

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



B.T.

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

Division de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21 EXPEDIENTE No

07-21258

54 TITULO

ANTAGONISTAS ANTIBETA7 HUMANIZADOS Y USOS PARA ESTOS

51 CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K39/395

A61P5/00

71 SOLICITANTE

GENENTECH INC

DOMICILIO

SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS

74 APODERADO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22 SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

02-03-2007

FF 03 04 2007
C JA

SS

PETITORIO

AS 103 303



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad 07-021258-00000-0000
FOLIO 001/03472 1048/20 Dep 2020 NUEVE ALFOMBRAS
1ra 11 PATENTE
EPO 3/8 FASE NACIONAL
AR 411 PRESENTACION FOLIO 005

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I

☐ Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre GENENTECH, INC

Dirección 1 DNA Way, South San Francisco, CA
94080-4990, US
Nacionalidad o Domicilio Estados Unidos
Lugar de Constitución Estados Unidos
Teléfono Fax
E-mail

IDENTIFICACION

CC ☐ NIT ☐

CE ☐ Otro ☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección Carrera 7 # 71 - 21 Torre B - Piso 4
Teléfono 744-2200 Fax 744-2700
E-mail

IDENTIFICACION

CC ☒ NIT ☐

CE ☐ Otro ☐

Cual

Número 80 410 337 TP 57492

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre Mark S. Dennis, Sherman Fong

Dirección 120 Plymouth, San Carlos, California 94070, US, 19 Basinside Way, Alameda,
California 94502, Estados Unidos de América (Respectivamente)
Nacionalidad o Domicilio Estados Unidos de América (Respectivamente)

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No PCT/US2005/031401 Fecha 02-09-2005

Publicación Internacional No WO 2006/026759 A3 Fecha 09-03-2006

6 Título (54) ANTAGONISTAS ANTIBETA7 HUMANIZADOS Y USOS PARA ESTOS

7 Clasificación Internacional (51)

A61K39/395 // A61P5/00

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

03-09-2004

(31) Número de Solicitud

60/607,377

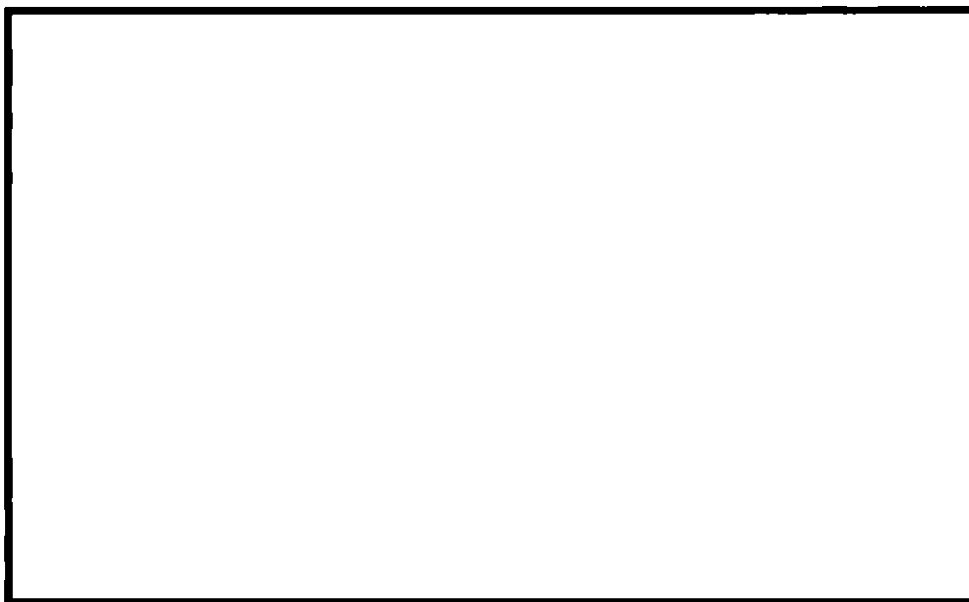
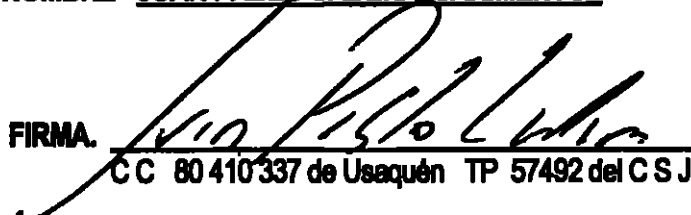
9 Comprobante de pago No. 07-13,491

