecuados. Ver, por ejemplo, Khaxzaeli et al., J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80: 937; Jaffers et al., Trnsplantation (1986), 41: 572; Shawler et al., J. Immunol. (1985), 135: 1530; Sears et al., J. Biol. Response Mod. (1984), 3: 138; Miller (1988), 332: 323; Junghans et al., Cancer Res. (1990), 50: 1495. Como se describió aquí, la invención suministra anticuerpos que son humanizados de tal forma que la respuesta HAMA se reduce o elimina. Las variantes de estos anticuerpos se pueden además obtener

137X

utilizando métodos de rutina conocidos en la técnica, algunos de los cuales son adicionalmente descritos adelante.

Por ejemplo, una secuencia de aminoácido proveniente del anticuerpo como se describió aquí puede servir como secuencia de partida (padre) para la diversificación de la estructura y/o el o las secuencias hipervariables. Una secuencia de estructura seleccionada a la cual la secuencia hipervariable de partida está ligada se denomina aquí como una estructura humana aceptadora.

Aunque las estructuras humanas aceptadoras pueden ser de, o derivarse de, una inmunoglobulina humana (las regiones VL y/o VH de éstas), preferiblemente las estructuras humanas aceptadoras son de, o se derivan de, secuencias de estructura de consenso humano tales como estructuras que han demostrado tener mínimo, o ninguna, inmunogenicidad en pacientes humanos.

Donde el aceptador se deriva de una inmunoglobulina humana, uno puede opcionalmente seleccionar una secuencia de estructura humana que se selecciona con base en su homología a la secuencia de estructura donadora al alinear la secuencia de estructura donadora con varias secuencias de estructura humana en una colección de secuencias de estructura humana, y seleccionar la secuencia de estructura más homóloga como el aceptador.

En una modalidad, las estructuras de consenso humanas aquí son de, o se derivan de, las secuencias de estructura de consenso del subgrupo III VH y/o el subgrupo I kappa VL.

Así, la estructura humana aceptadora VH puede comprender uno, dos, tres o todas las siguientes secuencias de estructura:

FR1 que comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:38).

FR2 que comprende WVRQAPGKGGLEWV (SEQ ID NO:39).

FR3 que comprende FR3 comprende RFTISX1DX2SKNTX3YLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO:42), en donde X1 es A o R, X2 es T o N y X3 es A, L, o F,

FR4 que comprende WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:41).

Ejemplos de estructuras de consenso VH incluye:

138

La Estructura de consenso subgrupo I VH humano menos los CDR Kabat (SEQ ID NO:19);

La Estructura de consenso del subgrupo I VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID Nos:20-22);

La Estructura de consenso del subgrupo II VH humano menos los CDR Kabat (SEQ ID NO:48);

La Estructura de consenso del subgrupo II VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID Nos:49-51);

La Estructura de consenso del subgrupo III VH humano menos los CDR Kabat (SEQ ID NO:52);

La Estructura de consenso del subgrupo III VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID Nos:53-55);

La Estructura aceptadora VH humana menos los CDR KRabat (SEQ ID NO:56);

Estructura aceptadora VH humana menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID Nos:57-58);

Estructura aceptadora 2 VH humana menos los CDR Rabat (SEQ ID NO:59); o

La Estructura aceptadora 2 VH humana menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID Nos:60-62).

En una modalidad, la estructura humana aceptadora VH comprende una, dos, tres o todas las siguientes secuencias de estructura:

FR1 que comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:38),

FR2 que comprende WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:39),

FR3	que	comprende	FR3	comprende
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA	(SEQ	ID	NO:43),	
RFTISRDTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA	(SEQ	ID	NO:44),	
RFTISRDTSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCA	(SEQ	ID	NO:45),	
RFTISADTSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCA	(SEQ	ID	NO:46),	

FR4 que comprende WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:41).

La estructura humana aceptadora VL puede comprender uno, dos, tres o todas las siguientes secuencias de estructura:

FR1 que comprende DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO:34),

FR2 que comprende WYQQKPGKAPKLLI (SEQ ID NO:35),

FR3 que comprende GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:36),

129

FR4 que comprende FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:37).

Ejemplos de estructuras de consenso VL incluyen:

Estructura de consenso del subgrupo I kappa VL humano (SEQ ID NO:14);

Estructura de consenso del subgrupo I kappa VL humano (HVR-L2 extendido)(SEQ ID NO:14);

Estructura de consenso del subgrupo II kappa VL humano (SEQ ID NO:16);

Estructura de consenso del subgrupo III kappa VL humano (SEQ ID NO:17); o

Estructura de consenso del subgrupo IV kappa VL humano (SEQ ID NO:18);

Aunque el aceptador puede ser idéntico en secuencia a la secuencia de estructura humana seleccionada, sea ésta de una estructura de inmunoglobulina humana o de consenso humano, la presente invención contempla que la secuencia aceptadora puede comprender sustituciones de aminoácido preexistentes con relación a la secuencia de inmunoglobulina humana o a la secuencia de estructura de consenso humana. Estas sustituciones preexistentes son preferiblemente mínimas; usualmente cuatro, tres, dos o una diferencias de aminoácido solamente con relación a la secuencia de inmunoglobulina humana o a la secuencia de estructura de consenso.

Los residuos de región hipervariable del anticuerpo no humano están incorporados en la estructura humana aceptadora VL y/o VH. Por ejemplo, uno puede incorporar residuos que corresponden a los residuos CDR Kabat, los residuos de aro hipervariable Chothia, los residuos Abm, y/o los residuos de contacto. Opcionalmente, los residuos de región hipervariable extendida como siguen son incorporados: 24-34 (L1), 49-56 (L2) y 89-97 (L3), 26-35 (H1), 50-65 O 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3).

Mientras "incorporación" de los residuos de región hipervariable como se discute aquí, se apreciará que se pueden lograr de varias formas, por ejemplo, ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácido deseada se puede generar mediante ácido nucleico mutagénico que codifica la secuencia de dominio variable de tal forma que los residuos de estructura de éstos son cambiados a residuos de estructura humana aceptadora, o al mutar ácido nucleico que codifica la secuencia de dominio variable humana de tal forma que los residuos de dominio hipervariables son cambiados a residuos no humanos, o mediante ácido nucleico sintetizante que codifica la secuencia deseada, etc.

En los ejemplo de aquí, las variantes injertadas de región hipervariable son generadas mediante mutagénesis Kunkel de ácido nucleico que codifica las secuencias aceptadoras humanas, que utilizan un oligonucleótido separado para cada región hipervariable. Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987). Los cambios apropiados se pueden introducir dentro de la estructura y/o la región hipervariable, utilizando técnicas de rutina, para corregir y reestablecer las interacciones de antígeno de región hipervariable propias.

El despliegue de fago(mid)(también se denomina aquí como despliegue de fago en algunos contextos) se puede utilizar como un método conveniente y rápido para generar y seleccionar muchos anticuerpos variantes diferentes potenciales en una librería generada mediante aleatorización de secuencia. Sin embargo, otros métodos para elaborar y seleccionar anticuerpos alterados están disponibles para la persona experta.

La tecnología de despliegue de fago(mid) ha suministrado una herramienta para generar y seleccionar proteínas novedosas que se unan a un ligando, tal como un antígeno. Utilizando las técnicas de despliegue de fago(mid) se permite la generación de grandes librerías de variantes de proteína que puedan ser rápidamente escogidas de aquellas secuencias que se unen a la molécula blanco con alta afinidad. Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos variantes son generalmente fusionados a la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de recubrimiento viral, tal como la proteína del gen III o la proteína del gen VIII. Los sistemas de despliegue de fagemido monovalentes donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína o el polipéptido esta fusionado a una secuencia de ácido nucleico que codifica una porción de la proteína de gen III se ha desarrollado. (Bass, S., *Proteins*, 8:309 (1990); Lowman and Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3:205 (1991)). En un sistema de despliegue de fagemido monovalente, la fusión de gen se expresa a bajos niveles y las proteínas del gen III tipo silvestre también se expresan de tal forma que se retiene la infectividad de las partículas. Los métodos para generar librerías de péptido y seleccionar aquellas librerías que han sido descritas en muchas patentes (por ejemplo, Patente U.S. No. 5,723,286, Patente U.S. No. 5,432,018, Patente U.S. No. 5,580,717, Patente U.S. No. 5,427,908 y Patente U.S. No.5,498,530).

Las librerías de los anticuerpos de los polipéptidos que se unen a antígeno se han preparado en un número de formas que incluyen al alterar un gen simple mediante la inserción de secuencias de ADN aleatorias o al clonar una familia de genes relacionados. Los métodos para desplegar los anticuerpos de los fragmentos de unión de antígeno que utilizan despliegue de fago(mid) se han descrito en la Patentes U.S. Nos. 5,750,373, 5,733,743, 5,837,242, 5,969,108, 6,172,197, 5,580,717, y 5,658,727. La librería es entonces seleccionada para la expresión de anticuerpos y las proteínas de unión de antígeno con las características deseadas.

Los métodos para sustituir un aminoácido de escogencia en un ácido nucleico de molde son bien establecidos en la técnica, algunos de los cuales se describen aquí. Por ejemplo, los residuos de región hipervariable se pueden sustituir utilizando el método Kunkel. Ver, por ejemplo, Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987).

La secuencia de oligonucleótidos incluyen una o más de los conjuntos de codones designados para los residuos de región hipervariable a ser alterados. Un conjunto de codón es un conjunto de diferentes secuencias de tripleta de nucleótido diferente utilizado para codificar los aminoácidos variantes deseados. Los conjuntos de codón se pueden representar utilizando para designar los nucleótidos particulares o mezclas equimolares de nucleótidos como se muestran delante de acuerdo al código IUB.

CÓDIGOS IUB

G Guanina

A Adenina

T Timina

C Citosina

R (A o G)

Y (C o T)

M (A o C)

K (G o T)

S (C o G)

W (A o T)

142

H (A o C o T)
 B (C o G o T)
 V (A o C o G)
 D (A o G o T)H
 N (A o C o G o T)

Por ejemplo, en el conjunto de codón DVK, D pueden ser los nucleótidos A o G o T; V puede ser A o G o C; y K puede ser G o T. Este conjunto de codón puede representar 18 diferentes codones y pueden codificar los aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly, y Cys.

El oligonucleótido o primer conjunto se puede sintetizar utilizando métodos estándar. Un conjunto de oligonucleótidos se puede sintetizar, por ejemplo, mediante síntesis de fase sólida, que contiene secuencias que representan todas las posibles combinaciones de las tripletas de nucleótido suministradas mediante el conjunto de codón y que codificarán el grupo deseado de aminoácidos.

La síntesis de los oligonucleótidos con la "degeneración" del nucleótido en ciertas posiciones es bien conocida en la técnica. Tales conjuntos de nucleótidos que tienen ciertos conjuntos de codón se pueden sintetizar utilizando sintetizadores de ácido nucleico comerciales (disponibles de, por ejemplo, Applied Biosystem, Foster City, CA), o se pueden obtener comercialmente, (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto un conjunto de oligonucleótidos sintetizados que tienen un conjunto de codón particular incluirán típicamente una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las diferencias establecidas por el conjunto de codón dentro de la secuencia total., Los oligonucleótidos, son utilizados de acuerdo con la invención, tienen secuencias que permiten la hibridización a un molde de ácido nucleico de dominio variable y también pueden incluir sitios de enzima de restricción para propósitos de clonación.

En un método, las secuencias de ácido nucleico que codifican aminoácidos variantes se pueden crear mediante mutagénesis mediada por oligonucleótido. Esta técnica es bien conocida en el arte como se describe en Zoller et al, *Nucleic Acids Res.* 10: 6487-6504 (1987), En resumen, las secuencias de ácido nucleico que codifican los aminoácidos variantes son creados al hibridizar un conjunto de

oligonucleótido que codifica los conjuntos de codón deseados a un molde de ADN, donde el molde es una forma de hebra simple del plásmido que contiene una secuencia de molde de ácido nucleico región variable. Después de la hibridización, la polimerasa de ADN se utiliza para sintetizar una segunda hebra complementaria entera del molde que incorporará así el iniciador de oligonucleótido, y contendrá los conjuntos de codones como se suministran por el conjunto de oligonucleótidos.

En general, los oligonucleótidos de al menos 25 nucleótidos de longitud se utilizan. Un oligonucleótido óptimo tendrá 12 a 15 nucleótidos que son completamente complementarios con el molde en cualquier lado del o los oligonucleótidos que codifican para el o las mutaciones. Esto asegura que el oligonucleótido se hibridizará adecuadamente a una molécula de molde de ADN de hebra simple. Los oligonucleótidos son fácilmente sintetizados utilizando técnicas conocidas en el arte tales como las descritas en Crea et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 5765 (1978).

El molde de ADN es generado por aquellos vectores que son derivados de los vectores M13 de bacteriófago (los vectores M13mp 18 y m13MP 19 comercialmente disponible son los adecuados), o aquellos vectores que contienen un origen de fago de hebra simple de replicación como se describió en Viera et al., *Meth. Enzymol.* 153: 3 (1987). Así, el ADN que puede ser mutado se puede insertar en uno de estos vectores con el fin de generar moldes de hebra simple. La producción del molde de hebra simple se describe en las secciones 4:21-4.41 de Sambrook et al., anterior.

Para alterar la secuencia de ADN nativo, el oligonucleótido se hibridiza a un molde de hebra simple bajo condiciones de hibridización adecuadas. Una enzima polimerizante de ADN, usualmente la polimerasa de ADN T7 o el fragmento Klenow de la polimerasa de ADN es luego agregada a la sintasa la hebra complementaria del molde utilizando el oligonucleótido como un iniciador para la síntesis. Una molécula heteroduplex es entonces formada de tal forma que una hebra de ADN codifica la forma montada del gen 1, y la otra hebra (el molde original) codifica la secuencia nativa, no alterada del gen 1. La molécula heteroduplex es luego transformada a una célula huésped adecuada, usualmente un procarionte tal como *E. coli* JM101. Después de agregar las células, ellas son puestas en placas sobre placas de azarosa y se seleccionan utilizando el iniciador

de oligonucleótido radiomarcado con 32-fosfato para identificar las colonias bacteriales que contienen en ADN mutado. El método descrito inmediatamente antes se puede modificar de tal forma que la molécula homodúplex se crea en donde ambas hebras del plásmido contienen el o las mutaciones. Las modificaciones son como siguen: el oligonucleótido de hebra simple es recocido al molde de hebra simple como se describió anteriormente. Es la mezcla de tres desoxiribonucleótidos, desoxiriboadenosina (dATP), desoxiriboguanosina (dGTP), y desoxiribotimidina (dTTP), se combina con una tiodesoxiribocitosina modificada denominada Dctp-(aS) (que se puede obtener de Amersham). Esta mezcla es agregada al complejo molde-oligonucleótido. Luego de la adición de la ADN polimerasa a esta mezcla, la hebra de ADN idéntica al molde excepto por las bases mutadas se genera. Además, esta nueva hebra de ADN contendrá dCTP-(aS) en lugar de dCTP, que sirve como protector de la digestión de endonucleasa de restricción. Después de que la hebra doble del heterodúplex de hebra doble es digerida con una enzima de restricción apropiada, la hebra del molde se puede digerir con una nucleasa ExoIII u otra nucleasa apropiada que pasa la región que contiene el o los sitios a ser mutagenizados. La reacción es luego detenida para dejar una molécula que es solo parcialmente hebra simple. Un homodúplex de ADN de hebra doble completo se transforma luego utilizando ADN polimerasa en la presencia de cuatro desoxiribonucleótido trifosfatos ATP, y ADN ligasa. La molécula homodúplex se puede entonces transformar en una célula huésped adecuada. Como se indicó, previamente la secuencia del conjunto de oligonucleótido es de suficiente longitud para hibridizar el ácido nucleico del molde y puede también, pero no necesariamente, contener sitios de restricción. El molde de ADN se puede generar mediante vectores que son derivados de los vectores del bacteriofago M13 que contienen un origen de fago de hebra simple de replicación como se describió en Viera et al. Meth. Enzimol. 153:3 (1987). Así, el ADN que va a ser mutado se debe insertar en uno de estos vectores con el fin de generar un molde de hebra simple. La producción del molde de hebra simple se escribe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook et al., *supra*. De acuerdo con otro método, la librería se puede generar al suministrar conjuntos de oligonucleótidos corriente arriba y corriente abajo, cada conjunto tiene una pluralidad de oligonucleótido con diferentes secuencias, las diferentes secuencias establecidas por los conjuntos de codón suministrados dentro de las secuencias de los oligonucleótido. Los conjuntos de oligonucleótidos corriente arriba y corriente abajo, junto con la secuencia de ácido nucleico de molde de domino variable, se

puede utilizar en la reacción de cadena de polimerasa para generar una "librería", de los productos PCR. Los productos PCR se pueden denominar como "casetes de ácido nucleico", en la medida en que ellas puedan ser fusionados con otras secuencias de ácido nucleico relacionada so no relacionadas, por ejemplo, proteínas de recubrimiento viral y dominios de dimerización, que utilizan técnicas de biología molecular establecidas.

La secuencia de los iniciadores PCR incluyen uno o más de los conjuntos de de codón designados para las posiciones accesibles de solvente y altamente diversas en una región hipervariable. Como se describió anteriormente, un conjunto de codón es un conjunto de secuencias de triplete de nucleótido diferente utilizadas para codificar los aminoácidos variantes deseados.

Los seleccionados de anticuerpo que cumplen los criterios deseados, como seleccionados a través de las etapas de selección o de escogimiento/selección apropiada se pueden aislar y clonar utilizando técnicas recombinantes.

Vectores, Células Huéspedes y Métodos Recombinantes

Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención, el ácido nucleico que codifica es aislado e insertado en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo es fácilmente aislado y secuenciado utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo al utilizar sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada o ligera del anticuerpo). Muchos vectores están disponibles. La escogencia del vector depende en parte de aquella célula a ser utilizada. En general, las células huésped preferidas son de cualquier origen procariótico o eucariótico (generalmente de mamífero).

Generar Anticuerpos Utilizando Células huésped Procarióticas:

Construcción de Vector.

Secuencias de polinucleótido que codifica los componentes de polipéptido del anticuerpo de la invención se pueden obtener utilizando técnicas recombinantes

estándar. Las secuencias de polinucleótido se pueden aislar y secuenciar de las células que producen anticuerpo como células hibridoma. Alternativamente, los oligonucleótidos se pueden sintetizar utilizando sintetizador de nucleótido o técnicas PCR. Una vez obtenido, las secuencias que codifican los polipéptidos son insertadas en un vector recombinante capaz de replicar y expresar los polinucleótidos heterólogos en huéspedes procarióticos. Muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la técnica se pueden utilizar para el propósito de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos a ser insertados en el vector y la célula huésped particular a ser transformada con el vector. Cada vector contiene varios componentes dependiendo de su función (amplificación o expresión del polinucleótido heterólogo, o ambos) y su compatibilidad con la célula huésped particular en la cual este reside. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no están limitados a: un origen de replicación, un gen de marcador de selección, un promotor, un sitio de unión de ribosoma (RBS), una secuencia de señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y la secuencia de terminación de transcripción.

En general, los vectores de plásmido que contienen helcón y secuencias de control que son derivadas de especies compatibles con la célula huésped son utilizados en relación con estos huéspedes. El vector ordinariamente lleva un sitio de replicación, así como también secuencias de marcación que son capaces de suministrar la selección genotípica en células transformadas. Por ejemplo, la *E. coli* es típicamente transformada utilizando pBR322, un plásmido derivado de *E. coli* de especies de *E. coli*. El pBR322 contiene genes que codifican la resistencia a la ampicilina (Amp) y la tetraciclina (Eet) y suministran así cualesquiera medios para identificar las células transformadas. El pBR322, sus derivados, y otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o ser modificados, para contener, promotores que se pueden utilizar en el organismo microbiano para la expresión de las proteínas endógenas. Ejemplos de derivados pBR322 utilizados para la expresión de anticuerpos particulares se describen en detall en Carter et al., U. S. Patente No. 5,648,237.