Fecha 02-03-2007

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

2020-F06 (01-11-15)

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud \$482 000
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso Fotocopia Autenticada
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☒ Otros Listado de Secuencias
Tarjeta de Propietarios
Documentos PCT

11 FIGURA CARACTERÍSTICA.**12 Solicito la concesión de la patente,****NOMBRE** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**FIRMA.**
C C 80 410 337 de Usaquén TP 57492 del C S J

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

As 110203 3

1

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Hed 07-021258-00000-0000
FOL 207-03472 1049/20 LOP ASUNUECHERACIONES
178 11 PATENTE
EVS 2/8 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 345

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 000176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA 07 13,491
FECHA FEBRERO 14 DE 2007

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110 4	52423538	14/02/2007	17,370,000 00

C O N C E P T O

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRANITES DE SOL DE PATENTE DE IN	482,000
		TOTAL	482,000 00

SOM CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE ☒ PCT/US2005/031401 MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

SOLICITANTE/S RAZON SOCIAL O APELLIDOS Y NOMBRES GENENTECH, INC

DOMICILIO SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

TITULO ANTAGONISTAS ANTIBETA7 HUMANIZADOS Y USOS PARA ESTOS

CLASIFICACION _____

EXPEDIENTE No. _____ FECHA DE SOLICITUD _____ ROLLO MICROFILM _____

CERTIFICADO No. _____ FECHA DE CONCESION _____ VIGENCIA DESDE _____ HASTA _____

PRORROGA _____ CAMBIO DE NOMBRE _____

TRASPASO A _____

INVENTOR (ES) MARK S. DENNIS, SHERMAN FONG

OTROS _____

OFICINA DE COMUNICACIONES

103 303
X 5

(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 (15)) 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) PONG, Sherman [US/US] 19 Bannside Way
Alameda California 94502 (US)

(74) Agent CONLEY, Deirdra, 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 GH, GI, 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 30/2006 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

6

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

CORRECTED VERSION

(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 A2

(51) International Patent Classification: Not classified

(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): GENENTECH, INC. [US/US] 1 DNA Way South San Francisco, California 94080-4990 (US)

(72) Inventors and

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

(74) Agent: CONLEY Delidre, 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, GR, GM, HN, 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, MY, 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, IT, I, U, 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, TO).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(48) Date of publication of this corrected version: 18 May 2006

(15) Information about Correction: see PCT Gazette No. 20/2006 of 18 May 2006

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

(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.

WO 2006/026759 A2

(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 A2

- (51) International Patent Classification Not classified (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
- (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
- (73) 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, Delirdra, L., MS 49 1 DNA Way South San Francisco California 94080 (US)
- (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
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette

(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

WO 2006/026759 A2

Immunopathol., 1995, 16 375-379), colitis (Viney et al, J Immunol., 1996, 157 2488-2497) and inflammatory bowel diseases (IBD; Podalski, D.K., N Eng. J Med., 1991, 325 928-937, Powrie, F et al, Ther Immunol., 1995, 2.115-123) Monoclonal antibodies directed against beta7 subunit have been shown to bind the integrin subunit (Tidswell, M et al. (1997) J Immunol. 159-1497-1505) but as non-human or non-humanized antibodies, they lack clinical usefulness

A need exists for highly specific compounds, such as humanized antibodies or binding fragments thereof which inhibit the interaction between the alpha4beta7 integrin and its ligands MAdCAM and/or VCAM as well as the interaction between the alphaEbeta7 integrin and its ligand E-cadherin. These compounds are useful for treatment of chronic inflammatory diseases such as asthma, Crohn's disease, ulcerative colitis, diabetes, complications of organ transplantation, and allograft-related disorders.

All references cited herein, including patent applications and publications, are incorporated by reference in their entirety

DISCLOSURE OF THE INVENTION

The invention is in part based on the identification of a variety of antagonists of biological pathways involving beta7-containing integrins, which are generally biological/cellular processes that presents as an important and advantageous therapeutic target. Such biological pathways include, without limitation, inflammation, particularly chronic inflammation disorders such as asthma, allergy, IBD, diabetes, transplantation and grafts versus host disorders. The invention provides compositions and methods based on interfering with beta7 integrin-mediated cellular adhesion and/or recruitment, including but not limited to interfering with MAdCAM and VCAM-1 binding to the extracellular portion of alpha4beta7 integrin and E-cadherin interaction with the alphaEbeta7 integrin interaction. Antagonists of the invention, as described herein, provide important therapeutic and diagnostic agents for use in targeting pathological conditions associated with abnormal or unwanted signaling via a beta7 integrin. Accordingly, the invention provides methods, compositions, kits and articles of manufacture related to modulating beta7 integrin-mediated pathways, including modulation of MAdCAM-alpha4beta7 binding and leukocyte recruitment to gastrointestinal epithelium, binding and allergy, asthma, IBD (such as Crohn's disease and ulcerative colitis), diabetes, inflammation associated with transplantation, graft versus host disorder and/or allograft disorders and other biological/physiological activities mediated by beta7 integrin.

In one aspect, the invention provides anti-beta7 therapeutic agents suitable for therapeutic use and capable of effecting varying degrees of disruption of a beta7 integrin-mediated pathway. For example, in one embodiment, the invention provides a humanized anti-beta7 antibody wherein the antibody as a Fab fragment has substantially the same binding affinity to human beta7 as a murine Fab fragment comprising, consisting or consisting essentially of a light chain and heavy chain variable domain sequence as depicted in Figs 1A and 1B or Fig. 9A and 9B. In another

embodiment, the invention provides a humanized anti-beta7 antibody wherein the antibody as a Fab fragment has a binding affinity to human beta7 that is lower for example at least 3, at least 5, at least 7 or at least 10-fold lower, than that of a murine or rat Fab fragment comprising, consisting or consisting essentially of a light chain and heavy chain variable domain sequence as depicted in Fig 1A and 1B or the variable domain sequences depicted in Figs 9A and 9B. Alternatively, a humanized anti-beta7 antibody, or beta7 binding fragment thereof of the invention exhibits monovalent affinity to human beta7, which affinity is substantially the same as or greater than monovalent affinity to human beta7 of an antibody comprising light chain and heavy chain variable sequences as depicted in Fig. 1A (SEQ ID NO 10) and/or Fig. 1B (SEQ ID NO 11), or Fig. 9A (SEQ ID NO 12) and/or Fig. 9B (SEQ ID NO 13). The antibody or binding fragment thereof having great affinity to human beta7 exhibits an affinity which is at least 2-fold, at least 5-fold, at least 10-fold, at least 50-fold, at least 100-fold, at least 500-fold, at least 1000-fold, at least 5000-fold, or at least 10,000-fold greater than an antibody comprising the light chain and heavy chain sequences depicted in Fig. 1A (SEQ ID NO 10) and/or Fig. 1B (SEQ ID NO 11), or Fig. 9A (SEQ ID NO 12) and/or Fig. 9B (SEQ ID NO 13).

In another embodiment, the invention provides an anti-beta7 humanized antibody wherein the antibody as a Fab fragment has a binding affinity to human beta7 that is greater, for example at least 3, at least 5, at least 7, at least 9, at least 10, at least 15, at least 20, or at least 100-fold greater than that of a rodent (such as rat or murine) Fab fragment comprising, consisting or consisting essentially of a light chain and heavy chain variable domain sequence as depicted in Fig. 1A and Fig. 1B, respectively. In one embodiment, said rodent Fab fragment has the binding affinity of a Fab fragment comprising variable domain sequences of a rat antibody designated FIB504.64 produced by hybridoma cell line deposited under American Type Culture Collection Accession Number ATCC HB-293. In a further embodiment, a humanized Fab fragment of the invention has the binding affinity of a Fab fragment comprising variable domain sequences of an antibody produced by any one of the humanized anti-beta7 antibodies of the invention. As is well-established in the art, binding affinity of a ligand to its receptor can be determined using any of a variety of assays, and expressed in terms of a variety of quantitative values. Accordingly, in one embodiment, the binding affinity is expressed as K_d values and reflects intrinsic binding affinity (e.g., with minimized avidity effects). Generally and preferably, binding affinity is measured *in vitro*, whether in a cell-free or cell-associated setting. As described in greater detail herein, fold difference in binding affinity can be quantified in terms of the ratio of the binding affinity value of a humanized antibody in Fab form and the binding affinity value of a reference/comparator Fab antibody (e.g., a murine antibody having donor hypervariable region sequences), wherein the binding affinity values are determined under similar assay conditions. Thus, in one embodiment, the fold difference in binding affinity is determined as the ratio of the K_d values of the humanized antibody in Fab form and said reference/comparator Fab antibody. Any of a number of assays known in the art, including

those described herein, can be used to obtain binding affinity measurements, including, for example, Biacore® (Biacore International AB, Uppsala, Sweden) and ELISA.