Además, los vectores de fago que contienen el replicón y las secuencias de control que son compatibles con el microorganismo huésped se pueden utilizar como vectores de transformación en relación con estos huéspedes. Por ejemplo,

el bacteriófago tal como el λ GEM.TM. -11 se puede utilizar para elaborar un vector recombinante que se puede utilizar para transformar las células huéspedes susceptibles tales como la *E. coli* LE932.

El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de de promotor-cistrón, que codifica cada uno de os componentes de polipéptido, Un promotor es una secuencia regulatoria no traducida localizada corriente arriba (5') a un cistrón que modula su expresión. Los promotores procarióticos típicamente caen en estas dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia los niveles crecientes de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a los cambios en la condición del cultivo, por ejemplo en la presencia o ausencia de un nutriente a un cambio de temperatura.

Un gran número de promotores reconocidos por una variedad de células huéspedes potenciales son bien conocidos. El promotor seleccionado puede estar operablemente ligado a un ADN de cistrón que codifica una cadena ligera y pesada al remover el promotor de la fuente de ADN por vía de digestión de enzima de restricción al insertar la secuencia promotora aislada en el vector de la invención. Ambas secuencias promotora nativas y muchos promotores heterólogos se pueden utilizar para dirigir la amplificación y/o la expresión de los genes blanco. En algunas modalidades, son utilizados promotores heterólogos, en la medida en que a ellos se les permite mayor transcripción y mayor producción del gen blanco expresado comparado con el promotor de polipéptido blanco nativo.

Los promotores adecuados para uso con huéspedes procarióticos incluyen un promotor de PhoA, los sistemas promotores de β -galactamasa y lactosa y el sistema de promotor triptófano (*trp*) y los promotores híbridos tales como el promotor *tac* o *tcr*. Sin embargo, otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacteriales o de fago conocidos) son también adecuados. Sus secuencias de nucleótido han sido publicadas, posibilitando de esta manera al experto ligar los operablemente acistrones que codifican la cadena ligera y pesada blanco (Siebenlist et al., (1980) utilizando ligadores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requeridos.

En un aspecto de la invención, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende una secuencia de señal de secreción que dirige la traslocación de los

polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o esta puede ser un ADN de polipéptido blanco que está insertado en el vector. La secuencia de señal seleccionada para el propósito de esta invención debe ser aquella que es reconocida y procesada (es decir clivada por una señal peptidasa) por medio de la célula huésped. Para la célula huésped procariótica que no reconoce y procesa las secuencias de señal nativas a los polipéptidos heterólogos, la secuencia de señal es sustituida por una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste de fosfatas alcalina, penicilina, lpp, o líderes de enterotoxina II (ST II) estables calientes LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una modalidad de la invención, la secuencia de señal utilizada en ambos citrones del sistema de expresión son las secuencias de señal STII o las variantes de estos.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención puede ocurrir en el citoplasma de la célula huésped, y por lo tanto no requiere la presencia de secuencias de señal de secreción dentro de cada cistron. A este respecto, la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina son expresadas, plegadas y ensambladas para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas huéspedes (por ejemplo la cepa *E. coli trxB*) suministran condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo de esta manera el plegamiento y el montaje adecuado de las subunidades de proteína expresadas. Proba and Pluckthun Gene 159:203 (1995).

La presente invención suministra un sistema de expresión en el cual la proporción cuantitativa de los componentes de polipéptido expresados se puede modular con el fin de maximizar el rendimiento de los anticuerpos secretados y adecuadamente ensamblados de la invención. Tal modulación se logra al menos en parte al modular simultáneamente las resistencias trasduccional para los componentes de polipéptido.

Una técnica para modular la resistencia trasduccional se describe en Simmons et al., U.S. Pat. No. 5,840,523. Esta utiliza variantes de la región de iniciación de trasduccional (TIR) dentro de cistron. Para un TIR, como una serie de variantes de secuencia de ácido de aminoácido o de ácido nucleico se pueden crear con un rango de resistencias de traducción, suministrando de esta manera unos medios

convencionales a los cuales ajustar este factor al nivel de expresión deseado de la cadena específica. Las variantes TIR se pueden generar mediante técnicas de mutagénesis convencional que dan como resultado en cambios del codón que pueden alterar la secuencia de aminoácido, aunque los cambios silentes en la secuencia de nucleótido se prefieren. Las alteraciones del TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o espaciamiento de las secuencias Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia de señal. El método para generar secuencias de señal multadas es la generación de un "banco de codón" al inicio de la secuencia de codificación que no cambia la secuencia de aminoácido de la señal de secuencia (es decir los cambios son silentes). Esto se puede lograr al cambiar la tercera posición de nucleótido de cada codón; adicionalmente, algunos aminoácidos, tales como la leucina, serina y arginina, tienen múltiples posiciones primera y segunda que pueden agregar complejidad en la elaboración del banco. Este método de mutagénesis se describe en detalle en Mansura et al. (1992) *METODOS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4:151-158.

Preferiblemente, un conjunto de vectores es generado con un rango de resistencias TIR para cada cistrón allí. Este conjunto limitado suministra una comparación de niveles de expresión de cada cadena así como también del rendimiento de los productos de anticuerpo deseados bajo varias condiciones de resistencias TIR. Las resistencias TIR se pueden determinar al cuantificar el nivel de expresión de un gen reportero como se describió con detalle en Simmons et al. Patente U.S. No. 5,840,523. Con base en la comparación de la resistencia transnacional, los TIR individuales deseados se seleccionan para ser combinados en las construcciones del vector de expresión de la invención.

Las células huéspedes procarióticas adecuadas para expresar anticuerpos de la invención incluyen Arqueobacterias y Eubacterias, tales como los organismos Gram negativos o Gram positivos. Ejemplos de bacterias útiles incluye *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacilli* (por ejemplo, *subtilis*), *Enterobacteria*, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella* *Tifimurium*, *Serratia* *marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, o *Paracoccus*. En una modalidad, se utilizan células Gram negativas. En una modalidad, las células de *E. coli* son utilizadas como huéspedes por la invención. Ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen cepas W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219;

ATCC Deposit No. 27,325) y derivados de éstos, que incluyen sepas 33D3 que tienen el genotipo W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) $ptr3$ lac lq $lacL8$ $\Delta ompT\Delta(nmpc-fepE)degP41$ kan^R (Patente U.S. No. 5,639,635). Otras sepas y derivados de éstas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31,537) y *E. coli* RV308 (atcc 31,608) también son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrados en lugar de métodos limitantes para construir derivados de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas que tienen genotipos definidos que son conocidas en la técnica y descritas en, por ejemplo, Bass *et al.*, Proteins, 8.309-314 (1990). Es generalmente necesario seleccionar las bacterias apropiadas que toman en consideración la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, *E. coli*, *Serratia*, o las especies de *Salmonella* pueden ser adecuadamente utilizadas como huéspedes cuando plásmidos bien conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177, o pKN410 son utilizados para suministrar el replicón. Típicamente la célula huésped debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y los inhibidores de proteasa adicionales pueden ser deseablemente incorporados en los cultivos de célula.

Producción de Anticuerpo

Las células huésped son transformadas con los vectores de expresión anteriormente descritos y cultivadas en medio de nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Los medios de transformación introducen ADN en el huésped procariótico de tal forma que el ADN es replicable, como un elemento extracromosomal o mediante un integrante cromosomal. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación es hecha utilizando técnicas estándar apropiadas a tales células. El tratamiento de calcio que emplea cloruro de calcio es generalmente utilizado para células bacterianas que contienen barreras de pared de célula sustanciales. Otro método para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Aún otra técnica utilizada es electroporación.

Las células procarióticas utilizadas para producir los polipéptidos de la invención crecen en medios conocidos en la técnica y son adecuadas en cultivos de las células huéspedes seleccionables. Ejemplos de medios adecuados incluyen

caldos luria (LB) más los suplementos de nutrientes necesarios. En algunas modalidades, el medio también contiene un agente de selección, escogido con base en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procarióticas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, la ampicilina se agrega al medio de crecimiento de las células que expresan el gen resistente a la ampicilina.

Cualquier suplemento necesario además del carbono, nitrógeno, y fuentes de fosfato inorgánico también se pueden incluir a una concentración apropiada introducida sola o como una mezcla con otro suplemento o medio tal como una fuente de nitrógeno complejo. Opcionalmente el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste de glutatona, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditiogeritrol y ditiotreitrol.

Las células huéspedes procarióticas son cultivadas a temperaturas adecuadas. Para el crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, los rangos de temperatura preferidos varían desde aproximadamente 20°C a 39°C, más preferiblemente desde aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C, aún más preferiblemente desde aproximadamente 30°C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varíe desde aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. Para *E. coli* el pH es preferiblemente desde aproximadamente 6.8 a aproximadamente 7.4, y más preferiblemente a aproximadamente 7.0.

Si se utiliza un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, la expresión de la proteína es inducida bajo condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, los promotores PhoA son utilizados para controlar la transcripción de los polipéptidos. De acuerdo con esto, las células huéspedes transformadas son cultivadas en un medio que limita el fosfato para inducción. Preferiblemente, el medio que limita el fosfato es el medio C.R.A.P. (ver, por ejemplo, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Una variedad de otros inductores pueden ser utilizados, de acuerdo a la construcción del vector empleado, como es conocido en la técnica.

En una modalidad, los polipéptidos expresados de la presente invención son secretados y recuperados del periplasma de las células huésped. La recuperación

de la proteína típicamente involucra la rotura del microorganismo, generalmente por tales medios como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que las células se han roto, los desechos de la célula o las células completas se pueden remover mediante centrifugación o filtración. Las proteínas pueden ser adicionalmente purificadas, por ejemplo, mediante cromatografía de resina de afinidad. Alternativamente, las proteínas se pueden transporar en el medio de cultivo y aislar allí. Las células se pueden remover del cultivo y del sobrenadante del cultivo siendo filtradas y concentradas para purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden ser adicionalmente aislados e identificados utilizando métodos comúnmente conocidos tales como electroforesis de gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo Western blot.

En un aspecto de la invención, la producción de anticuerpo es conducida en gran cantidad por procesos de fermentación. Varios procedimientos de fermentación con alimentación de tanga a gran escala están disponibles para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 100 litros de capacidad, preferiblemente aproximadamente 1,000 a 100,000 litros de capacidad. Estos fermentadores utilizan propulsores agitadores para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferida). Los fermentadores a pequeña escala se refieren generalmente a la fermentación en un fermentador que no tiene más de aproximadamente 100 litros en capacidad volumétrica, y pueden variar desde aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteína es típicamente iniciada después de que las células han crecido bajo condiciones adecuadas a una densidad deseada, por ejemplo, un OD₅₅₀ de aproximadamente 180-220, en la cual la etapa de las células están en una fase estacionaria temprana. Una variedad de inductores se pueden utilizar, de acuerdo con la construcción del vector empleado, como es conocido en la técnica y descrito anteriormente. Las células pueden crecer durante períodos cortos antes de la inducción. Las células son usualmente inducidas durante aproximadamente 12-50 horas, aunque se puede utilizar una inducción mayor o menor.

Para mejorar el rendimiento o calidad de la producción de los polipéptidos de la invención, se pueden modificar las condiciones de fermentación. Por ejemplo, para

157

mejorar el montaje adecuado y el plegamiento de los polipéptidos de anticuerpo secretados, los vectores adicionales que sobre expresan las proteínas chaperona, tales como las proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y o DsbG) o FkpA (un peptidilpropil cis,trans-isomerasa con actividad chaperona) se pueden utilizar para co-transformar las células procarióticas huésped. Las proteínas chaperona han demostrado facilitar el plegamiento adecuado y la solubilidad de las proteínas heterólogas producidas en células huéspedes bacteriales. Chen et al. (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605; Georgiou et al., Patente U.S. No. 6,083,715; Georgiou et al., Patente U.S. No. 6,027,888; Bothmann and Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie et al. (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

Para minimizar la proteólisis de las proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son proteolíticamente sensibles), ciertas cepas huésped deficientes para enzimas proteolíticas se pueden utilizar para la presente invención. Por ejemplo, las cepas de célula huésped se pueden modificar para efectuar mutación o mutaciones genéticas en los genes que codifican las proteasas bacteriales conocidas tales como la Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de éstas. Algunas cepas deficientes en proteasa *E. coli* están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly et al. (1998), *supra*; Georgiou et al., Patente U.S. No. 5,264,365; Georgiou et al., Patente U.S. No. 5,508,192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

En una modalidad, las cepas de *E. coli* deficientes en enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobre expresan una o más proteínas chaperona son utilizadas como células huésped en el sistema de expresión de la invención.

Purificación de Anticuerpo

En una modalidad, la proteína de anticuerpo producida aquí es purificada adicionalmente para obtener las preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos y usos adicionales. Los métodos de purificación de proteína estándar conocidos en la técnica se pueden emplear. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento o inmunoafinidad o columnas de intercambio de ión, precipitación

de etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice o sobre resina de intercambio de catión tal como DEAE, cromatoforo, SDS-PAGE, precipitación de sulfato de amonio, y filtración de gel utilizando, por ejemplo, Sefadex G-75.

En un aspecto, la Proteína A inmovilizada sobre la fase sólida se utiliza para purificación de inmunoadfinidad de los productos de anticuerpo de longitud completa de la invención. La proteína A es una proteína de pared celular 41kD de *Staphylococcus aureus* que se une con una alta afinidad a la región Fc de los anticuerpos. Lindmark et al (1983) *J. Immunol. Methods* 62:1-13. La fase sólida a la cual la Proteína A se inmoviliza es preferiblemente una columna que comprende una superficie vítrea o de sílice, más preferiblemente una columna de vidrio porosa controlada o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento por evitar la adherencia no específica de contaminantes.

En una primera etapa de purificación, la preparación derivada del cultivo celular como se describió anteriormente se aplica sobre la fase sólida inmovilizada de Proteína A para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la proteína A. La fase sólida es luego lavada para remover los contaminantes no específicamente unidos a la fase sólida. Finalmente el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida mediante elución.

Generar anticuerpos utilizando células huéspedes eucarióticas:

Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento mejorador, un promotor, y una secuencia de terminación de transcripción.

(i) Componente de secuencia de señal

Un vector para uso en una célula huésped eucariótica puede también contener una secuencia de señal u otro polipéptido que tiene un sitio de clivaje específico en el N-terminal de la proteína madura o polipéptido de interés. La secuencia de señal heteróloga seleccionada preferiblemente es aquella que es reconocida y procesada (es decir, clivada por una peptidasa de señal) por la célula huésped. En la expresión de célula de mamífero, las secuencias de señales de mamífero así

UN

como también los líderes de secretorios virales, por ejemplo, la señal de herpes simples gD, están disponibles.

El ADN para tal región precursora está ligado en la estructura de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

ii) Origen de replicación

Generalmente, un componente de replicación de origen no es necesario para los vectores de expresión de mamífero. Por ejemplo, el origen SV40 puede típicamente ser utilizado solamente porque éste contiene el promotor temprano.

iii) Selección del componente de gen

Los vectores de expresión y de clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican las proteínas que (a) confieren resistencia a los antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementa las deficiencias auxotrópicas, donde sea relevante, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios de complejo.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza una droga para disminuir el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que son exitosamente transformadas con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a la droga y así sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de tal selección dominante utiliza las drogas neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellos que posibilitan la identificación de células competentes para tomar el ácido nucleico de anticuerpo, tal como DHFR, timidina quinaza, metalotioneina-I y -II, preferiblemente genes de metalotioneina de primate, adenosin deaminaza, ormitina descarboxilasa, etc.,

Por ejemplo, las células transformadas con gen de selección DHFR son primero identificadas al cultivar todos los transformantes en un medio de cultivo que

contiene metotrexato (Mtx), un agonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada cuando se emplea un DHFR tipo silvestre es la línea de célula de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Alternativamente, las células huéspedes (particularmente los huéspedes tipo silvestre que contiene DHFR endógeno) transformados o co-transformados con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, una proteína de DHFR tipo silvestre, y otro marcador seleccionable tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferaza (APH) se puede seleccionar mediante crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección un agente de selección para el marcador seleccionable tal como tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, Canamicina, neomicina, o G418. Ver Patente U.S. No. 4,965.199.

(iv) Componente promotor

la expresión y los vectores de clonación usualmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y esta operablemente ligado al ácido nucleico de polipéptido de anticuerpo. Las secuencias promotoras son conocidas por los eucariotes. Virtualmente los genes aleucarióticos tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases corriente arriba del sitio donde se inició la transcripción. Otra secuencia encontró 70 a 80 bases corriente arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT donde el N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos se encuentra una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola Poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas las secuencias son adecuadamente insertadas en los vectores de expresión eucariótica.

La transcripción del péptido de anticuerpo proveniente de los vectores en las células de huésped de mamífero se controla, por ejemplo, mediante los promotores obtenidos de los genomas de los virus tales como virus polioma, virus de la virola del pollo, adenovirus (tales como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma de ave, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B y virus 40 de Simio (SV40), de promotores de mamífero heterólogo, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de los promotores de

choque térmico, siempre y cuando tales promotores sean compatibles con los sistemas de célula huésped.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 son convenientemente obtenidos como un fragmento de restricción SV40 que también contiene el origen viral SV40 de la replicación. El promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano es convencionalmente obtenido como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar el ADN en mamífero huésped que utiliza el virus del papiloma bovino como un vector se describe en la Patente U.S. No. 4,419,446. Una modificación de este sistema también se describe en la Patente U.S. No. 4,601,978. Ver también Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) sobre la expresión de cADN de β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa proveniente del virus de herpes simplex. Alternativamente, la repetición terminal larga del Virus Rous Sarcoma se puede utilizar como el promotor.

(v) Componente del elemento mejorador

La transcripción del ADN que codifica el polipéptido de anticuerpo de esta invención mediante eucariotes superiores es a menudo incrementada al insertar una secuencia mejoradota en el vector. Muchas secuencias mejoradotas son ahora conocidas de los genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Típicamente, sin embargo, uno utilizará un mejorador de un virus de la célula eucariótica. Ejemplos incluyen el mejorador SV40 sobre el lado tardío del origen de replicación (bp 100-270), el mejorador del promotor temprano de citomegalovirus, el mejorador de polioma sobre el lado tardío del origen de replicación, y los mejoradores de adenovirus. Ver también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) sobre mejorar los elementos para la activación de los promotores eucarióticos. Este mejorador se puede aplicar en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia que codifica el polipéptido de anticuerpo, pero esta preferiblemente localizado en el sitio 5' del promotor.

(vi) Componentes de terminación de transcripción

Los vectores de expresión utilizados en células huéspedes eucarióticas típicamente también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la

transcripción y para estabilizar el mRNA. Tales secuencias están comúnmente disponibles de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de los ADN o cADN eucarióticos o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótido transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del mRNA que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de transcripción útil en la región de poliadenilación de hormona de crecimiento bovino. Ver WO94/11026 y el vector de expresión descrito allí.

(vii) Selección y transformación de las células huéspedes

Las células huéspedes adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores aquí incluyen células eucarióticas superiores descritas aquí, que incluyen células huéspedes de vertebrado. La propagación de las células de vertebrado en el cultivo (cultivo de tejido) se ha vuelto un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas de células huéspedes de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o 293 células subclonadas para crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Viro.* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster cachorro (BHK, ATCC CCL 10); células/DHFR de ovario de hámster chino (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); células de sertoli ratón (TM4, Mather, *Biol. reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hematoma humana (Hep G2).

Las células huéspedes se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para la producción de anticuerpos y cultivados en medios de nutriente convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) Cultivo de Células huéspedes

Las células huéspedes utilizadas para producir un anticuerpo de esta invención se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios comercialmente

disponibles tales como el Ham's F10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Medio Esencial Mínimo (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y el Medio de Eagle Modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células huéspedes. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), Patente U.S. Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; o 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; o la Patente U.S. Re. 30,985 se pueden utilizar como medio de cultivo para las células huéspedes. Cualquiera de estos medios podría ser suplementario según sea necesario con las hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como la insulina, transferina, o un factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), amortiguadores (tales como HEPES), nucleótidos (tal como adenosina y timidina) antibióticos (tal como la droga GENTAMICINTM), elementos en trazas (definidos como compuestos inorgánicos usualmente presentes a las concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquiera otros suplementos necesarios también se pueden incluir en las concentraciones apropiadas que se conocerán de aquellos expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, pH, y similar, son aquellos previamente utilizados con la célula huésped seleccionada para la expresión, y será evidente para el experto.

(ix) Purificación de anticuerpo

Cuando se utilizan técnicas de recombinación, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, o secretar directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, los desechos de partícula, sea de células huéspedes o fragmentos lizados, se remueven, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Donde el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión son generalmente primero concentrados utilizando un filtro de concentración de proteína comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa como un PMSF se puede incluir en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y los antibióticos se pueden incluir para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpo preparada de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de actividad la técnica de purificación preferida. La adecuabilidad de la proteína A como el ligando de afinidad depende de las especies y el isotipo del dominio Fc de la inmunoglobulina que esta presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que están basados en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark et al., J. Immunol. Match. 62:1-13 (1983)). La proteína G es recomendada para todos los isotipos de ratón y para el $\gamma 3$ humano (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la cual el ligando de afinidad esta unido es más a menudo agarosa pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como el vidrio de poro controlado o el poli(estireno-divinil) benceno permite las tasas de flujo más rápidas y los tiempos de procesamiento más cortos que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_H3 , la resina Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para purificación. Otras técnicas para purificación de proteína tales como el fraccionamiento sobre una columna de intercambio de ion, precipitación de etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía de SEPHAROSE™ de heparina o una resina de intercambio de anion o cation (tal como una columna de ácido poliaspartico), cromatografía de afinidad, SDS-PAGE, y precipitación de sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo a ser recuperado.

Luego están la etapa o etapas de purificación preliminar la mezcla que comprende el anticuerpo o de interés y los contaminantes se pueden someter a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo utilizando un amortiguador de elusión en un pH de entre aproximadamente 2.5-4.5, preferiblemente desarrollado con concentraciones bajas de sal (por ejemplo desde aproximadamente 0-0.25M de sal)

Ensayos de Actividad

Los anticuerpos de la presente invención se pueden caracterizar por sus propiedades físicas/químicas y las funciones biológicas de varios ensayos conocidos en la técnica.

Las inmunoglobulinas purificadas se pueden caracterizar adicionalmente por una serie de ensayos que incluyen, pero no están limitados a, secuenciación N-terminal, análisis de aminoácido, cromatografía líquida de alta presión con ensayo de tamaño no desnaturizante (HPLC), espectrometría de masa, cromatografía de intercambio de ion y digestión de papaína.

En ciertas modalidades de la invención, las inmunoglobulinas producidas aquí son analizadas por su actividad biológica. En algunas modalidades, las inmunoglobulinas de la presente invención son ensayadas para su actividad de unión de antígeno. Los ensayos de unión de antígeno que son conocidos en la técnica y se pueden utilizar aquí incluyen sin limitación cualquier ensayo de unión directo o competitivo utilizando técnicas tales como los western blots, los radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado encima), inmunoensayos "sándwich" ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, e inmunoensayos de proteína A. Un ensayo que se une al antígeno ilustrativo es suministrado adelante en la sección de ejemplos.

En una modalidad, la presente invención contempla un anticuerpo alterado que posee algunas pero no todas las funciones efectuadas, que lo hacen un candidato deseable para muchas aplicaciones en la cual la vida media del anticuerpo in vivo es importante si aun ciertas funciones efectuatoras (tales como el complemento del ADCC) sean necesarias o deletéreas. En ciertas modalidades, las actividades Fc de la inmunoglobulina producida medida para asegurar que únicamente las propiedades deseadas se mantengan. Los ensayos de citotoxicidad in Vitro y/o in vivo se pueden conducir para confirmar la producción/supresión de CDC y/o actividades ADCC. Por ejemplo, el receptor Fc (FcR) que se une a los ensayos se puede conducir para asegurar que al anticuerpo le falta la unión FcγR (aquí probablemente falta la actividad ADCC) pero retiene la capacidad de unión FcRn. Las células primarias para mediar a ADCC, células NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan la expresión FcγRI, FcγRII y FcγRIII la expresión sobre células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 de la pagina 464 de Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). UN ejemplo de un ensayo in Vitro para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describe en la patente US No. 5,500,362 o 5,821,337. Las células efectuatoras útiles para tales ensayos

incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK).

Alternativamente o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede ser evaluada in vivo, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998). El ensayo de unión a Clq también se puede llevar a cabo para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a Clq y de esta manera les falta la actividad CDC. Para evaluar la activación competente, un ensayo CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996), se puede desarrollar. La unión FcRn y el espaciamiento/determinaciones de vida media in vivo también se pueden desarrollar utilizando los métodos conocidos en el arte, por ejemplo aquellos descritos en la sección de ejemplos.

Anticuerpos Humanizados

La presente invención comprende anticuerpos humanizados. Varios métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácido introducidos en este desde una fuente que es no humana estos residuos de aminoácido no humano son a menudo denominados como residuos "de importación", que son típicamente tomados del dominio variable de "importación". La humanización puede ser esencialmente desarrollada luego de que el método de Winter y los co-trabajadores (Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536), al sustituir las secuencias de región hipervariable por las secuencias correspondientes del anticuerpo humano. De acuerdo con esto, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente U.S No 4,816,567) en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto será sustituido por la secuencia correspondiente de especies no humanas. La práctica, los anticuerpos humanizados son anticuerpos típicamente humanos en los cuales algunos residuos de región hipervariable y posiblemente algunos residuos FR son sustituidos por residuos de los sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La selección de los dominios variables humanos, tanto como ligero como pesado, a ser utilizados en la elaboración de los anticuerpos humanizados es importante

para reducir la antigenicidad. De acuerdo al método así llamado "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable del anticuerpo del roedor es seleccionada contra la librería completa de las secuencias de dominio variable humanas conocidas. Las secuencias humanas que son más cercanas a los roedores son luego aceptadas como la estructura humana para el anticuerpo humanizado (ver et al. (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901. Otros métodos utilizan una estructura particular derivada de la secuencia de consenso para todos los anticuerpos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. La misma estructura se puede utilizar para varios diferentes anticuerpos humanizados (Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta et al. (1993) J. Immunol., 151:2623.

Es adicionalmente que los anticuerpos sean humanizados con la retención de la alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr esta meta, de acuerdo con un método, las propiedades humanizadas son preparadas mediante un proceso de análisis de las secuencias parientes y varios productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parientes o humanizadas. Tres modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para aquellos expertos en la técnica. Los programas de computador están disponible los cuales ilustran y despliegan estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulina candidata seleccionadas. Las inspecciones de estos despliegues permiten el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata es decir el análisis que influyen la capacidad de la inmunoglobulina candidata a unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR pueden ser seleccionados y combinados de secuencias receptoras e importantes de tal forma que las características de anticuerpo deseadas, tales como los residuos estén directamente y más sustancialmente involucrados en influenciar la unión de antígeno.

Variantes de Anticuerpo

En un aspecto, la invención suministra un fragmento de anticuerpo que comprende las modificaciones en la interfase de los polipéptidos Fc que comprenden la región Fc, en donde las modificaciones facilitan y/o promueven la eterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en el

primer polipéptido de Fc y una cavidad en el segundo polipéptido de Fc, en donde la protuberancia es posicionable en la cavidad con el fin de promover la complejidad del primer y segundo polipéptido Fc. Los métodos para generar anticuerpos con estas modificaciones son conocidos en el arte, por ejemplo, como se describe en la patente U.S. No. 5,731,168.

En algunas modalidades, el o las modificaciones de secuencia de aminoácido de los anticuerpos descritos aquí se contemplan. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácido del anticuerpo son preparadas al introducir los cambios de nucleótido apropiados en el ácido nucleico y anticuerpo, o mediante la síntesis de péptido. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, las supresiones de, y/o la inserción en y/o las sustituciones de residuos dentro de secuencias de aminoácido del anticuerpo. Cualquier combinación de supresión, inserción, y sustituciones se hace para llegar a la construcción final, siempre y cuando la construcción final posea las características deseadas.

Las alteraciones del aminoácido se pueden introducir en la secuencia de aminoácido del anticuerpo objeto al momento en que se hace la secuencia.

Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son sitios preferidos para las mutaciones se denominan "mutagénesis de exploración de alanina" como se describió por Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. Aquí, un residuo o grupo de residuos blancos son identificados (por ejemplo residuos cargados tales como arg, asp, his, lys, and glu) y reemplazados por aminoácidos neutros o negativamente cargados (mas preferiblemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con antígeno. Los sitios de aminoácido que demuestran sensibilidad funcional a la sustitución son entonces refinados al introducir variantes adicionales o para, los sitios de sustitución.

Así, aunque el sitio para introducir la variación de la secuencia de aminoácidos esta predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita ser predeterminada. Por ejemplo, al analizar el desempeño de la mutación aun sitio dado, la exploración ala de la mutagénesis aleatoria se conduce en el codón o la

163

región blanco y las inmunoglobulinas expresadas son seleccionadas para la actividad deseada.

Las inserciones de la secuencia de aminoácido incluyen fusiones amino y/o carboxil-terminales que varían en longitud desde un residuo a los polipéptidos que contienen cientos o más residuos, así como también inserciones de intrasecuencia de residuos de aminoácido simples o múltiples. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionil N-terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes insercionales de la molécula de anticuerpo incluye la fusión del terminal N- o c- del anticuerpo a un enzima (por ejemplo a un ADEPT) o un polipéptido que incrementa la vida media del suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las regiones hipervariables, pero las alteraciones FR también se contemplan. Las sustituciones conservadoras son mostradas en la tabla 2 bajo el encabezamiento de “sustituciones preferidas”. Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces más cambios sustanciales, denominados “sustituciones de ejemplo” en la tabla 2, o descritas adicionalmente adelante en referencia a las clases de aminoácido, se pueden introducir y seleccionar los productos.

TABLA 2

Residuo original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Asp;Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu;Asn	Glu
Cys (C)	Ser;Ala	Ser
Gln (Q)	Asn;Glu	Asn
Glu (E)	Asp;Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg

Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Residuo original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe Ala; Norleucine	Leu

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran al seleccionar las sustituciones que difieren significativamente en su efecto o mantener (a) la estructura de el esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, una conformación de lamina helicoidal (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio blanco, o (c) la masa de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo a las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (in A.L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

- (1) no polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (p), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polar no cargada: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácida: Asp (D), Glu (E)
- (4) básica: Lys (K), Arg (R), His (H)

Alternativamente, los residuos de ocurrencia natural se pueden dividir en grupos basados en las propiedades de cadena lateral común:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

- (2) hirofilica neutra: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln
- (3) Acida: Asp, Glu
- (4) Basica: His, Lys, Arg;
- (5) Residuos que influncian la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) Aromática: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implican intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Tales residuos sustituidos también se pueden introducir en los sitios de sustitución conservadora o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

Un tipo de variante sustitucional involucra sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo padre (por ejemplo un anticuerpo humanizado o humano). En general, la o las variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con relación al anticuerpo padre del cual ellas se generan. Una forma conveniente para generar tales variantes sustitucionales, involucran la maduración de afinidad utilizando el despliegue de fago. En resumen, varios sitios de región hipervariable (por ejemplo 6-7 sitios) son mutados para generar todas las posibles sustituciones de aminoácido en cada sitio. Los anticuerpos así generados son despegados de las partículas de fago filamentosa como fusiones al producto de gen III del M13 empacado dentro de cada partícula. Las variantes desplegadas por el fago son entonces seleccionadas para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se describen aquí. Con el fin de identificar los sitios de región hipervariable candidatos para la modificación, la mutagénesis de exploración de alanita se puede desarrollar para identificar los residuos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión de antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser benéfico analizar la estructura de cristal del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo a las técnicas elaboradas aquí. Una de tales variantes se genera, el panel de las variantes se somete a selección como se describe aquí y los anticuerpos con sus propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes se pueden seleccionar para desarrollo adicional.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de la secuencia de aminoácido del anticuerpo se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no están limitados a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácido de ocurrencia natural) o la preparación de mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida de sitio), mutagénesis PCR, y mutagénesis de cassette de una variante preparada temprana o una versión no variante del anticuerpo.

Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácido en la región Fc de los polipéptidos de inmunoglobulina de la invención, generando de esta manera una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, región IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 Fc humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido que incluyen aquella de una cisteína pivote.

De acuerdo con esta descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunas modalidades, un anticuerpo utilizado en métodos de la invención pueda comprender una o más alteraciones comparados con el anticuerpo contraparte tipo silvestre, por ejemplo en la región Fc. Estos anticuerpos, sin embargo, retendrán sustancialmente la mismas características requeridas para la utilidad terapéutica comparados con sus contrapartes tipo silvestre. Por ejemplo, se cree que ciertas alteraciones se pueden hacer en la región Fc que darían como resultado en una unión Clq alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC), por ejemplo, como se describió en la WO99/51642. Ver también Duncan & Winter *Nature* 322:738-40 (1988); Patente US No. 5,648,260; Patente US No. 5,624,821; y WO94/29351 que relaciona otros ejemplos de las variantes de región Fc.

Inmunosconjugados

La invención también corresponde a inmunosconjugados, o conjugados de anticuerpo-droga (ADC), que comprende un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, una droga, un agente inhibidor de crecimiento, una toxina (por ejemplo una toxina enzimáticamente activa de

bacterias, hongos, plantas, o de origen animal, o fragmentos de éstos), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

El uso de los conjugados anticuerpo-droga para el suministro local de los agentes citotóxicos o citoestáticos, es decir, las drogas que matan o inhiben las células tumorales en los tratamientos de cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172; patente U.S. 4,975,278) teóricamente permiten el suministro diseccionado de la porción de droga a los tumores, y la acumulación intracelular allí, donde la administración sistémica de estos agentes de droga no conjugados puede resultar en niveles inaceptables de toxicidad para las células normales así como también las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin et al., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506). La eficacia máxima con la toxicidad mínima se busca de esta forma. Ambos anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales se han reportado como útiles en estas estrategias (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Las drogas utilizadas en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato, y vindesina (Rowland et al., (1986) *supra*). Las toxinas utilizadas en conjugados de toxina de anticuerpo incluyen toxinas bacterianas tales como toxina de difteria, toxinas de planta tales como ricina, toxinas de molécula pequeña tales como geldanamicina (Mandler et al (2000) *Jour. Of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), y caliqueamicina (Lode et al(1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al (1993) *Cancer Res.*53:3336-3342). Las toxinas pueden efectuar sus efectos citotóxicos y citoestáticos mediante mecanismos que incluyen la unión de tubulina, la unión de ADN, o la inhibición de topoisomerasa. Algunas drogas citotóxicas tienden a ser inactivas o menos activas cuando se conjugan a grandes anticuerpos o a ligandos receptores de proteína.

La ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 de murino dirigido contra el antígeno CD20 encontrado sobre la superficie de los linfocitos

normales y malignos B y el radioisótopo ^{111}In o ^{90}Y unido a un quelador ligador de tiourea (Wiseman et al (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). Aunque el ZEVALIN tiene actividad contra linfoma no Hodgkin de célula B (NHL), la administración resulta en citopenias severas y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MILOTARGTM (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de droga de anticuerpo compuesto de un anticuerpo hu CD33 ligado a la caliqueamicina, se aprobó en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; Patentes US No. 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). El cantuzumab mertansine (Immunogen, Inc.), un conjugado de droga de anticuerpo compuesto del anticuerpo huC242 ligado por vía del ligador bisulfuro SPP a la porción de droga maitansinoide, DM1, esta avanzando en los ensayos Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tal como el de colon, pancreático, gástrico, y otros. El MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de droga de anticuerpo compuesto de un anticuerpo monoclonal de antígeno de membrana específico anti-próstata (PSMA) ligado a la porción de droga maitansinoide, DM1, esta bajo desarrollo para el tratamiento potencial de tumores de próstata. Los péptidos auristatina, auristatina E (AE), monometilauristatina E (MMAE), y análogos sintéticos de dolastatina, fueron conjugados a anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos a Lewis Y sobre carcinoma) y cAC10 (específicos a CD30 sobre malignidades hematológicas)(Doronina et al. (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; y Francisco, et al. (2003) Blood, 102, 1458-1465) y están bajo desarrollo terapéutico. Otros compuestos para uso como agentes citotóxicos conjugados de droga incluyen sin limitación auristatina E (AE), MMAF (una variante de la auristatina E (MMAE) con una fenilalanina en el Terminal C de la droga), y AEVB (auristatina E valeril bencilhidrazona, un ligador lábil ácido a través del Terminal C de AE). Los ligadores de conjugado útiles para unir una droga a un anticuerpo incluyen sin limitación MC (maleimidocaproil), Val Cit (valina-citrulina, sitio de dipéptido en ligador clivable de proteasa), Citrulina (ácido 2-amino-5-ureido pentanóico), PAB (p-aminobencilcarbamoilo, una porción "auto inmoladora" del ligador), Me (N-metil-valina citrulina donde la unión del péptido ligador se ha modificado para evitar su clivaje mediante catepsina B), MC(PEG)6-OH (maleimidocaproil-polietilenglicol, unido a cisteínas de anticuerpo), SPP (N-Succinimidil 4-(2-piridiltio)pentanoato), y

121

SMCC(N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato). Éstas y otros conjugados de droga útiles y su preparación se describen, por ejemplo, en Doronina, S.O. et al., *Nature Biotechnology* 21:778-794 (2003), incorporados aquí como referencia en su totalidad. Las moléculas ligadoras particularmente preferidas incluyen, por ejemplo, N-Succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato(SPDP)(ver, por ejemplo, Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173, 723-737 (1978)), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB)(ver, por ejemplo, la Patente U.S. No. 4,563,304), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP)(ver, por ejemplo, CAS Registry número 341498-08-6), N-succinimidil 4-(maleimidometil)ciclohexano-1- carboxilato (SMCC)(ver, por ejemplo, Yoshitake et al., *Eur. J. Biochem.*, 101, 395-399 (1979)), y N-succinimidil 4-metil-4-[2-(5-nitropiridil)-ditio]pentanoato (SMNP)(ver, por ejemplo, Patente U.S. No.4,563,304).

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de éstos que se pueden utilizar incluyen la cadena A de difteria, los fragmentos activos no ligantes de la toxina de difteria, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena de ricin A, la cadena de abrin A, la cadena de modecin A, alfa-sarcin, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas de *fitolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), el inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricótesenos. Una variedad de radionuclidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , y ^{186}Re . Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se hacen utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoi)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoi)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como, tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de fluor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, la inmunotoxina de ricina se puede preparar como se describió en Vitetta *et al.*, *Science*, **238**: 1098(1987). El ácido 1- isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminopentaacético marcado con

172

carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante de ejemplo para la conjugación de radionucleótido al anticuerpo. Ver WO94/11026.

Los conjugados de un anticuerpo y una o más de las toxinas de molécula pequeña, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, tricoteceno, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan aquí.

Maitansina y Maitansinoides

En una modalidad, un anticuerpo (longitud completa o fragmentos) de la invención se conjuga a una o más moléculas maitansinoide.

Los inhibidores maitansinoides son mitóticos los cuales actúan al inhibir la polimerización de tubulina. La maitansina fue primero aislados del arbusto africano del este *Maytenus serrata* (Patente U.S. No. 3,896,111). Subsecuentemente, se descubrió que ciertos microbios también producían maitansinoides tales como maitansinol y C-3 maitansinol ésteres (Patente U.S. No. 4,151,042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos de éste se describen, por ejemplo en las Patentes U.S. No. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821, 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; y 4,371,533, cuyas descripciones se incorporan aquí expresamente como referencia.