In its various aspects and embodiments, the beta7 antagonist antibody of the invention is directed to the following set of potential claims for this application. Antibody comprising an anti-beta7 antibody or beta7 binding fragment thereof comprising

(a) at least one, two, three, four, or five or hypervariable region (HVR) sequences selected from the group consisting of

(i) HVR-L1 comprising sequence A1-A11, wherein A1-A11 is RASESVDTYLH (SEQ ID NO 1)

(ii) HVR-L2 comprising sequence B1-B8, wherein B1-B8 is KYASQSIG (SEQ ID NO 2)

(iii) HVR-L3 comprising sequence C1-C9, wherein C1-C9 is QQGNSLPNT (SEQ ID NO 3)

(iv) HVR-H1 comprising sequence D1-D10, wherein D1-D10 is GFFITNNYWG (SEQ ID NO 4)

(v) HVR-H2 comprising sequence E1-E17, wherein E1-E17 is GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO 5), and

(vi) HVR-H3 comprising sequence F2-F11, wherein F2-F11 is MTGSSGYFDF (SEQ ID NO 6)

In an embodiment of the polypeptide or antibody of claim 1, the polypeptide or antibody comprises at least one variant HVR, wherein the variant HVR sequence comprises modification of at least one residue of at least one of the sequences depicted in SEQ ID NOs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, and 9

In another embodiment of claim 1 or claim 2, the invention comprises an anti-beta7 antibody or beta7 binding fragment thereof comprising one, two, three, four, five or six hypervariable regions (HVRs) selected from the group consisting of HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein

(i) HVR-L1 comprises amino acid sequence RASESVDTYLH (SEQ ID NO 1) RASESVDSLH (SEQ ID NO 7), RASESVDTLLH (SEQ ID NO 8), or RASESVDDLH (SEQ ID NO 9)

(ii) HVR-L2 comprises amino acid sequence KYASQSIG (SEQ ID NO 2) RYASQSIG

(SEQ ID NO-67, or XYASQSIG (SEQ ID NO 68, where X represents any amino acid),

(iii) HVR-L3 comprises QQGNSLPNT (SEQ ID NO 3)

(iv) HVR-H1 comprises amino acid sequence GFFITNNYWG (SEQ ID NO 4),

(v) HVR-H2 comprises amino acid sequence GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO.5), and

(vi) HVR-H3 comprises amino acid sequence MTGSSGYFDF (SEQ ID NO 6) or RTGSSGYFDF (SEQ ID NO 66) for relative positions F2-F11 or comprises amino acid sequence F1 F11 wherein F1-F11 is AMTGSSGYFDF (SEQ ID NO 63), ARTGSSGYFDF (SEQ ID NO 64), or AQTGSSGYFDF (SEQ ID NO:65).

In still another embodiment of claim 1 or any of the embodiments, the invention comprises an anti-beta7 antibody or beta7 binding fragment thereof comprising one, two, three, four, five or six hypervariable regions (HVRs) selected from the group consisting of HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein.

(i) HVR-L1 comprises amino acid sequence A1-A11, wherein A1-A11 is RASESVDTYLH (SEQ ID NO-1), RASESVDSLH (SEQ ID NO-7), RASESVDTLLH (SEQ ID NO 8), or RASESVDDLH (SEQ ID NO 9) or a variant of SEQ ID NOs 1, 7, 8 or 9 wherein amino acid A2 is selected from the group consisting of A, G, S, T, and V and/or amino acid A3 is selected from the group consisting of S, G, I, K, N, P, Q, R, and T, and/or A4 is selected from the group consisting of E, V, Q, A, D, G, H, I, K, L, N, and R, and/or amino acid A5 is selected from the group consisting of S, Y, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, and V, and/or amino acid A6 is selected from the group consisting of V, R, I, A, G, K, L, M, and Q, and/or amino acid A7 is selected from the group consisting of D, V, S, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, and T and/or amino acid A8 is selected from the group consisting of D, G, N, E, T, P and S, and/or amino acid A9 is selected from the group consisting of L, Y, I and M, and/or amino acid A10 is selected from the group consisting of L, A, I, M, and V and/or amino acid A11 is selected from the group consisting of H, Y, F, and S,

(ii) HVR-L2 comprises amino acid sequence B1-B8, wherein B1-B8 is KYASQSIG (SEQ ID NO:2), RYASQSIG (SEQ ID NO 67, or XYASQSIG (SEQ ID NO-68,

where X represents any amino acid) or a variant of SEQ ID NOs 2, 67 or 68 wherein amino acid B1 is selected from the group consisting of K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y and X (where X represents any amino acid), and/or amino acid B4 is selected from the group consisting of S and D, and/or amino acid B5 is selected from the group consisting of Q and S, and/or amino acid B6 is selected from the group consisting of S, D, L, and R, and/or amino acid B7 is selected from the group consisting of I, V, E, and K,