Conjugados Maitansinoide-anticuerpo

En un intento para mejorar el índice terapéutico, la maitansina y los maitansinoides se han conjugado a anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de célula tumoral. Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico se describe, por ejemplo, en las Patentes U.S. No. 5,208,020; 5,416,064 y en la Patente Europea EP 0 425 235 B1, cuya descripción se incorpora expresamente aquí como referencia. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describe inmunoconjugados que comprenden el maitansinoide designado DM1 ligado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorectal humano. El conjugado se encontró por ser altamente

citotóxico hacia células de cáncer de colon cultivadas, y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento de tumor *in vivo*.

Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) describe inmunos conjugados en los cuales el maitansinoide se conjugó por vía de un ligador bisulfuro al anticuerpo de murino A7 que se une a líneas celulares de cáncer de colon antígeno sobre humano, o a otro anticuerpo monoclonal de murino TA.1 que se une al encogen HER-2/*neu*. La citotoxicidad del conjugado maitansinoide TA.1 se ensayó *in vitro* sobre la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa antígenos de superficie 3×10^5 HER-2 por célula. El conjugado de droga logró un grado de citotoxicidad similar a la droga maitansinoide libre, que se podría incrementar al incrementar el número de moléculas maitansinoides por molécula de anticuerpo. El conjugado maitansinoide A7 mostró citotoxicidad sistémica baja en ratones.

Conjugados anticuerpo-maitansinoide (inmunos conjugados)

Los conjugados anticuerpo-maitansinoide se preparan al ligar químicamente un anticuerpo a una molécula maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o de la molécula maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas maitansinoides conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia para mejorar la citotoxicidad de las células blanco sin afectar negativamente la función o la solubilidad del anticuerpo, aunque aún una molécula de toxina/anticuerpo se esperaría que mejorara la toxicidad sobre el uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o aislar de fuentes naturales. Los maitansinoides adecuados se describen, por ejemplo, en la Patente U.S. No. 5,208,020 y en las otras patentes y publicaciones no patentes referidas anteriormente. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula maitansinol, tales como varios ésteres de maitansinol.

Existen muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para elaborar conjugados anticuerpo-maitansinoide, que incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en la Patente U.S. No. 5,208,020 o la Patente EP 0 425 235 B1, y Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992). Los grupos de enlace incluyen grupos

bisulfuro, grupos tioeter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles peptidasa, o grupos lábiles estearasa, como se describieron en las patentes anteriormente identificadas, los grupos bisulfuro y tioeter son los preferidos.

Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide se puede hacer utilizando una variedad de agentes acoplantes de proteína bifuncional tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-acido (tales como bis(p-acidobenzoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como, tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP)(Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 [1978]) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para suministrar un enlace bisulfuro.

El ligador puede estar unido a una molécula maitansinoide en varias posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, se puede formar un enlace éster por la reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede ocurrir en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una modalidad preferida, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o un análogo de maitansinol.

Caliqueamicina

Otro immunoconjugado de interés comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia caliqueamicina de antibióticos son capaces de producir cortes de ADN de doble hebra en concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de los conjugados de la familia caliqueamicina, ver patentes estadounidenses 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (todas otorgadas a American Cyanamid company). Análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden utilizar incluso, pero no

179

se limitan nada, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetyl- γ_1^I , PSAG y θ_1^I (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las patentes estadounidenses otorgadas a American Cyanamid mencionadas anteriormente). Otra droga anti tumor que el anticuerpo puede conjugar es QFA que es un anti folato. La caliqueamicina y el QFA tienen sitios intracelulares de acción y no cruza fácilmente la membrana del plasma. Por lo tanto, la toma celular de estos agentes a través del anticuerpo mediado por la internalización mejor grandemente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

otros agentes anti tumor que se pueden conjugar con los anticuerpo de la invención incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5- fluororacilo la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrito en las patentes Estadounidenses 5,053,394, 5,770,710, así como también esperamicinas (patente Estadounidense 5,877,296).

Enzimáticamente activos de estos que se pueden utilizar incluyen cadena de difteria A, fragmentos sin unión activos de toxina difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena abrina A, cadena modexina A, alpha-sarcin, proteínas alleurites fordii, proteínas dianthin, proteínas fitolaca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica cahrantia, Curcin, crotin, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonin, mitelogenin, restrictocin, fenomicina, enomicina y los tricótesenos. Ver, como por ejemplo, la WO 93/21232 publicada en octubre 28, 1993.

La presente invención contempla adicionalmente un immuno conjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con una actividad núcleo lítica (por ejemplo, una ribunocleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirebunocleasa; de DNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Una variedad de isótopos radiactivos están disponibles para la producción de anticuerpos radio conjugados. Ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se utiliza para la detección, este puede comprender un átomo

radioactivo para estudios sintigráficos, por ejemplo ^{99m}Tc o ^{123}I , o una etiqueta de giro para formación de imagen de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocido como formación de imágenes de resonancia magnética, irm), tal como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbón-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso, o hierro.

El radio u otras etiquetas se pueden incorporar el en conjugado en formas conocidas. Por ejemplo, Péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar por síntesis de aminoácido químico utilizando precursores de aminoácidos adecuados que involucran, por ejemplo, el flúor-19 en lugar de hidrogeno. Etiquetas tales como ^{99m}Tc o ^{123}I , ^{186}Re , ^{188}Re e ^{111}In se pueden unir por vía de un residuo de cisteína en el péptido. El Yttrium-90 se puede unir por vía de un residuo lisina. El método IODOGEN (Frarker et al (1978) Biochem Biophys Res Commun 80:49-57 se puede utilizar para incorporar el Yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunosciintigraphy" (Chatal, CRC press 1989) describe otros métodos en detalle.

Los con jugados del agente citotóxico y anticuerpo se pueden hacer utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tal como N-succinimidil-3-(2-pyridyldithio) propionato (SPDP), succiminidil-4-(N-maleimidomethyl) cicloexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoesteres (tal como HCL adipimidato dimetilo), esterres activos (tal como suberato bisuccinimililo), aldehídos (tal como glutaral aldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobesoil) hexanediamina), derivados bis-diazonium (tal como bis(p-diazoniobensoin)-etilenodeania), diisocyanatos (tal como tolueno 2,6-diisocyanato), y compuestos de fluor bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4- de nitrobenzeno). por ejemplo, se puede preparar una immuno toxina ricina como se describe en Vietta et al; science 238.1098(1987). El acido de amino triaminapentaacetico 1-isothiocyanatobenzyl -3-metil di etileno etiquetado-carbono -14 (MX-DTPA) es un agente de que lacio de ejemplo para la conjugación de radio nucleótido para el anticuerpo. Ver la WO94/11026. Ligador pude ser un "ligador clivable" que facilita la liberación de la droga citotóxica en la célula. Por ejemplo, un ligador lábil-acido, ligador sensible a la peptidasa, ligador foto lábil, ligador de dimetilo o ligador que contiene disulfuro (chari et al, cancer research 52:127-131 (1992); patente estadounidense No 5, 208,020) se pude utilizar.

17X

Los compuestos de la invención contemplan expresamente, pero no se limita nada, ADC, preparado con agentes de reticulación: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, NBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinylsulfone) benzoato) que esta disponible comercialmente (por ejemplo de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA). ver paginas 467-498, 2003-2004 applications hand book and catalog.

Preparación de Conjugados de Droga de Anticuerpo

En los conjugados de droga de anticuerpo (ADC) de la invención, un anticuerpo (Ab) se conjuga con una o más porciones de droga (D), por ejemplo aproximadamente 1 a aproximadamente 20 porciones de droga por anticuerpo, a través de un ligador (L). el ADC de formula 1 se puede preparar mediante varias rutas, que emplean reacciones de química orgánica, condiciones, y reacciones conocidas por aquellos expertos en la técnica, que incluyen: (1) reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un reactivo ligador bivalente, para formar Ab-L, por vía de un enlace covalente, seguido por la reacción con una porción de droga D y (2) reacción de un grupo nucleofílico de una porción de droga con un reactivo ligador bivalente, para formar D-L, por vía de un enlace covalente, seguido por la reacción con el grupo nucleofílico de un anticuerpo.

Ab-(L-D)_p

I

Grupos en los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amina N-terminal, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos thiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (vi) grupos amino o hidroxilo de azúcar en donde el anticuerpo se glicosila. Los grupos amino, thiol, e hidroxilo son nucleofílicos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en las porciones ligadoras y los reactivos ligadores incluyen: (i) ésteres activos tales NHS, ésteres HOBt, halo formatos, y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetaminas; (iii) aldehídos, y cetonas, carboxilo, y grupos maleimida. Ciertas modalidades tienen bisulfuros intra cadenas reducibles, es decir puentes de cisteína. Los anticuerpos se pueden hacer reactivos para conjugación con reactivos ligadores mediante tratamiento con un agente de reducción tal como DTT (dithiothreitol). Cada puente de cisteína

178

formara así, teóricamente, dos núcleos thiol reactivos. Los grupos nucleofílicos adicionales se pueden introducir en anticuerpos a través de la reacción de lisinas con 2-iminothiolano (reactivo Traut) que resulta en la conversión de una amina en un thiol.

Conjugados de droga de anticuerpo de la invención también se pueden producir por modificación del anticuerpo para introducir porciones nucleofílicas, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleofílicos en el reactivo ligador o droga. Los azúcares de anticuerpos glicosilados se pueden oxidar, por ejemplo con activos de oxidación de periodato, para formar grupos aldehído o cetona, que puedan reaccionar con el grupo amina de reactivos ligadores o porciones de droga. Los grupos base Schiff resultantes pueden formar un enlace estable, o se pueden reducir, por ejemplo por reactivos de boro hidruro para formar enlaces amina estables. En una modalidad, la reacción de la proteína de carbohidrato de un anticuerpo glicosilado con oxidasa galactosa o meta periodato de sodio pueden producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que puede reaccionar con grupos apropiados en la droga (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra modalidad, las proteínas que contienen serina N-terminal o residuos treonina pueden reaccionar con meta-periodato de sodio, resultando en la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:318-146; US 5362852). Tales aldehídos se pueden reaccionar con una porción de droga o núcleo filo ligador.

Así mismo, los grupos nucleofílicos en una porción de droga incluyen, pero no se limita nada: amina, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidrazina, thiosemicarabazona, carboxilato de hidrazina, y grupos arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en porciones ligadoras o reactivos ligadores que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, halo formatos, y haluros de ácido; (ii) haluros de bencilo alquilo tal como alo acetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimida.

Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y el agente citotóxico se pueden hacer, por ejemplo por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN, puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado adyacente uno al otro o separados por

una región que codifica un péptido ligador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En aún otra modalidad, el anticuerpo se puede conjugar con un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en pre-tratamiento de tumor, en donde, el conjugado de receptor se administra al paciente, seguido por la remoción del conjugado no unido de la circulación, utilizando un agente clarificante, y luego la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina), que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radio nucleótido).

Derivados de anticuerpo

Los anticuerpos de la presente invención, se pueden modificar adicionalmente para contener porciones no proteinasas adicionales, que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferiblemente, las porciones adecuadas para derivación del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), o polímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinilo, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de anhídrido etileno/maléico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli (n-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de oxidopropilopileno oxido/etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinilo, y mezclas de éstos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en el agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unido al anticuerpo puede variar, y si más de un polímero se une, ellas pueden ser las mismas o diferentes moléculas. En general, El número y/o tipo de polímeros utilizados para la derivación se pueden determinar basado en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades particulares o funciones del anticuerpo a ser mejorado, si el derivado de anticuerpo será utilizado en terapia bajo condiciones definidas, etc.

Formulaciones farmacéuticas

Formulaciones terapéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención, se preparan para almacenamiento al mezclar el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores fisiológicamente aceptables opcionales, excipientes o estabilizantes (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de una solución acuosa, formulaciones liofilizados, u otras formulaciones secas. Portadores aceptables, excipientes, o estabilizantes, son no tóxicos, a los recipientes en las dosis y concentraciones empleadas, e incluye amortiguadores apropiados, tales como fosfato, citrato, histidina, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; preservativos (tal como cloruro de amonio, octadecildimetilbenzil; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de benzetonio; fenol, butilo, o alcohol benzílico; alquil parabenos tales como metilo o propilo parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tal como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, o otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tal como EDTA; azúcares tal como sacarosa, manitol, trehalosa, o sorbitol; contra iones formadores de sal, tal como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tenso activos no iónicos, tal como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

La formulación aquí también puede contener más de un compuesto activo, según sea necesario para la indicación particular a ser tratada, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afectan adversamente al otro. Tales moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son efectivas para los propósitos que están destinados.

Los ingredientes activos también se pueden atrapar en micro cápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial; por ejemplo, hidroximetilcelulosa, o micro cápsula de gelatina y poli-(metilmetacilato) microcápsula, respectivamente, en sistemas de suministro coloidal de drogas (por ejemplo, liposomas, microesferas de albumina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales

técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A, Ed. (1980).

Las formulaciones a ser utilizadas para administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente, mediante filtración a través membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida, incluyen semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos, que contiene la inmunoglobulina de la invención, cuyas matrices están en la forma de artículos, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato) o poli (vinil alcohol)), polilacturos (patente estadounidense No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido glicólico-ácido láctico degradables, tales como LUPRON DEPROT™ (microesferas inyectables, compuestas de copolímero de ácido glicólico-ácido láctico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutílico. Mientras que los polímeros tales como acetato de etileno-vinilo y ácido glicólico-ácido láctico permiten la liberación de moléculas, por más de 100 días, ciertas proteínas liberan hidrogeles durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las inmunoglobulinas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante un periodo de tiempo mayor, ellas pueden desnaturalizarse o agregarse como un resultado de exposición a la humedad a 37°, resultando en una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en inmunogenicidad. Estrategias racionales se pueden idear para la estabilización dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación se descubre por ser formación de enlace S-S intermolecular a través del intercambio de tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr al modificar los residuos sulfhidrilo, liofilizar a partir de soluciones acídicas, que controlan contenido de humedad, que utilizan aditivos apropiados, y el desarrollo de composiciones de matriz de polímero específico.

Usos

Un anticuerpo de la presente invención se puede utilizar en, por ejemplo, en métodos terapéuticos in vitro, ex vivo e in vivo. Los anticuerpos de la invención se

182

pueden utilizar como un antagonista para bloquear parcial o completamente la actividad del antígeno en su específico in vitro, ex vivo y/o in vivo. Más aún, algunos de los anticuerpos de la invención pueden neutralizar la actividad de antígeno a partir de otras especies. De acuerdo con esto, los anticuerpos de la invención se pueden utilizar para inhibir una actividad de antígeno específica, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene el antígeno en sujetos humanos u otros sujetos mamíferos que tiene el antígeno con el que un anticuerpo de la invención reacciona (por ejemplo chimpancé, babuino, marmota, monos cinómologos y rhesus, cerdos o ratones). En una modalidad, el anticuerpo de la invención se puede utilizar para inhibir actividades de antígeno al poner en contacto el anticuerpo con el antígeno de tal forma que la actividad del antígeno se inhibe. Preferiblemente, el antígeno es una molécula de proteína humana.

En una modalidad, el anticuerpo de la invención se puede utilizar en un método para inhibir un antígeno, en un sujeto que sufre se un trastorno, en el que la actividad del antígeno es perjudicial, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo de la invención, de tal forma que la actividad del antígeno en el sujeto se inhibe. Preferiblemente, el antígeno es una molécula de proteína humana y el sujeto es un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que expresa el antígeno con el que un anticuerpo de la invención se une. Todavía el objeto adicional puede ser un mamífero, dentro del cual el antígeno se ha introducido (por ejemplo, por administración del antígeno o por expresión de un transgen de antígeno). Un anticuerpo de la invención se puede administrar a un sujeto humano para propósitos terapéuticos. Más aún, un anticuerpo de la invención se puede administrar a un mamífero no humano que expresa un antígeno con el que la inmunoglobulina reacciona (por ejemplo, un primate, cerdo o ratón) para propósitos veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto al último, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, ensayo de dosis y cursos de tiempo de administración). Los anticuerpos de bloqueo de la invención que son terapéuticamente útiles, incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, anticuerpos anti-HER2-, anti-VEGF, anti-IgE, anti-CD11, anti-interferon y anticuerpos de factor anti-tejido. Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar para tratar, inhibir, retrasar la progresión de, evitar/retrasar la recurrencia de, mejorar o evitar enfermedades, trastornos o condiciones asociadas con expresión anormal y/o actividad de una o más moléculas de antígeno que

incluyen pero no se limitan a tumores benignos y malignos; malignidades linfoides y no leucemias; trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrófagos, epiteliales, estromales, y blastocohélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

En un aspecto, un anticuerpo de bloqueo de la invención es específico para un antígeno de ligando, e inhibe la actividad antigénica al bloquear o interferir con la interacción del receptor-ligando que involucra el antígeno ligando, y viviendo por lo tanto la senda de señal correspondiente y otros eventos celulares o moleculares. La invención también caracteriza anticuerpos específicos-receptor, que no necesariamente evitan la unión del ligando, pero interfieren con la activación del receptor, inhibiendo por lo tanto cualquier respuesta, que normalmente se iniciaría por la unión del ligando. La invención también abarca anticuerpos que preferiblemente o exclusivamente se unen a complejos ligando-receptor. Un anticuerpo de la invención también puede actuar como un agonista de un receptor de antígeno particular, potenciando por lo tanto, mejorando o activando las actividades parciales o totales de activación del receptor mediado por ligando.

En ciertas modalidades un inmuno conjugado que comprende un anticuerpo conjugado, con un agente citotóxico se administra al paciente. En algunas modalidades, el inmuno conjugado y/o antígeno al que este se une, se internaliza por la célula resultando en eficacia terapéutica incrementada del inmuno conjugado en la muerte de la célula objetivo a la que ésta se une. En una modalidad, el agente citotóxico objetivo o interfiere con el ácido nucleico en la célula objetivo. Ejemplos de tales agentes citotóxicos incluyen, cualquiera de los agentes quimioterapéuticos anotados aquí (tal como un maitansinoide o una caliqueamicina), un isótopo radioactivo o una ribonucleasa, o una endonucleasa de ADN.

Anticuerpos de la invención se pueden utilizar solos o en combinación con otras combinaciones en terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se puede coadministrar con otro anticuerpo, agente quimioterapéutico (que incluye cócteles de agentes quimioterapéuticos), otros agentes citotóxicos, agentes anti-angiogénicos, citoquinas, y/o agentes inhibidores del crecimiento. Cuando un anticuerpo de la invención inhibe el crecimiento del tumor, éste puede ser particularmente deseado para combinarlo con uno o más agentes terapéuticos que

también inhiben el crecimiento del tumor. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se puede combinar, con un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, AVASTIN) y/o anticuerpos anti-ErbB (por ejemplo, anticuerpo HERCEPTIN® anti-HER2) en un esquema de tratamiento, por ejemplo, en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades descritas aquí, que incluyen cáncer colorectal, cáncer de mama metastático y cáncer de riñón. Alternativamente, o adicionalmente, el paciente puede recibir terapia de radiación combinada (por ejemplo, radiación de rayos externos, o terapia con un agente etiquetado radioactivo, tal como un anticuerpo). Tales terapias combinadas, anotadas anteriormente incluyen la administración combinada (en donde los dos o más agentes se incluyen en la misma formulación o formulaciones separadas), y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención, puede ocurrir antes de, y/o luego de, la administración de la terapia o terapias adjuntas.

El anticuerpo de la invención (y el agente terapéutico adjunto) se administra por cualquier medio adecuado, que incluye administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o administración subcutánea. Adicionalmente, el anticuerpo se administra de forma adecuada por pulso de infusión, particularmente con dosis disminuida del anticuerpo. La dosificación puede ser mediante cualquier ruta adecuada, por ejemplo, por inyección, tal como inyección intravenosa o subcutánea que depende en parte de si la administración es breve o crónica. La composición del anticuerpo de la invención, se formulará, dosificará, y administrará en una forma consistente con la buena práctica médica. Factores para consideración en éste contexto incluyen el trastorno particular a ser tratado, el mamífero particular a ser tratado, y las condiciones clínicas del paciente individual, el origen del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, la programación de administración, y otros factores conocidos por los practicantes médicos. El anticuerpo no necesita ser, pero está opcionalmente formulado con uno o más agentes actualmente utilizados para evitar o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de tal otro agente depende de la cantidad de anticuerpos de la invención presente en la formulación, el tipo de trastorno, o tratamiento, y otros factores discutidos anteriormente. Éstos se utilizan generalmente en las mismas

dosis, y con rutas de administración como se utiliza aquí o aproximadamente de 1 a 99% de éste empleado en dosis.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se utiliza solo o en combinación con otros agentes, tales como agentes quimioterapéuticos) dependerá del tipo de enfermedad a ser tratada, el tipo de anticuerpo, la severidad, y el curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para propósito preventivo o terapéutico, previo a la terapia, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico que atiende. El anticuerpo se administra adecuadamente a una toma o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y severidad de la enfermedad, aproximadamente $1\mu\text{g/kg}$ a 15 mg/kg (por ejemplo, 0.1mg/kg - 10mg/kg) de anticuerpo es una dosis candidata inicial para administración al paciente, sea, por ejemplo, por una administración o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosis diaria típica, puede variar de aproximadamente $1\mu\text{g/kg}$ a 100mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se sostiene hasta que ocurra una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis de ejemplo del anticuerpo podría estar en el rango de aproximadamente 0.05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg . Así, una o más dosis de aproximadamente 0.5 mg/kg , 2.0 mg/kg , 4.0 mg/kg o 10 mg/kg (ó cualquier combinación de éstos) se puede administrar al paciente. Tales dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo, cada semana, o cada tres semanas (por ejemplo, de tal forma que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Una dosis de carga alta inicial, seguida por una o más dosis menores se puede administrar. Un régimen de dosificación de ejemplo, se comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg , seguido por una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 12 mg/kg de I anticuerpo. Sin embargo, otros regímenes de dosis pueden ser útiles. El progreso de ésta terapia se monitorea fácilmente por técnicas convencionales y ensayos.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención, y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente se suministra. El artículo de fabricación comprende un contenedor y una etiqueta, o inserto de paquete en o asociado con el contenedor. Contenedores adecuados, incluyen, por ejemplo, botellas, frascos jeringas, etc. Los contenedores se pueden formar de una variedad de materiales tales como plástico o vidrio. El contenedor aloja una composición que es por si misma, o cuando se combina con otra composición efectiva para tratar, prevenir y/o diagnosticar la condición, y puede tener un puesto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa, un frasco que tiene un perforable por un aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o inserto de paquete, indica que la composición se utiliza para tratar la condición de elección, tal como cáncer. Más aún, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer contenedor con una composición contenida allí, en donde la composición comprende un anticuerpo de la invención, y (b) un segundo contenedor con una composición contenida allí, en donde la composición comprende un agente citotóxico adicional. El artículo de fabricación en ésta modalidad de la invención puede comprender adicionalmente, un inserto de paquete que indica que las primeras y segundas composiciones de anticuerpos se pueden utilizar para tratar una condición particular, por ejemplo cáncer. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo contenedor (o tercero), que comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), salina amortiguada con fosfato solución de Ringer, y solución de dextrosa. Ésta puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde de un punto de vista del usuario, y comercial, que incluyen otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

Los siguientes son ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. Se entiende que varias otras modalidades se pueden practicar, dada la inscripción general suministrada anteriormente.

EJEMPLOS

Los ejemplos aquí describen la generación de anticuerpos anti-beta7 humanizados, a partir de un anticuerpo anti-ratón de rata que se une a la subunidad beta7 de la integrina alfa4beta7.

Ejemplo 1: Humanización de un anticuerpo antagonista beta7.

Materiales y métodos

Los números de residuos están de acuerdo con Rabat (Rabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Se utilizan abreviaturas de aminoácido de una letra. Las degeneraciones del ADN, se representan utilizando el código IUB (N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B = /C/G/T, H = A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W = A/T, Y = C/T).

Injertos de región hipervariable directa en el aceptador de la estructura con censos humana – El fagémido utilizado para éste trabajo, Pvo350-2b, fue un vector de muestra Fab-g3 monovalente que tiene 2 cuadros de lectura abiertos bajo control del promotor phoA, esencialmente como se describe en el Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93. El primer cuadro de lectura abierto consiste de la secuencia de señal stII fusionado a los dominios VL y CH1 de la cadena liviana de aceptador, y en segundo consiste de la secuencia de señal stII fusionado a los dominios VH y CH1 de la cadena pesada de aceptador seguida por una forma troncada de la proteína P3 de cubierta de fago menor (Lowman, H. et al. (1900) *Biochemistry* 30:10832).

Los dominios VL y VH del Fib504 de rata (anticuerpo FIB504.64 producido por hibridoma ATCC HB-293, American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA) se alinean con kappa 1 consenso humano (huKI) y dominios VH consessus (huIII) subgrupo III humano. Para hacer los injertos de región hipervariable (HVR), se utilizan las siguientes estructuras: se utiliza HuKI para la estructura de dominio variable de cadena liviana (ver figura 1A y 7). Para la estructura del dominio variable de cadena pesada, el aceptador de estructura VH, un dominio VH consenso (hurnIII) del sub grupo III humano

K97

modificado que difiere de la secuencia humIII en 3 posiciones: se puede utilizar R71A, N73T, y L78A (ver Carter et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)) (ver Fig. 1B). En la generación de anticuerpos de la presente invención, el injerto 504K-RF también se prepara a partir del dominio VH consenso del sub grupo III humano modificado al hacer las siguientes sustituciones de aminoácidos: A71R y A78F.

Regiones hipervariables del anticuerpo Fib504 de rata (producido por el hibridoma ATCC HB-293) se construye por ingeniería en la estructura VH consenso del sub grupo III humano aceptador para generar un injerto HVR (Fib504 graf) (ver figura 1B). En el dominio VL las siguientes regiones del Fib504 de rata se injertan ala aceptador consenso humano, huKI: posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) (Fig. 1A). En el dominio VH las posiciones 26-35 (H1), 49-65 (H2) y 94-102 (H3) se injertan (Fig. 1B). Adicionalmente un segundo injerto HVR, Fib504K graf se construye, de tal forma que se incluye dentro del HVR, la posición VL49, basado en una definición extendida para L2 (ver MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)). MacCallum et al. Ha analizado el anticuerpo y las estructuras de cristal complejo de antígeno y encuentran la posición 49 de la cadena liviana y las posiciones 49 y 94 de la cadena pesada son parte de las regiones de contacto de antígeno así, estas posiciones se incluyen en las definiciones del HVR-L2, HVR-H2 y HVR-H3 para anticuerpos anti-beta7 humanizado descritos aquí.

Se generan variantes de injerto directas por mutagénesis Kunkel (Kunkel et al. (1987) supra) que utilizan un oligonucleótido separado para cada región hipervariable. Se evalúan clones correctos por secuenciamiento de ADN.

Aleatorización suave de las regiones hipervariables:

El proceso de "aleatorización suave" (ver solicitud estadounidense No de serie 60/545,840) se refiere a un mutagénesis de una secuencia de proteína seleccionada, tal como una región hipervariable de un anticuerpo. El método mantiene una inclinación hacia el murino, rata u otra secuencia de región hipervariable de partida, mientras se introduce aproximadamente una mutación del 10-50% aproximadamente en cada posición seleccionada. Esta técnica incrementa la capacidad de selección de la librería empleada y evita un cambio en el epítipo de antígeno reconocido por el anticuerpo. De acuerdo con esta técnica

de aleatorización suave, la diversidad de secuencias se introduce en cada región hipervariable utilizando una estrategia que mantiene una inclinación hacia la secuencia de región hipervariable de murino.

Esta se logra utilizando una estrategia de síntesis de oligonucleótido posicionada primero descrita por Gallop et al, J. Med. Chem. 37: 1233-1251 (1994). Sin embargo, otros métodos para mantener una inclinación hacia el residuo de región hipervariable no humano están disponibles, tal como error PCR pronó, mezcla de ADN, etc.

De acuerdo con el método utilizado aquí, para una posición dada dentro de una región hipervariable a ser mutada el codón que codifica el aminoácido de tipo silvestre se posiciona con una mezcla, por ejemplo una mezcla 70-10-10-10) de nucleótidos que resultan en una tasa de mutación de aproximadamente 50% en cada posición de región hipervariable seleccionada. Para lograr esto, el codón que codifica el aminoácido de región hipervariable de tipo silvestre ha de ser mutado se sintetiza con un nivel bajo de mezcla contaminante de los otros tres nucleótidos, tal como mezcla 70-10-10-10 de nucleótidos. Así, por vía de ejemplo, para aleatorización suave del PRO (CCG), la primera posición sintetizada es una mezcla de 70% C y 10% cada uno de G, T y A; la segunda posición es una mezcla de 70% C, y 10 % cada uno de A, G y T; y la tercera posición es una mezcla de 70% G y 10 % cada uno A, C y T. se entiende que la tendencia se puede ajustar hacia arriba o hacia abajo dependiendo de el codón que se sintetiza en una posición dada, el número de codones que codifican para un aminoácido particular, y el grado de síntesis de oligonucleótido se posiciona por la composición de nucleótido de la mezcla de síntesis.

Oligonucleótidos aleatorizados suaves se pueden convertir en patrones después que el murino, la rata u otras secuencias de región hipervariable de partida y que abarcan las mismas regiones definidas por los injertos de región hipervariable directos. Opcionalmente, dos posiciones, aminoácidos en el inicio del H2 y H3 en el dominio VH, se pueden limitar en su diversidad: el codón RGC se puede utilizar para codificación A en la posición 49, G, S o T y en la posición 94 el codón AKG se puede utilizar codificando el MOR.

Generación de librerías Fago

Grupos de oligonucleótidos aleatorizados diseñados para cada región hipervariable se fosforilan separadamente en 6 reacciones de 20 μ l que contienen 660 NG de oligonucleótido, 50 mM de tris pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 20 mM DTT, y 5 U quinasa poli nucleótido durante 1 hora a 37°C. Los 6 grupos de oligonucleótido fosforilados se combinan luego con 20 μ g de plantilla kunkel en 50 mM tris pH 7.5, 10 mM, $MgCl_2$, en un volumen final de 500 μ l que resultan en un oligonucleótido para índice de plantilla de tres. La mezcla se recocce a 90°C durante 4 min, 50°C durante 5 min y luego se enfrían en hielo. El exceso, de oligonucleótido no recocido se remueve con un kit de purificación PCR QIAQUICK™ (Qiagen kit 28106, Qiagen, Valencia, CA) utilizando un protocolo modificado para evitar la desnaturalización excesiva del ADN recocido. Para los 500 μ l de mezcla recocida, se agrega 150 μ l de amortiguador quiagen PB, u la mezcla se divide entre dos columnas de sílice. Luego de un lavado de cada columna con 750 μ l de amortiguador Quiagen TE y un enjuague extra a las columnas secas, cada columna se eluye con 110 μ l de 10 mM tris, 1 mM EDTA, pH 8. La plantilla limpia y recocida (220 μ l) se filtra luego por adición de un μ l 100 mM ATP, 10 μ l 25 mM de NTPS (25 mM cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 15 μ l 100 mM DTT, 25 μ l 10X TM amortiguador (0.5 M Tris pH 7.5, 0.1 M $MgCl_2$), ligasa 2400 U T4, y polimerasa 30 U T7 durante 3 horas a temperatura ambiente.

El producto relleno se analiza en geles de tris-acetato-RTA/agarosa (Sidhu et al., *Methods in Enzymology* 328:333-363 (2000)). Se hacen visibles usualmente tres bandas: la banda inferior se llena correctamente y liga el producto, la banda del medio se llena pero no liga y la parte superior de la banda se desplaza. La banda superior se produce por una actividad lateral intrínseca de la polimerasa T7 y es difícil de evitar (Lechner et al, *J. Biol. Chem.* 258:11174-11184 (1983)); sin embargo, esta banda transforma 30 veces menos eficientemente que la banda inferior y contribuye usualmente poco a la librería, la banda del medio se debe a la ausencia de un fosfato 5' para la reacción de ligación final; esta banda transforma eficientemente y da principalmente secuencia de tipo silvestre.

El relleno en el producto se limpia y electropora en células SS320 y se propaga en la presencia de un fago auxiliar M3/K07 como se describe por Sidhu et al, *Methods*

in Enzymology 328:333-363 (2000). Los tamaños de la librería varían de $1-2 \times 10^9$ clones independientes. Los clones aleatorios de las librerías iniciales se secuencian para evaluar la calidad de la librería.

Selección Fago- el $\alpha 4\beta 7$ de integrina humana de longitud completa se expresa en células 293 (Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)), se purifica por cromatografía de afinidad FIB504 y se utiliza como el objetivo para la selección Fago. Para inmovilización de las placas de micro título MaxiSorp™ (Nalge Nunc, Rochester, NY), se cubre 100 μ l de $\alpha 4\beta 7$ integrina humana en 5 μ g/ml en 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 y 2 mM MnCl_2 (TBSM), durante la noche a 4°C. Los pozos se bloquean durante 1 hora utilizando TBSM que contiene 1% BSA. Para la primer ronda de selección, se cubren ocho pozos con el objetivo que se utiliza; un pozo cubierto con objetivo único se utiliza para rondas sucesivas de selección. El fago se cosecha a partir del súper nadante de cultivo y se suspende en TBSM que contiene 1% BSA y 0.05% TWEEN™ 20 (TBSMBT). Después de unir a los pozos durante 2 horas, el fago no unido se remueve por lavado extensivo con TBS que contiene 0.05% TWEEN™ 20 (TBSMBT). La unión del fago se eluye al incubar los pozos con 100 mM de HCl durante 30 minutos. El fago se amplifica utilizando células top 10 y fago auxiliar M13/k07 y crecen durante la noche a 37°C en 2YT, carbanacilin 500 μ g/ml. Los títulos del fago eluados a partir de un objetivo cubierto se comparan bien con los títulos del fago recubiertos de pozos cubiertos no objetivos para evaluar el enriquecimiento. Después de 4 rondas de selección se desarrollan, clones aleatorios que se seleccionan para análisis en secuencia.

Producción FAB y determinación de afinidad- Para expresar La proteína FAB para medición de afinidad, se introduce un codón de parada entre la cadena pesada el G3 en el vector de muestra de Fago. Los clones se transforman en células 34B8 E. coli y crecen en medio AP5 a 30°C (Presta, L. et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). Las células se cosechan por centrifugación, se suspenden en 10 mM Tris y 1 mM EDTA pH 8 y se abren utilizando un micro fluidizador. El FAb se purifica con cromatografía de afinidad de proteína G.

Se desarrollan determinaciones de afinidad mediante resonancia de superficie de plasmón utilizando un BIAcore™- 3000 (Biacore, Piscataway, NJ). Se inmovilizan variantes FIB504 FAB humanizadas en 10 mM de acetato pH 4.5 (que varían de

250 a 1500 unidades de respuesta (RU)) en un chip sensor CM5 y dos veces diluciones de alfa4beta7 de integrina humana (1.5 a 770 nM) en TBSM que contiene 2% de N-octilglucósido se inyecta. Cada muestra se analiza con asociación de 5 minutos y 5 a 60 minutos disociación. Después de cada inyección, el chip se regenera utilizando tres inyecciones de un minuto de 8 M de urea. La respuesta de unión se corrige al sustraer el RU de una célula de flujo blanco. Un modelo Langmuir de ajuste simultáneo de K_{on} y K_{off} se utiliza para análisis cinético.

Resultados y Discusión

Humanización de Fib504 de rata- la estructura aceptadora humana utilizada para la humanización se basa en la estructura utilizada para el HERCEPTIN® que consiste del dominio BL (HUKI) kappa I humana consenso y una variante del dominio VH consenso (HUM III) del sub grupo III humano. Este dominio variante VH tiene 3 cambios desde el consenso humano: R71A, N73T y L78A. Los dominios VI y VH de la rata Fib 504 fueron alineados con el Kappa I humano y los dominios del subgrupo III; cada región hipervariable (HVR) se identificó e injertó en la estructura aceptadora humana para generar un injerto HVR (injerto 504) que se podría desplegar como un Fab sobre un fago (figuras 1A y 1B).

Con base en el análisis del anticuerpo disponible y las estructuras de cristal del complejo de antígeno MacCallum et al. (MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)) propuso definiciones de HVR basadas en residuos de dominio variable que contacta frecuentemente antígenos. Así las posiciones 49G y 94M de la cadena pesada se incluyeron en el injerto HVR del Fib504 (figura 1B). Además, el segundo injertó HVR, el Fib504K graft, también se generó el cual incluía la posición 94K de la cadena ligera, por que esta posición también estaba dentro de la definición de contacto del HVR-L2 y puede servir como un contacto de antígeno (figura 1A). Cuando los injertos Fib504 o Fib504K se desplegaron sobre el fago y se ensayaron para unirse a un alfa4beta7 inmovilizado, no se observó unión.

Las librerías fueron generadas utilizando tanto los injertos Fib504 como el Fib504-k HVR en el cual cada una de las regiones HVR fueron simultáneamente aleatorizadas. Cada librería de injerto HVR fue paneada contra el alfa4beta7 inmovilizado durante 4 rondas de selección. No se observó enriquecimiento y los clones recogieron el análisis de la secuencia desplegada para el análisis de

197

secuencia de ADN desplegado solamente cambios de secuencia aleatoria con blanco a las regiones 6 HVR.

Dos secuencias de estructura VH adicionales, la "RL" y "RF" se investigaron como aceptadoras y contenían cambios en las posiciones 71 y 78. La posición 71 se cambio a una Arginina como en el consenso del subgrupo III humano, y la posición 78 se cambió a la leucina como en el consenso del subgrupo III humano (estructura aceptadora "RL") o una Fenilalanina como en el consenso del subgrupo II humano y la estructura Fib504 VH de rata (estructura aceptadora "RF") (figura 10A). Cuando cualquiera de los injertos Fib504 o Fib504K en la estructura aceptadora "RL" (Fib504-RL y Fib504K-RL) o "RF" (Fib504-RF y FiK-RF) se desplegó sobre el fago y se ensayo para unión a alfa4beta7 inmovilizado. La unión del fago específico fue solamente observada para el injerto Fib504 utilizando la estructura "RF" (figura 10B). La unión modesta del fago que despliega el injerto Fib504-RF con relación a otros injertos a los que le falta Y49K (cadena ligera) y L78F (cadena pesada) indica la importancia de estas oposiciones en seleccionar una estructura útil.

Las librerías fueron generadas como anteriormente utilizando una estrategia aleatorización suave simultáneamente en cada uno de los 6 HVRs para los injertos Fib504-RL y Fib504-RF y surtidos sobre alfa4beta7 inmovilizado para 4 rondas de selección como se describió anteriormente. El enriquecimiento fue solamente observado para la librería basada en el injerto Fib504-RF. Los clones de la ronda 4 de la librería Fib504-RF se seleccionaron para análisis de secuencia y revelaron los cambios de aminoácido objetivo al HVRL-L1. La mayoría de los clones contenía el cambio Y32L; además la posición 31 fue frecuentemente cambiada a D, S, P o N (figura 1C). Además del injerto de partida, el Fib504K-RF, 3 clones se expresaron y se purificaron como proteína Fab y adicionalmente se analizaron mediante Biacore como se describió anteriormente. Los clones hu504-5, hu504-16 y hu504-32 (variantes de la SEQ ID NO:1 que contiene las sustituciones T31D plus Y32L (variante hu504.5), Y32L (variante hu504.5) o T31D plus Y32L (variante hu504.32); ver figura 1C), mostró excelente unión al alfa4beta7 con relación al injerto Fib504-RF y cumplió o excedió la afinidad del Fib504Fab quimérico para la unión al alfa4beta7. Los resultados del análisis Biacore se muestran en la tabla 3, de adelante, e indican que la variación seleccionada en los HVR y/o en las regiones de estructura, descritas aquí, generaron anticuerpos antagonistas al

194

alfa4beta7 que tiene afinidad mejorada con relación al anticuerpo de partida. Los resultados en la tabla 3 indican que la variante humanizada 504.32 mostró los mayores incrementos en la afinidad con relación al anticuerpo de rata de partida para unirse tres veces más estrechamente al alfa4beta7.

Tabla 3

Fab (Análisis Biacore™)	Afinidad al afa4beta7 (nM)
Fib504	11
Variante 504.5	9
Variante 504.16	23
Variante 504.32	3

Los resultados en la tabla 3 también indican que el rediseño del HVR-L1 fue importante para la restauración de la unión de antígeno de alta afinidad. En particular, la mutación Y32L fue más frecuente los varios clones. Otros cambios en la posición 31 y otras numeraciones sustituciones a través del HVR-H1 parecen ser bien toleradas y pueden proporcionar mejora adicional. De estos resultados es claro que existen múltiples cambios de secuencia que pueden mejorar la afinidad del Fib504 injertado sobre la estructura humana para generar afinidades que cumplan o excedan aquella del anticuerpo de rata inicial.

Así, partiendo del injerto del HVR 6 rat Fib504 el andamio aceptador humano, la expansión del HVR-N2 para incluir la posición 49 (lisina), la expansión del HVR-H2 para incluir la posición 49 (glicina), y la expansión del HVR-94 para incluir la posición 94 (Metionina) así como también los cambios de aminoácido en la posición 32 del VHR-L1 (donde L o I remplaza a Y), opcionalmente, en la posición 31 del VHR-L1 (donde T es remplazado por D o S, por ejemplo) los cambios de aminoácido de estructura útiles fueron hechos en las posiciones 71 (A71R) y 78 (L78F) en el dominio VH. Tales cambios de aminoácido conducen a un anticuerpo humano completo, la variante hu504.32, por ejemplo, con una afinidad de unión mejorada 3 veces para la integrina alfa4beta7. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados seleccionados descritos aquí se han determinado por tener al menos una actividad biológica comparable como el anticuerpo Fib504 de rata (ver Ejemplo 3 aquí).

Ejemplo 2: variantes Fib504 HVR humanizadas adicionales

La secuencia de aminoácido HVR de la variante humanizada Fib504.32 fue adicionalmente modificada para generar variantes adicionales capaces de antagonizar la actividad de la subunidad de interina beta7 y/o las interinas que contienen la subunidad beta7.

Generar una amplia librería de exploración de aminoácido-

una librería puede explorar las posiciones HVR seleccionadas para otros residuos de aminoácido capaces de generar las variantes de unión beta7 de la variante hu504.32 que fue generada utilizando 3 oligonucleótidos: 504-L1, designada para aleatorizar de manera suave una porción del HVR-L1 con un desvío hacia la secuencia hu504.32 HVR-L1 (es decir la secuencia ASESVDDLLH (SEQ ID NO:47, para las posiciones relativas A2-A11) se aleatorizaron de manera suave como se describió anteriormente); y el HVR-L3 504-N96 y el HVR-H3 504-M94 que introdujeron el NNS en las posiciones HVR-L3 posición 96 en la cadena ligera y la posición 94 HVR-H3 en la cadena pesada, permitiendo así todos los 20 aminoácidos en estas posiciones. Con estos tres oligonucleótidos, la librería de exploración de aminoácido amplia se generó como se describió anteriormente utilizando un molde que contiene tres codones de parada en la cadena ligera (posiciones 31 y 32 en el HVR-L1 y posición 96 en el HVR-N3) y un codón de parada en la cadena pesada (posición 94 en el HVR-H3).

Exploración de aminoácido amplio del hu504-32- para explorar más completamente las secuencias preferidas permitidas en el HVR-L1 y para mejorar la estabilidad del 504-32, se diseñó una librería de fago que a) aleatorizaba de manera suave el HVR-L1 del 504-32 en la región donde se observaron cambios (es decir a ASESVDDLLH (SEQ ID NO:47, para las posiciones relativas A2-A11) durante la humanización (figura 1C), y b) se le permitió a todos los aminoácidos posibles en el N96 en NVR-L3 y M94 en HVR-H3. Luego de 4 rondas de selección contra la integrina humana de longitud completa inmovilizada alfa4beta7 como se describió anteriormente, 96 clones aleatorios se seleccionaron para análisis de secuencia. La frecuencia en la cual los aminoácidos fueron encontrados en cada posición en la exploración del aminoácido amplia sugiere que la secuencia HVR-L1 presente en el hu504-32 y la metionina en la posición 94 en la cadena pesada son óptimas para unión de alta afinidad (figura 12). Los aminoácidos preferidos

obtenidos mediante las selecciones que parten de la variante 504.32 (figura 12) son mostrados en amarillo. En contraste, aunque la asparagina esta presente en la posición 96 en la cadena ligera del hu504-32, la alta frecuencia de la leucina observada en esta posición en la exploración del aminoácido amplio sugiere la mutación N96L podría mejorar adicionalmente la afinidad de las variantes Fib504 humanizadas para el alfa4beta7 y también eliminar cualquier problema de desamidación potencial en esta posición. La información en la figura 12 también sugiere que un número de aminoácidos de reemplazo son probablemente tolerados en la mayoría de las posiciones sin una pérdida sustancial en afinidad. Por ejemplo, al eliminar la oxidación del M94 en HVR-H3, la glutamina o arginina podrían ser probablemente sustituidas.

Generar las librerías de exploración de aminoácido limitadas-seis librerías para una exploración de aminoácido limitada utilizo seis diferentes moldes Kunkel, cada uno conteniendo un codón de parada localizado dentro de los seis HVR. Cada librería se genero utilizando un oligonucleótido simple que codifica un HVR simple y que utiliza los codones listados en la figura 11A (columna "codón") para alterar los residuos de aminoácido para subsecuentes ensayos para unión al beta7 o al alfa4beta7. Los mismos procedimientos son utilizados para alterar los residuos de aminoácido de los anticuerpos anti-beta7 y ensayarlos para unión a las integrinas alfaEbeta7.

Exploración de aminoácido limitada del hu504-32-la exploración del aminoácido limitado del hu504-16 se diseño para hacer el hu504-16 aun más como la secuencia de consenso de cadena ligera y pesada humana y en el proceso de identificar los elementos de secuencia mínimos del Fib504 de rata que son requeridos para la unión. Seis librerías fueron generadas y puestas como blanco en cada HVR en las posiciones que difieren entre el hu504-16 y las cadenas ligera Kappa I de consenso humano o pesada del subgrupo III (figura 1A y 1B);

O el aminoácido de rata o humano se permitió en estas posiciones en la librería (Figura 11A). Con el fin de acomodar la codificación para ambos aminoácidos durante la síntesis de oligonucleótido y la mutagénesis, los aminoácidos adicionales fueron también introducidos en algunos casos (ver aminoácidos codificados, Figura 11A). Las librerías de exploración del aminoácido limitado

fueron seleccionadas contra la integrina humana de longitud completa inmovilizada alfa4beta7 como se describió anteriormente y aproximadamente 32 clones aleatorios se secuenciaron de cada librería después de la ronda 3. La frecuencia de cada aminoácido encontrada en cada posición se muestra en la Figura 11B y 11C.

Como la exploración del aminoácido amplio, la exploración del aminoácido limitado también suministra información acerca de que cambios son tolerados en muchas posiciones en el Fib504 humanizado. A diferencia de la exploración del aminoácido amplio, sin embargo, la diversidad permitida en cada posición aleatorizada en la exploración de aminoácido limitada se restringió a una pareja de aminoácidos. Así la falta de cualquier sustitución observada en una posición dada no indica que un residuo particular pueda no ser cambiado ni haga la alta frecuencia de cualquier aminoácido particular en una posición dada necesariamente indica que ésta sea la mejor solución para la afinidad alta.

En algunas posiciones (posiciones 27, 29, 30, 53, 54 de la cadena ligera y 50, 54, 58, 60, 61, y 65 de la cadena pesada) los aminoácidos de consenso humano se seleccionan muy frecuentemente sugiriendo una retro mutación al consenso humano que no alteraría dramáticamente la unión al alfa4beta7 humano. De hecho, en la posición 54 de la cadena ligera (en HVR-L2), el aminoácido de consenso humano se selecciona más frecuentemente que el aminoácido del Fib504 de rata indicando que este cambio hecho a 504-32 suministra un anticuerpo de unión beta7 útil.

Además, como resultado del diseño de librería, los aminoácidos que no son suministrados de cualquier consenso humano o del Fib504 de rata son seleccionados más frecuentemente en algunas posiciones y suministran sustituciones potenciales para mejorar la afinidad de las variantes Fib504 humanizadas. Éstas incluyen, sin limitación, D30A e I55V en la cadena ligera y Y50F en la cadena pesada. Los resultados de estas 2 librerías indican que muchas posiciones HVR toleran otras sustituciones de aminoácido y aún retienen la actividad biológica comparable.

Los resúmenes de los cambios de aminoácido observados se muestran en las Figuras 13 y 15. La Figura 15 resume los varios aminoácidos útiles en cada una

de las posiciones en los CDR de las variantes de anticuerpo de la invención en las posiciones numeradas de acuerdo a la numeración Kabat o un sistema de numeración relativo. Cada uno de los anticuerpos adicionales comprendido por las variantes descritas en las Figuras 13 y 15 es una modalidad de la invención.

Ejemplo 3: Ensayos de Adhesión de Célula

La capacidad de algunas de las variantes Fib504 humanizadas de la invención a unirse a ligandos expresados a una superficie celular se ensayó mediante ensayos de adhesión de celular. La unión al alfa4beta7 y a otra interina beta7, alfaEbeta7 se ensayó por la capacidad de las variantes humanizadas a romper la unión de la integrina a su receptor natural. La unión de las variantes Fib504 humanizadas a la subunidad beta7 solo expresadas sobre una superficie celular fueron similarmente ensayadas. Los procedimientos y los resultados se describen adelante.

Producción IgG – Las variantes Fib504 IgG humanizadas fueron expresadas transitoriamente en 293 células (Graham et al. (1977) supra) utilizando un vector separado para las cadenas ligera y pesada. Los vectores fueron construidos al subclonar los dominios variables ligero o pesado en vectores de expresión adecuados para cada una de las cadenas ligera y pesada. El sobrenadante del cultivo de célula CHO 1.1 L de una variante Fib504 humanizada se filtró a través de un filtro de 0.45 um y se aplicó a una nueva columna HP de proteína A HiTrap de 1 mL (Amersham/Farmacia) equilibrada en un amortiguador A (10 mM tris pH 7.5, 150 mM de NaCl). Las muestras fueron aplicadas a 0.8 mL/min, durante toda la noche, a 4 grados C. Cada columna fue entonces lavada y equilibrada con 30 mL de amortiguador A. La elusión del anticuerpo se logró mediante cromatografía a temperatura ambiente sobre un FPLC (Amersham/Farmacia) utilizando un gradiente lineal de 14 min a 1 mL/min de 0 a 100% de amortiguador B (100 mM de Glicina, pH 3.0). Las fracciones de 1 mL resultantes fueron inmediatamente neutralizadas mediante la adición de 75 uL 1 M tris, pH 8. La proteína eluida se detectó mediante absorción a 280 nm, y las fracciones pico se agruparon y fueron desalinizadas en PBS sobre columnas desechables de tamaño sefadex PD10 G-25 (Amersham/Farmacia). La proteína se detectó mediante OD280 y las fracciones pico se agruparon. El anticuerpo en PBS fue 0.22 um filtrado y almacenado a 4 grados C. El análisis de aminoácidos se utilizó para cuantificar las

concentraciones de estos anticuerpos purificados, y los valores se asignaron del promedio de las dos determinaciones separadas.

Marcación BCECF:

En cada uno de los ensayos presentados en este Ejemplo 3, las células se marcaron de acuerdo al siguiente procedimiento. Todas las células utilizadas en los ensayos de adhesión se marcaron con 2', 7'-bis-(2-carboxietil)-5-(and-6)-carboxifluorescina, éster de acetoximetilo (HCECF) a 10 μ M en medio RPMI1640 que contiene FBS al 10% para las células RPMI8866 y las células 38C13 trasfectadas con la subunidad beta7 (células beta7 38C13) y en la mezcla F-12:DMEM (50:50) que contienen FBS al 10% para las 293 células trasfectadas alfaEbata7 (293 células alfaEbata7). Las células fueron marcadas durante 30 minutos y lavadas dos veces con medio de ensayo. La densidad de la célula se ajustó a 3×10^6 células por ml para RPMI8866 y células 38C13beta7 y 2.2×10^6 células por ml para 293 células alfaEbata7.

Las variantes Fib504 humanizadas rompen la unión alfa4beta7 al MAdCAM

Adhesión de la célula RPMI8866/MAdCAM-1-Ig: Las células RPMI8866 expresan alfa4beta7 sobre su superficie (Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY). Las variantes Fib504 humanizadas (variantes hu504) fueron puestas en contacto con una mezcla de células RPMI8866 y MAdCAM fusionadas a IgG recubierta sobre un soporte sólido. Las concentraciones de las variantes Fib504 humanizadas que resultan en la inhibición del 50% (IC_{50}) de la unión de las células RPMI8866 al MAdCAM-1 se midieron al recubrir placas de 96 pozos Nunc MaxisorpTM con 2 μ g/ml en PBS, 100 μ l/pozo de MAdCAM-1-Ig (Genentech, Inc., donde el Ig se refiere a la fusión del MAdCAM-1 a una región Fc) durante toda la noche a 4°C. Después de bloquear las placas con 200 μ l/pozo de 5 mg/ml de BSA durante una hora a temperatura ambiente, 50 μ l de variantes Fib504 humanizadas en el medio de ensayo (medio RPMI 1640, Hyclone®, Logan Utah, USA, suplementada con 5 mg/mL de BSA) se agregó a cada pozo y 150,000 células marcadas con BCECF (BCECF, Molecular Probes, Eugene, OR) en 5 μ l de medio de ensayo se agregaron a cada pozo y se inocularon durante 15 minutos a 37°C. Los pozos se lavaron dos veces con 150 μ l de medio de ensayo para remover las células no unidas. Las células unidas se solubilizaron con 100 μ l de 0.1% de SDS en 50 mM de Tris/HCl pH 7.5. La cantidad de fluorescencia liberada de las células

lisadas se midió mediante un SPECTRAmax GEMINI™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a longitudes de onda de 485 nm de excitación 530 nm de emisión. Los valores de fluorescencia se analizaron como una función de las concentraciones de las variantes Fib504 humanizadas agregadas en cada ensayo, utilizando un ajuste de mínimos cuadrados no lineales de cuatro parámetros, para obtener los valores IC₅₀ de cada variante Fib504 humanizada en el ensayo. Los valores IC₅₀ e IC₉₀ se estimaron del ajuste de los cuatro parámetros. La Fig. 14 es una gráfica de ejemplo de los resultados. Los valores IC₉₀ e IC₅₀ para cada una de las variantes ensayadas se muestra adelante en la Tabla 4.

Tabla 4
Unión de anticuerpo al MAdCAM-1

Anticuerpo Ensayado Variantes Fib504 y hu504	IC ₅₀ (nM) Exp 1/Exp 2	IC ₉₀ (nM) Exp 1/Exp 2*
Fib 504 de Rata	0.098/0.197	0.483/0.703
hu504.5 Variante	0.067/0.248	0.361/0.880
hu504.16 Variante	0.0768/0.206	0.244/0.551
hu504.32 Variante	0.036/0.119	0.150/0.396
6B11(control no bloqueante)	>100	<100

* Exp 1/Exp 2 se refiere a los resultados de los ensayos repetidos.

Ruptura de la Variante Fib504 humanizada de la unión alfa4beta7 al VCAM

Adhesión de la célula RPMI8866/7dVCAM-1: El ensayo del RPMI8866/7dVCAM-1 es un formato similar al del RPMI8866/MAdCAM-1-Ig excepto que el 7dVCAM-1 (ADP5, R&D Systems, Minneapolis, MN) se utilizó a 2 ug/ml para cubrir palcas. Los resultados fueron analizados como se describió anteriormente para los experimentos de unión de MAdCAM. Los valores IC₅₀ para cada una de las variantes ensayadas se muestran adelante en la Tabla 5.

Tabla 5
Unión de anticuerpo al VCAM humano

Anticuerpo Ensayado Variantes Fib504 y hu504	IC ₅₀ (nM) Exp 1/Exp 2	IC ₉₀ (nM) Exp 1/Exp 2*
---	--------------------------------------	---------------------------------------

207

Fib 504 de Rata	0.107/0.193	0.396/0.580
hu504.5 Variante	0.088/0.270	0.396/0.726
hu504.16 Variante	0.098/0.223	0.261/0.774
hu504.32 Variante	0.059/0.110	0.183/0.337
6B11 (control no bloqueante)	>100	>100

*Exp 1/Exp 2 se refiere a los resultados de ensayo repetidos.

Disrupción de la variante Fib 504 humanizada de la unión de alfaEbета7 a la E-cadherina humana

Adhesión de las células alfaEbета7 293/huE-Caderina: las células 293 (Gram. et al. (1977)supra) fueron transfectadas con alfaE y beta7 (Genentech, Inc). El formato de ensayo es similar al del ensayo RPMI8866/MAdCAM-1-Ig excepto que la huE-cadherina (648-EC, R&D Systems, Minneapolis,MN) se utilizo a 2µg/ml para recubrir las placas. Las placas fueron entonces bloqueadas con 5 mg/ml de BSA como se menciono anteriormente y 50 µl de las variantes FIB 504 en medio de ensayo (F-12:DMEM (50:50) suplementado con 5 mg/ml de BSA) fueron agregadas a cada pozo y 110,000 células marcadas de BCECF en 50 ul de medio de ensayos se agregaron a cada pozo y se encubaron durante 15 minutos a 37 °C. Los pozos fueron lavados 2 veces con 150 µl de medio de ensayo y la cantidad de fluorescencia liberada mediante las células lisadas se midió y analizó como se describió anteriormente. Los resultados de ensayo de los tres experimentos son mostrados en la tabla 6.

Tabla 6

Unión de anticuerpo a la E-cadherina humana

Anticuerpo ensayado:		IC ⁵⁰ (nM)	IC ⁹⁰ (nM)
Variantes fib 504 y hu 504			
Fib 504 de rata		2.047/7.89/4.19	8.8024.5/9.95
variante hu 504.5		2.132/10.18/4.77	7.99/28.7/10.19
Variante hu 504.16		1.957/10.05/4.58	7.03/33.7//13.51
Variante hu 504.32		1.814/6.99/3.47	8.8/24.5/11.73
Hp2/1(anti-alfa4,control)		>100/>100/>100	>100/>100/>100

262

Disrupción de la variante Fib 504 humanizada de la unión de beta7 a MAdCAM

Ensayo de adhesión de la célula 38C13beta7/muMAdCAM-1-Ig:

El ensayo 38C13beta7/muMAdCAM-1-Ig fue el formato similar a el RPMI8866/MAdCAM-1-Ig excepto que el muMAdCAM-1-Ig (Genentech, Inc). Se utilizo a 2µg/ml para recubrir placas. Las células de linfoma de murino 38C13 alfa4+ (Crowe, D.T. et al., J. Biol. Chem. 269:14411-14418 (1994))se transfectaron con ADN que codifica la beta7 integrina de tal forma que el alfa4beta7 se expreso sobre la superficie celular. La capacidad de las variantes de anticuerpos a irrumpir la interacción entre la membrana de la célula asociada al alfa4beta7 y el MAdCAM se desarrollo como anteriormente. Los resultados de los ensayos se muestran en la tabla 7. Los resultados del ensayo se muestran en la tabla 7. (Los valores IC50 y IC90 para los 2 experimentos se muestran).

Tabla 7

Actividad de los anticuerpos de la variante hu504 en células que expresan 38C13-beta7 que se unen a MAdCAM de murino

Anticuerpo ensayado:	IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)
Variantes fib 504 y hu 504		
Fib 504 de rata	0.68/0.36	2.869/1.51
variante hu 504.5	0.8587/0.466	2.322/2.61
Variante hu 504.16	0.998/0.610	3.717/4.08
Variante hu 504.32	0.718/0.458	4.08/1.51

La Disrupción de la variante Fib 504 humanizada de la unión beta7 al VCAM de murino

Ensayo de adhesión célula 38C13beta7/muVCAM-1-Ig:

El ensayo del 38C13beta7/muVCAM-1-Ig se desarrollo de acuerdo a ensayos de unión de célula MAdCAM-1-Ig/RPMI8866 de murino anterior, excepto que el muVCAM-1-Ig (Genentech, Inc) se utilizo a 2µg/ml para recubrir placas. Los resultados de los ensayos son mostrados en la tabla 8. Los valores IC₅₀ e IC₉₀ para los dos experimentos son mostrados.

203

Tabla 8

Actividad de los anticuerpos de la variante hu504 en células que expresan 38C13-beta7 que se unen a murino VCAM-1-Ig

Anticuerpo ensayado:		IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)
Variantes fib 504 y hu 504			
Fib 504 de rata		0.845/0.447	2.903/2.30
variante hu 504.5		0.763/0.407	3.074/2.30
Variante hu 504.16		0.835/0.584	2.857/1.84
Variante hu 504.32		0.562/0.330	2.004/1.84

Los resultados de los estudios de unión de la variante Fib 504 humanizada demostraron que el anticuerpo humanizado de la invención se une a la subunidad integrina 7 blanco así como también al alfa4beta7 y a la integrina alfaEbeta7 con aproximadamente la afinidad del anticuerpo de rata de partida y, en algunas modalidades, con afinidad mayor. Así, un anticuerpo anti-beta7 humanizado de acuerdo con la invención tiene usos en las terapias de integrina anti-beta7, particularmente las terapias humanas.

Actividad relativa de las variantes hu504.32 de la invención

Diferentes variantes de aminoácido del anticuerpo hu504.32 se probaron en ensayos de adhesión de célula humana y de ratón para su capacidad de inhibir la unión del receptor que contiene beta7 a su ligando de acuerdo con los métodos de ensayo de adhesión celular descritos aquí. El ensayo del RPMI8866/MAdCAM-1-Fc se desarrollo como se describió aquí anteriormente. El ensayo del alfaEbeta7-293/hu E-cadherina se modifico mediante el uso del E-caderina-Fc como el ligando (caderina-E humana-Fc, 684-EC,R&D Systems, Minneapolis, MN).la capacidad relativa de las variantes hu504.32 para inhibirlas la interacción de la fibronectina humana (huFN40) con el receptor alfa4beta7 humano sobre las células PRMI8866 también se examino. El ensayo de fibronectina RPMI8866/hu (huFN40) utilizada para estos estudios fue similar en el formato al ensayo RPMI8866/MAdCAM-1-Ig descrito aquí excepto que el fragmento alfa quimiotropico de fibronectina humana de 40 kDa (F1903, Chemicon Internacional, Temecula, CA) se utilizo en 2 µg/ml para recubrir placas.

264

La capacidad de las variantes hu504.32 para inhibir la interacción de los receptores que contienen beta7 de murino con el MAdCAM-1 de murino o el VCAM de murino se examino. El MAdCAM-1-Fc de murino y el VCAM-1-Fc de murino se inhibieron de interactuar con las células alfa4+ de linfoma de murino expresan el beta7 de murino (células 38C13beta7) mediante las variantes hu504.32. El MAdCAM-1-Fc de murino y los ensayos de adición de célula VCAM-1-Fc se desarrollaron de manera similar a aquellos descritos aquí anteriormente para el MAdCAM y VCAM humano. Donde los ligandos fueron fusionados a las regiones Fc, los receptores Fc sobre las células fueron bloqueados con anticuerpo anti-CD16/32 0.5 µg (anticuerpo receptor anti-Fcgama III/II, catalogo numero 553142, BD Biosciences, San José, CA) por 1 millón de células durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células marcadas 150,000 en 50 µl de medio de ensayo se agregaron a cada pozo y se incubaron durante 13 minutos a 37 °C. Los pozos fueron lavados y la cantidad de florescencia liberada de las células lisadas fue medida como se describió aquí anteriormente. El anticuerpo de control para los ensayos de adhesión de célula humana fueron el anticuerpo monoclonal del ratón a la cero albúmina humana, 6B11 (Catalogo No. ab10244, Novas Biologicals, Littleton, CO, USA). El anticuerpo de control para los ensayos de adición de célula de murino fue el anticuerpo beta7 integrina anti-ratón de rata. El M293 (BD Biosciences, San José, CA), que no compite con el ligando o con el Fib504 para unirse a la integrina beta7.

Los resultados de los ensayos triplicados para los ensayos de adhesión de célula humana y de murino se suministran en las tablas 9 y 10 respectivamente.

Tabla 9

Actividad de la variante hu504.32. Anticuerpos en los ensayos de adhesión de célula humana.

Variante anticuerpo	de	IC50 Ave±			
		RPMI8866/huMAdCAM-1-Fc	RPMI8866/Hu7dVCAM-1	αEβ7-293/huEcadherin-Fc	RPMI8866/huFN40
hu504.32		0.088±0.035	0.101±1.664	3.970±1.664	0.100±0.046
hu504.32M94Q		0.090±0.045	0.111±0.035	4.130±1.212	0.124±0.056

201

hu504.32M94R	0.075±0.034	0.089±0.009	3.963±1.776	0.119±0.056
hu504.32(6B11)	>100	>100	>100	>100

TABLA 10
Actividad De Anticuerpos Variante Hu504.32 En Ensayos De Adhesión De Célula de Murina

Variante de Anticuerpo	IC50	
	Ave± SD	
	38C13beta7/muMAdCAM-1-Fc	38C13beta7/mu7dVCAM-1-Fc
Hu504.32	0.270±0.041	0.228±0.065
Hu504.32M94Q	0.370±0.102	0.264±0.083
Hu504.32.M94R	0.391±0.0112	0.228±0.081
Control (M293)	>100	>100

El anticuerpo hu504.32 tiene una metionina en la posición 94 de la cadena pesada CDR3. Las variantes M94Q (o hu504.32Q) y M94R (o hu504.32R) tienen glutamina o arginina, respectivamente, en la posición 94 de la variante de anticuerpo hu504.32. Los anticuerpos hu504.32M, Q, y R reducen sustancialmente la interacción receptor-ligando de integrina beta7 en cada uno de los ensayos y son, así, potentes inhibidores de la adhesión celular mediada por beta7.

Actividad del anticuerpo hu504.32R *In Vivo*.

La variante del anticuerpo hu504.32R fue ensayada *in vivo* por su capacidad para reducir la interacción receptor-ligando de integrina beta7 y reducir el reclutamiento del linfocito al colon inflamado en un modelo de enfermedad de intestino inflamatorio de murina *in vivo*. Los ratones BALB/c y CB17 SCID se obtuvieron de Charles River Laboratories International, Inc (Wilmington, MA, USA). Los ratones colíticos SCID reconstituidos con células T alta CD4⁺CD45Rb fueron preparados al aislar las células T alta CD4⁺CD45Rb de ratones BALB/c donadores y transferir 3*10⁵ células en 100 µl PBS intravenosamente. Los ratones SCID de control no recibieron las células T alta CD4⁺CD45Rb. Los ratones cd4⁺ reconstituidos cumplieron los criterios de enrolamiento del grupo de tratamiento de pérdida de peso del 10% de la línea base o 15% del peso pico en la semana 4 y se considero

que habían inducido la enfermedad inflamatoria del intestino y fueron seleccionados para tratamiento.

El día del tratamiento con los anticuerpos de ensayo, las células del nodo linfático mesenterico de los ratones BABL/c (MLN) fueron cosechadas y radio marcadas con Cr^{51} . El tratamiento involucro previa administración del anticuerpo anti-GP120, el anticuerpo hu504.32 anti-beta7, el anticuerpo hu504.32R anti-beta7, o ningún anticuerpo (control) intravenosamente, 200 μ g/100 μ l de PBS. Treinta minutos después de la administración del anticuerpo, fueron inyectadas células MLN marcadas con Cr^{51} , 4×10^6 células/100 μ l. Una hora post inyección de las células marcadas, los ratones fueron sometidos a la eutanasia y se recolectaron el bazo, el colon, el parche de peyers, pesados, y se determino la radio actividad del Cr^{51} por órgano. La figura 16 es una gráfica de barras de los resultados de estos ensayos que muestran la capacidad relativa de los anticuerpos a bloquear el retorno de las células T radio marcadas al colon de ratones que experimenta enfermedad inflamatoria del intestino. El retorno de las células T al colon inflamado se inhibió mediante los anticuerpos hu504.32 y 504.32R anti-beta7 con relación al control negativo, el anticuerpo anti-GP120. La distribución del bazo fue similar para todos los anticuerpos. Así, los anticuerpos hu504.32 y hu504.32R inhiben efectivamente el retorno de las células al colon inflamado *in vivo*.

La glicación del anticuerpo no afecta la capacidad de la variante hu504.32R al bloquear la unión del MAdCAM-1 al receptor alfa4beta7.

La glicación, de proteínas no enzimáticas, puede afectar las interacciones anticuerpo-ligando (ver, por ejemplo, Kennedy, D.M. et al., Clin Exp Immunol. 98(2):245-51 (1994)). La glicación del lisina en la posición 49 del 504.32R. La glicación de la lisina en la posición de la cadena ligera 49 de la variante hu504.32R (HVR-L2 posición relativa B1) se observo pero no tuvo efecto significativo sobre la capacidad de la variante del anticuerpo para bloquear la unión del MAdCAM-1 a las células RPMI8866/MAdCAM-1 que expresan al receptor alfa4beta7. La determinación de la glicación y los niveles de glicación se desarrollo utilizando espectroscopia de masa de ionización de electro rociador estándar (ESI-MS) y mediante cromatografía de afinidad de boronato. Los métodos HPLC de afinidad de boronato útiles para ensayar la glicación se encuentran en, por ejemplo, Quan C.P. et al., Analytical Chemistry 71(20):4445-

207

4454 (1999) y Li Y.C. et al., J. Chromatography A, 909:137-145 (2001). El ensayo de adhesión de célula se desarrollo de acuerdo al ensayo de adhesión de célula RPMI8866/MAdCAM-1-Fc descrito aquí.

En las modalidades alternativas de la invención, la glicación en la posición 49 se reduce o se elimina donde la posición 49 comprende un aminoácido diferente de lisina. El polipéptido o el anticuerpo de la invención comprende un aminoácido en la posición 49 (HVR-L2 posición relativa B1) cualquiera de los aminoácidos A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y, donde cada letra se refiere a un aminoácido de acuerdo a la designación del aminoácido de letra simple estándar. Alternativamente, el aminoácido en la posición 49 de la cadena ligera de la variante 504.32R (u otra variante 504) se selecciona del grupo que consiste de R, N, V, A, F, Q, H, P, I o L. Un aminoácido útil en la posición 49 se selecciona, por ejemplo, al desplegar (preparar una librería de fago de) el hu504.32R Fab sobre el fago (variante) y sustituir separadamente, en el colon para la posición 49, un codón para cada uno de los 20 aminoácidos de ocurrencia natural. El fago que expresa las variantes hu504.32R alterados en la posición 49 son ensayados para unión a la integrina beta7 y/o un receptor que comprende la integrina beta 7, tal como los receptores alfa4beta7 y alfaEbeta7. Aquellas variantes que se unen a la integrina beta7 o a los receptores alfa4beta7 o alfaEbeta7 son además seleccionados por la capacidad a inhibir la unión receptor-ligando de la integrina beta7 y la eficacia *in vivo* como se describe aquí. Los aminoácidos de ocurrencia natural y no natural alternativos se pueden sustituir en la posición 49 mediante técnicas de mutagénesis estándar y se ensaya en la adhesión celular en los ensayos *in vivo* descritos aquí. Alternativamente, el aminoácido en la posición 49 de la cadena ligera es un aminoácido diferente de lisina (K), los aminoácidos en cualquier otro HVR o posición de estructura o posiciones en la cadena ligera y/o cadena pesada se altera para seleccionar para una variante del polipéptido de unión anti-beta7 o el anticuerpo que exhibe la afinidad de unión, la actividad biológica *in Vitro* e *in vivo*, las farmacocinéticas, el espacio de la droga y la inmunogenicidad útil para la reducción de la inflamación al reducir la actividad biológica de la integrina beta7. La mutagenesis y la selección de tal polipéptido o variante de anticuerpo se desarrolla como se describió aquí y de acuerdo con otras técnicas estándar. Tal variante del polipéptido o anticuerpo de unión anti-beta7 exhibe afinidad de unión de integrina beta7 en 10000 veces, en 1000 veces, alternativamente en 100 veces, alternativamente en 10 veces, alternativamente en

5 veces, alternativamente en 2 veces la afinidad de unión exhibida por cualquiera de las variantes Fib504 humanizadas descritas aquí.

La especificación escrita anterior se considera como suficiente para posibilitarle a un experto en la técnica practicar la invención. La presente invención no esta limitada en alcance a la construcción depositada, en razón a que la modalidad depositada esta destinada a una ilustración simple de ciertos aspectos de la invención y cualquiera construcciones que son funcionalmente equivalentes dentro del alcance de esta invención. El deposito de los materiales aquí no constituye una admisión de que la descripción escrita aquí contenida sea inadecuada para posibilitar la practica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de esta, ni debe ser considerada como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones especificas que esta representa. De hecho, las modificaciones varias de la invención además de aquellas mostradas y descritas aquí serán evidentes para aquellos expertos en la técnica de la descripción anterior y caerán dentro del alcance de las reivindicaciones finales.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido o anticuerpo de unión anti-beta7 que comprende:
 - (a) Al menos una secuencia HVR seleccionada del grupo que consiste de:
 - (i) HVR-L1 que comprende las secuencias A1-A11, en donde A1-A11 es RASESVDTYLH (SEQ ID NO:1)
 - (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B8, en donde B1-B8 es KYASQSIG (SEQ ID NO:2)
 - (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C10, en donde C1-C10 es QQGNSLLPNT (SEQ ID NO:3)
 - (iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, en donde D1-D10 es GFFITNNYWG (SEQ ID NO:4)
 - (v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E17, en donde E1-E17 es GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO:5)
 - (vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F11, en donde F1-F11 es MTGSSGYFDF (SEQ ID NO:6)
2. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende al menos una variante HVR, en donde la variante HVR comprende la modificación de al menos un residuo de al menos un residuo de cualquiera de las secuencias descritas en la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 o 6.
3. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 2 en donde A8 en una variante HVR-L1 es S, D o T y A9 es L.
4. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 2, en donde HVR-L1 comprende la SEQ ID NO:1 o 7 u 8 o 9, HVR-L2 comprende la SEQ ID NO:2 o 67 o 68, HVR-L3 comprende la SEQ ID NO:3, HVR-H1 comprende la SEQ ID NO:4, HVR-H2 comprende la SEQ ID NO:5, y HVR-H3 comprende la SEQ ID NO:6 o 66 para las posiciones relativas F2-F11 o comprende la SEQ ID NO:63 o 64 o 65 para las posiciones relativas F1-F11.
5. El polipéptido o el anticuerpo de la reivindicación 2, en donde el polipéptido o el anticuerpo comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 regiones hipervariables (HVR) seleccionadas del grupo que consiste de HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, en donde:

- (i) El HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácido A1-A11, en donde A1-A11 es RASESVDTYLH (SEQ ID NO: 1); RASESVDSLH (SEQ ID NO:7), RASESVDTLLH (SEQ ID NO:8), o RASESVDDLH (SEQ ID NO:9) o una variante de la SEQ ID NO:1, 7, 8 o 9 en donde el aminoácido A2 se selecciona del grupo que consiste de A, G, S, T y V, y/o el aminoácido A3 se selecciona del grupo que consiste de S, G, I, K, N, P, Q, R, y T, y/o a A4 se selecciona del grupo que consiste de E, V, Q, A, D, G, H, I, K, L, N, y R, y/o el aminoácido A5 se selecciona del grupo que consiste de S, Y, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, y V, y/o el aminoácido A6 se selecciona del grupo que consiste de V, R, I, A, G, K, L, M, y Q, y/o el aminoácido A7 se selecciona del grupo que consiste de D, V, S, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, y T, y/o el aminoácido A8 se selecciona del grupo que consiste de D, G, N, E, T, P, y S, y/o el aminoácido A9 se selecciona del grupo que consiste de L, Y, I, y M, y/o el aminoácido A10 se selecciona del grupo que consiste de L, A, I, M, y V, y/o el aminoácido A11 se selecciona del grupo que consiste de H, Y, F y S;
- (ii) El HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido B1-B8, en donde B1-B8 es KYASQSIG (SEQ ID NO:2), RYASQSIG (SEQ ID NO:67, o XYASQSIG (SEQ ID NO:68, donde X representa cualquier aminoácido) o una variante de las SEQ ID NO:2, 67 o 68 en donde el aminoácido B1 se selecciona del grupo que consiste de K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y, y X (en donde X representa cualquier aminoácido) y/o el aminoácido B4 se seleccionaba del grupo que consiste de S y D, y/o el aminoácido B5 se selecciona del grupo que consiste de Q y S, y/o el aminoácido B6 se selecciona del grupo que consiste de S, D, L, y R, y/o el aminoácido B7 se selecciona del grupo que consiste de I, V, E, y K;
- (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido C1-C9, en donde C1-C9 es QQGNSLPNT (SEQ ID NO:3) o una variante de la SEQ ID NO: 3 en donde el aminoácido C8 se selecciona del grupo que consiste de N, V, W, Y, R, S, T, A, F, H, I, L, M, y Y;
- (iv) El HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido D1-D10, en donde D1-D10 es GFFITNNYWG (SEQ ID NO:4)
- (v) El HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido E1-E17, en donde E1-E17 es GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO:5), o una variante de la SEQ ID NO:5 en donde el aminoácido E2 se selecciona del grupo

que consiste de Y, F, V, y D, y/o el aminoácido E6 se selecciona del grupo que consiste de S y G y/o el aminoácido E10 se selecciona del grupo que consiste de S y Y, y/o el aminoácido E12 se selecciona del grupo que consiste de N, T, A, y D, y/o el aminoácido E13 se selecciona del grupo que consiste de P, H, D, y A, y/o el aminoácido E15 se selecciona del grupo que consiste de L y V, y/o el aminoácido E17 se selecciona del grupo que consiste de S y G; y

- (vi) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido F2-F11, en donde F2- F11 es MTGSSGYFDF (SEQ ID NO:6) o RTGSSGYFDF (SEQ ID NO:66); o comprende la secuencia de aminoácido F1-F11, en donde F1-F11 es AMTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 63), ARTGSSGYFDF (SEQ ID NO:64), o AQTGSSGYFDF (SEQ ID NO:65), o una variante de la SEQ ID NO:6, 63, 64, 65, o 66 en donde el aminoácido F2 es R, M, A, E, G, Q, S, y/o el aminoácido F11 se selecciona del grupo que consiste de F y Y.
- 6. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es humanizado.
- 7. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 2, en donde al menos una porción de la secuencia de estructura es una secuencia de estructura de consenso humana.
- 8. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 2, en donde dicha modificación es la sustitución, inserción o supresión.
- 9. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 2, en donde la variante HVR-L1 comprende 1-10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones A2 (A, G, S, T o V), A3 (S, G, I, K, N, P, Q, R, o T), A4 (E, V, Q, A, D, G, H, I, K, L, N, o R), A5 (S, Y, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, o V), A6 (V, R, I, A, G, K, L, M, o Q), A7 (D, V, S, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, o T), A8 (D, G, N, E, T, P, o S), A9 (L, Y, I, o M), A10 (L, A, I, M, o V) y A11 (H, F, S, o Y).
- 10. El polipéptido anticuerpo de la reivindicación 2, en donde una variante HVR-L2 comprende 1-4 (1, 2, 3, o 4) sustituciones en cualquiera combinación de las

siguientes posiciones: B1 (K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y, T, H, S, E, C, D, G, o M), B5 (Q o S), B6 (S, R, o L), y B7 (I, T, E, K, o V).

11. El polipéptido anticuerpo de la reivindicación 2, en donde la variante HVR-L3 comprende al menos una sustitución en la posición C8 (W Y, R, S, A, F, H, I, L, M, N, T, o V).
12. El polipéptido anticuerpo de la reivindicación 2, en donde la variante HVR-H2 comprende 1-7(1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: E2 (Y, F, V, o D), E6 (S o G), E10 (S o Y), E12 (N, T, A, o D), E13 (P, H, D, o A), E15 (L o V), E17 (S o G).
13. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 2, en donde la variante HVR-H3 comprende en las sustituciones 1 o 2 en cualquier combinación de las siguientes posiciones: F2 (R, M, A, E, G, Q, R, o S), y F11 (F o Y).
14. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 2, comprende un HVR-L1 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 7.
15. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 2, comprende un HVR-L1 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 8.
16. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 2, comprende un HVR-L1 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 9.
17. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 2, comprende además al menos una modificación en la posición de estructura, en donde al menos una modificación esta en la posición de la cadena pesada 71 o 73 o 78.
18. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 17, en donde el aminoácido en la posición 71 es R o A, y el aminoácido en la posición 73 es N o T, y el aminoácido en la posición 78 es F o A o L.
19. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende la secuencia de la estructura de consenso de cadena pesada del subgrupo III humano de cadena pesada que comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78.

20. El anticuerpo de la reivindicación 19, en donde la sustitución es R71A, N73T, L78A o L78F.
21. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 2, que comprende un HVR-L3 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 3.
22. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 2, en donde A8 en una variante HVR-L1 es S.
23. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 2, en donde A8 en una variante HVR-L1 es D.
24. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 2, en donde A9 en una variante HVR-L1 es L.
25. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 2, en donde una secuencia de estructura entre la secuencia HVR-H2 posiciones E1-E1 y las posiciones del HVR-H3 posiciones F1-F11 es HFR3-1-HFR3-31 y en donde HFR-6 es A o R, HFR-8 es N o T, y HFR3-13 es L o A o F.
26. Un anticuerpo anti-beta7 humanizado o fragmento de unión beta7 de este, en donde la afinidad monovalente del anticuerpo al fragmento de unión al beta7 humano es sustancialmente el mismo o mayor que la afinidad monovalente de un anticuerpo que comprende las secuencias variables de cadena ligera y cadena pesada como se describió en la Fig. 1A (SEQ ID NO:10) y/o la Fig. 1B (SEQ ID NO:11), o la Fig 9A (SEQ ID NO:12) y/o la Fig.9B (SEQ ID NO:13).
27. El anticuerpo de fragmento de unión de la reivindicación 26, en donde la afinidad es al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, al menos 1000 veces, al menos 5000 veces, o al menos 10,000 veces mayor que un anticuerpo que comprende las secuencias de la cadena ligera y la cadena pesada descritas en la Fig. 1A (SEQ ID NO:10) y la Fig. 1B (SEQ ID NO: 11), o la Fig 9A (SEQ ID NO: 12) y la Fig.9B (SEQ ID NO: 13).

28. El anticuerpo o fragmento de unión de la reivindicación 27, en donde la afinidad monovalente del anticuerpo al beta7 humano es al menos 3 veces mayor que la afinidad monovalente de un anticuerpo que comprende las secuencias de la cadena ligera y la cadena pesada descritas en la Fig 1A (SEQ ID NO:10) y la Fig. 1B (SEQ ID NO:11), o la Fig 9A (SEQ ID NO:12) y la Fig.9B (SEQ ID NO:13).
29. El anticuerpo o fragmento de unión de la reivindicación 26 a 27, en donde el anticuerpo comprende las secuencias de la cadena ligera y la cadena pesada descritas en la Fig 1A (SEQ ID NO:10) y la Fig. 1B (SEQ ID NO:11), o la Fig 9A (SEQ ID NO:12) y la Fig.9B (SEQ ID NO:13) se produce mediante la línea celular de hibridoma depositada bajo el numero de acceso de la ATCC del American Type Culture Collection Acceso con la designación HB-293.
30. El anticuerpo o el fragmento de unión de la reivindicación 26, en donde la afinidad de unión se expresa como un valor K_d .
31. El anticuerpo o el fragmento de unión de la reivindicación 26, en donde la afinidad de unión se mide mediante el Biacore™ o radioinmunoensayo.
32. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de la estructura de consenso de cadena ligera subgrupo 1 κ humano.
33. El polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de la estructura de consenso de la cadena pesada subgrupo III humano de cadena pesada.
34. El anticuerpo o el fragmento de unión de una reivindicación 26, en donde el polipéptido o el anticuerpo comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 regiones hipervariables (HVR) seleccionadas del grupo que consiste de HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, en donde:
- (i) El HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácido A1-A11, en donde A1-A11 es RASESVDTYLH (SEQ ID NO: 1); RASESVDSLH (SEQ ID NO:7), RASESVDTLLH (SEQ ID NO:8), o RASESVDDLH (SEQ ID NO:9) o una variante de la SEQ ID NO:1, 7, 8 o 9 en donde el aminoácido A2 se selecciona del grupo que consiste de A, G, S, T y

215

V, y/o el aminoácido A3 se selecciona del grupo que consiste de S, G, I, K, N, P, Q, R, y T, y/o a A4 se selecciona del grupo que consiste de E, V, Q, A, D, G, H, I, K, L, N, y R, y/o el aminoácido A5 se selecciona del grupo que consiste de S, Y, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, y V, y/o el aminoácido A6 se selecciona del grupo que consiste de V, R, I, A, G, K, L, M, y Q, y/o el aminoácido A7 se selecciona del grupo que consiste de D, V, S, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, y T, y/o el aminoácido A8 se selecciona del grupo que consiste de D, G, N, E, T, P, y S, y/o el aminoácido A9 se selecciona del grupo que consiste de L, Y, I, y M, y/o el aminoácido A10 se selecciona del grupo que consiste de L, A, I, M, y V, y/o el aminoácido A11 se selecciona del grupo que consiste de H, Y, F y S;

- (ii) El HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácido B1-B8, en donde B1-B8 es KYASQISIS (SEQ ID NO:2), RYASQISIS (SEQ ID NO:67, o XYASQISIS (SEQ ID NO:68, donde X representa cualquier aminoácido) o una variante de las SEQ ID NO:2, 67 o 68 en donde el aminoácido B1 se selecciona del grupo que consiste de K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y, y X (en donde X representa cualquier aminoácido) y/o el aminoácido B4 se selecciona del grupo que consiste de S y D, y/o el aminoácido B5 se selecciona del grupo que consiste de Q y S, y/o el aminoácido B6 se selecciona del grupo que consiste de S, D, L, y R, y/o el aminoácido B7 se selecciona del grupo que consiste de I, V, E, y K;
- (iii) El HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácido C1-C9, en donde C1-C9 es QQGNSLPNT (SEQ ID NO:3) o una variante de la SEQ ID NO: 3 en donde el aminoácido C8 se selecciona del grupo que consiste de N, V, W, Y, R, S, T, A, F, H, I, L, M, y Y;
- (iv) El HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácido D1-D10, en donde D1-D10 es GFFITNNYWG (SEQ ID NO:4)
- (v) El HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácido E1-E17, en donde E1-E17 es GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO:5), o una variante de la SEQ ID NO:5 en donde el aminoácido E2 se selecciona del grupo que consiste de Y, F, V, y D, y/o el aminoácido E6 se selecciona del grupo que consiste de S y G y/o el aminoácido E10 se selecciona del grupo que consiste de S y Y, y/o el aminoácido E12 se selecciona del grupo que consiste de N, T, A, y D, y/o el aminoácido E13 se selecciona del grupo que consiste de P, H, D, y A, y/o el aminoácido E15 se selecciona del

grupo que consiste de L y V, y/o el aminoácido E17 se selecciona del grupo que consiste de S y G; y

- (vi) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido F2-F11, en donde F2- F11 es MTGSSGYFDF (SEQ ID NO:6) o RTGSSGYFDF (SEQ ID NO:66); o comprende la secuencia de aminoácido F1-F11, en donde F1-F11 es AMTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 63), ARTGSSGYFDF (SEQ ID NO:64), o AQTGSSGYFDF (SEQ ID NO:65), o una variante de la SEQ ID NO:6, 63, 64, 65, o 66 en donde el aminoácido F2 es R, M, A, E, G, Q, S, y/o el aminoácido F11 se selecciona del grupo que consiste de F y Y.
35. El anticuerpo del fragmento de unión de la reivindicación 34, en donde la posición de estructura de cadena pesada 71 comprende un aminoácido R o A y/o la posición de la estructura de la cadena pesada 73 comprende T o N, y/o la posición de la estructura de la cadena pesada 78 comprende F o A o L, la secuencia comprende en la posición 71 de la estructura de cadena pesada.
36. Un método para inhibir la interacción de la subunidad de integrina beta7 humana con una segunda subunidad y/o un ligando al poner en contacto el anticuerpo de la reivindicación 2 con la integrina beta7.
37. El método de la reivindicación 36, en donde la segunda subunidad de integrina es la subunidad integrina alfa4 y donde el ligando es MAdCAM, VCAM o fibronectina.
38. El método de la reivindicación 37, en donde la subunidad integrina alfa7 es de humano.
39. El método de la reivindicación 38, en donde el ligando es de humano.
40. El método de la reivindicación 36, en donde la segunda subunidad integrina es la subunidad integrina alfaE, y en donde el ligando es E-cadherina.
41. El método de la reivindicación 40, en donde la subunidad integrina alfaE es de humano.
42. El método de la reivindicación 41, en donde el ligando es de humano.

43. El método de la reivindicación 36, en donde la inhibición reduce o alivia los síntomas de un trastorno seleccionado del grupo que consiste de inflamación, asma, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, diabetes, inflamación que resulta de trasplante de órgano, trastorno de injerto versus huésped, inflamación asociada con trastornos de aloinjerto.
44. El método para modular la adhesión celular mediada por beta7 integrina y/o el reclutamiento en un mamífero que experimenta un trastorno al administrarle al mamífero una cantidad efectiva de una composición que comprende el polipéptido o anticuerpo de la reivindicación 2 y un vehículo farmacéutico.
45. El método de la reivindicación 44, en donde el trastorno se selecciona del grupo que consiste de inflamación, asma, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, diabetes, inflamación que resulta de trasplante de órgano, trastorno de injerto versus huésped, inflamación asociada con trastornos de aloinjerto.
46. El método de la reivindicación 44, en donde el mamífero es un humano.
47. El método de la reivindicación 44, que comprende además administrar un segundo agente biofarmacéutico o agente quimioterapéutico.
48. El método de la reivindicación 44, en donde la modulación inhibe la interacción de la beta7 integrina con la alfa4 integrina, alfaE integrina, MAdCam, VCAM, E-caderina, y/o fibronectina.
49. En una composición que comprende un polipéptido, anticuerpo o fragmento de unión anti-beta7 de estos de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5, 26 o 34, y un vehículo farmacéutico.
50. Un artículo de manufactura que comprende una composición que comprende un polipéptido de unión, anticuerpo o fragmento de unión anti-beta7 de estos de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5, 26 o 34, y un vehículo farmacéutico y un marcador que indica que la composición es para

uso en un método para tratar un desorden, en donde el trastorno se selecciona del grupo que consiste de inflamación, asma, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, diabetes, inflamación que resulta de transplante de órgano, trastorno de injerto versus huésped, inflamación asociada con trastornos de aloinjerto.

ANTAGONISTAS ANTI-BETA7 HUMANIZADOS Y USOS PARA ESTOS**RESUMEN**

La invención suministra anticuerpos anti-beta7 terapéuticos, composiciones que las comprenden, y métodos para utilizar estos anticuerpos.

220

AS: 103303

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by N. Williams

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the twenty-first of May, 2007

7. by ~~Assistant~~ Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 07023527-15

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Denitra T. Hawkins
Denitra T. Hawkins

A 7059255

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

March 26, 2007

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
APRIL 27, 2005.

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office



N. Williams
N. WILLIAMS
Certifying Officer

221

0:21am From-Genentech Legal

+1 650 852 8881

T-571 P.002/005 F-554

**RECORDATION FORM COVER SHEET
PATENTS ONLY**

U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Patent and Trademark Office

Atty Dkt No: PR2159

Commissioner for Patents: Please record the attached original documents or copy thereof.

1. Name of conveying party(ies):

Norman Fong
Mark S. Dennis

Additional name(s) of conveying party(ies) attached? ☐ Yes ☒ No

2. Name and address of receiving party(ies):

Name: GENENTECH, INC.

Internal Address:

Street Address: 1 DNA Way

City: South San Francisco State: California

ZIP: 94080-4990

Additional name(s) & address(es) attached? ☐ Yes ☒ No

Nature of conveyance:

☒ Assignment

Merger

Security Agreement

Change of Name

Other:

Execution Date: April 22, 2005; April 26, 2005

4. Application number(s) or patent number(s):

If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is:

A. Patent Application No.(s)

B. Patent No.(s)

60/607,377

Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No

5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed:

Deirdre L. Conley, Ph.D.
GENENTECH, INC.
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

6. Total number of applications and patents involved: 1

7. Total fee (37 CFR 3.41): \$ 40.00

☐ Enclosed

☒ Authorized to be charged to deposit account

8. Deposit account number:

07-0630

DO NOT USE THIS SPACE

9. Statement and signature.

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document.

Deirdre L. Conley, Ph.D.
Name of Person Signing
Registration No. 36,487

Signature

April 27, 2005

Date

Total number of pages comprising cover sheet, attachments and document: 4

Revised (10/11/95)

CH \$40.00 070630 60607377

700174448

PATENT
REEL: 016173 FRAME: 0349

Docket No. PR2159

ASSIGNMENT

WHEREAS, Sherman Fong, a citizen of USA, residing at 19 Basinside Way, Alameda, CA 94502, and Mark S. Dennis, a citizen of USA, residing at 120 Plymouth, San Carlos, CA 94070 (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

HUMANIZED FIB504 AND USES THEREFOR

for which a provisional application Serial No. 60/607,377 (Docket No. PR2159) has been filed by them on September 3, 2004; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4490, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

222

21an From Genentech Legal

+1 650 952 8881

T-571 P.004/005 F-554

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

in San Francisco

ated: 4/20/05

uth San Francisco

ated: _____

Sherman Fong
Sherman Fong

Mark S. Dennis

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

San Francisco

Witnessed: _____

San Francisco

Dated: 4-22-05

Sherman Fong

Mark S. Dennis
Mark S. Dennis

227

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Cesión a **GENENTECH, INC.**
firmado por los cedentes y el cesionario.

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 N. Williams

3. actuando en capacidad de Funcionario que Certifica

4. lleva el sello/timbre de la Oficina de marcas y patentes

Certificado

5. en Washington D.C.

6. el veintiuno de Mayo de 2007

7. por el Funcionario de autenticación, Departamento de Estado de Estados Unidos

8. No. 07023527-15

9. Sello/timbre

10. Firma

(Firma)

Denitra T. Hawkins

[sello]

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
A TODO AQUEL QUE PUEDA LLEGARLE LA PRESENTE.

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE ESTADOS UNIDOS
Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos

Marzo 26 de 2007

ESTE ES PARA CERTIFICAR QUE EL ANEXO ES UNA COPIA VERDADERA
DE LOS ARCHIVOS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO ARCHIVADO
EL 27 DE ABRIL DE 2005.

Por autoridad del
Subsecretario de Comercio para la Propiedad Intelectual
y Director de la Oficina de Marcas y Patente de Estados Unidos

N. WILLIAMS
Funcionario que Certifica

Hay un sello que dice:
Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos
Departamento de Comercio

224

HOJA DE PORTADA DEL FORMULARIO DE REGISTRO SOLAMENTE PATENTES		Departamento de Comercio Oficina de Marcas y Patentes Expediente de abogado No. PR2027
Comisionado Asistente para patentes: Por favor archive los documentos originales anexos o copias de los mismos		
1. Nombre de la(s) parte(s) cedente(s): Sherman Fong Mark S. Dennis		2. Nombre y dirección de la(s) parte(s) receptora(s) Nombre: <u>GENENTECH, INC.</u> Dirección interna: Dirección: <u>1 DNA Way</u> Ciudad: <u>South San Francisco</u> Estado: <u>California</u> ZIP: <u>94080-4990</u>
¿Se anexa(n) nombre(s) adicional(es) de parte(s) cedente(s)? _ Si ☒ No		¿Se anexan Nombre(s) y dirección(es) adicional(es)? _ Si ☒ No
3. Naturaleza del traspaso: ☒ Cesión Fusión Acuerdo de Seguridad Cambio de Nombre Otro: Fecha de Ejecución: <u>Abril 22, 2005; Abril 26, 2005</u>		
4. Numero(s) de solicitud o número(s) de patente: Si este documento se presenta junto con una nueva solicitud, la fecha de ejecución de la solicitud es: A. Solicitud de patente No(s). <u>60/607.377</u> B. Patente No(s).		
¿Se anexa numeros adicionales? _ Si ☒ No		
5. Nombre y dirección de la parte a quien se le debe enviar la correspondencia: Deirdre L. Conley, Ph.d GENENTECH, INC. 1DNA Way South San Francisco, CA 94080		6. Numero total de solicitudes y patentes involucradas: <u>1</u> 7. Tarifa total (37 C.F.R 3.41): <u>\$40.00</u> ☐ Adjunta ☒ Autorizado para cargarla a cuenta de depósito 8. Número de cuenta de Depósito: <u>07-0630</u>
NO USE ESTE ESPACIO		
9. Declaración y firma. hasta donde se y creo, la información anterior es verdadera y correcta y cualquier copia anexa es una copia verdadera del documento original. Nombre de la persona que firma (Firma) <u>Abril 27, 2005</u> <u>Deirdre L. Conley, Ph.d</u> Firma Fecha <u>Registro No. 36,487</u>		
Número total de páginas que comprenden portada, anexos y documento: <u>4</u>		

700174448

PATENTE
ROLLO: 016173 CUADRO: 0349

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, Sherman Fong, un ciudadano de los E.U.A., residente en 19 Basinside Way, Alameda, CA 94502, y Mark S. Dennis, un ciudadano de los E.U.A., residente en 120 Plymouth, San Carlos, CA 94070 (en adelante referidos como "CEDENTE"), han inventado una invención nueva y útil

FIB504 HUMANIZADA Y USOS PARA LA MISMA

para la cual se presentó la solicitud provisional con Serie No. 60/607,377 (Expediente No. PR2159) por ellos el 3 de Septiembre de 2004; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dicho CEDENTE ha y por la presente vende, cede, transfiere y traspasa a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dicho CEDENTE garantiza y acuerda cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., a disfrutar hasta su máxima extensión el derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTE incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucren dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucren dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dicho CEDENTE al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben lastimar a beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTE, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dicho CEDENTE por la presente garantiza y manifiesta que no ha entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

PATENTE

ROLLO: 016173 CUADRO 0350

225

EN TESTIMONIO DE LO CUAL suscribimos como sigue:

South San Francisco

4/26/05
Fecha

South San Francisco

Fecha

(Firma)
Sherman Fong

Mark S. Dennis

PATENTE
ROLLO: 015520 CUADRO 0541

EN TESTIMONIO DE LO CUAL suscribimos como sigue:

South San Francisco

Sherman Fong

Fecha

South San Francisco

(firma)
Mark S. Dennis

4-22-05
Fecha

CERTIFICADO: 04/27/2005

PATENTE
ROLLO: 016173 CUADRO 0352