(iii) HVR-L3 comprises amino acid sequence C1-C9, wherein C1-C9 is QQGNSLPNT (SEQ ID NO 3) or a variant of SEQ ID NO 3 wherein amino acid C8 is selected from the group consisting of N, V, W, Y, R, S, T, A, F, H, I, L, M, and Y,

(iv) HVR-H1 comprises amino acid sequence D1-D10 wherein D1-D10 is GFFITNNYWG (SEQ ID NO 4),

(v) HVR-H2 comprises amino acid sequence E1-E17 wherein E1-E17 is GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO 5), or a variant of SEQ ID NO 5 wherein amino acid E2 is selected from the group consisting of Y, F, V, and D, and/or amino acid E6 is selected from the group consisting of S and G, and/or amino acid E10 is selected from the group consisting of S and Y, and/or amino acid E12 is selected from the group consisting of N, T, A, and D, and/or amino acid E13 is selected from the group consisting of P, H, D, and A, and/or amino acid E15 is selected from the group consisting of L and V, and/or amino acid E17 is selected from the group consisting of S and G, and

(vi) HVR-H3 comprises amino acid sequence F2-F11 wherein F2-F11 is MTGSSGYFDF (SEQ ID NO 6) or RTGSSGYFDF (SEQ ID NO 66), or comprises amino acid sequence F1-F11, wherein F1-F11 is AMTGSSGYFDF (SEQ ID NO 63), ARTGSSGYFDF (SEQ ID NO 64), or AQTGSSGYFDF (SEQ ID NO 65), or a variant of SEQ ID NOs 6, 63, 64, 65, or 66 wherein amino acid F2 is R, M, A, E, G, Q, S, and/or amino acid F11 is selected from the group consisting of F and Y

In one embodiment of claim 1 or any of the antibodies of the invention, the amino acid at heavy chain framework position 71 (according to the Kabat numbering system) is selected from the group consisting of R, A, and T, and/or the amino acid at heavy chain framework position 73 (Kabat numbering system) is selected from the group consisting of N and T, and/or the amino acid at heavy chain framework position 78 (Kabat numbering system) is selected from the group

consisting of F, A, and L.

In one embodiment of claim 1 or any of the antibodies of the invention, HVR-L1 of an antibody of the invention comprises the sequence of SEQ ID NO-1. In one embodiment, HVR-L2 of an antibody of the invention comprises the sequence of SEQ ID NO-2. In one embodiment, HVR-L3 of an antibody of the invention comprises the sequence of SEQ ID NO-3. In one embodiment, HVR-H1 of an antibody of the invention comprises the sequence of SEQ ID NO-4. In one embodiment, HVR-H2 of an antibody of the invention comprises the sequence of SEQ ID NO-5. In one embodiment, HVR-H3 of an antibody of the invention comprises the sequence of SEQ ID NOs 6 or 66 for relative positions F2-F11 or SEQ ID NOs 63, 64, or 65 for relative positions F1-F11. In one embodiment, HVR-L1 comprises RASESVDSLH (SEQ ID NO 7). In one embodiment, HVR-L1 comprises RASESVDTLLH (SEQ ID NO 8). In one embodiment, HVR-L1 comprises RASESVDDLH (SEQ ID NO-9). In one embodiment, an antibody of the invention comprising these sequences (in combinations as described herein) is humanized or human.

In one aspect, the invention provides an antibody comprising one, two, three, four, five or six HVRA, wherein each HVR comprises, consists or consists essentially of a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9, and wherein SEQ ID NO 1, 7, 8 or 9 corresponds to an HVR-L1, SEQ ID NO-2 corresponds to an HVR-L2, SEQ ID NO 3 corresponds to an HVR-L3, SEQ ID NO-4 corresponds to an HVR-H1, SEQ ID NO-5 corresponds to an HVR-H2, and SEQ ID NOs 6 corresponds to an HVR-H3. In one embodiment, an antibody of the invention comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each, in order, comprises SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5 and 6. In one embodiment, an antibody of the invention comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each, in order, comprises SEQ ID NO 7, 2, 3, 4, 5 and 6. In one embodiment, an antibody of the invention comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each, in order, comprises SEQ ID NO-8, 2, 3, 4, 5 and 6. In one embodiment, an antibody of the invention comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each, in order, comprises SEQ ID NO-9, 2, 3, 4, 5 and 6. In one embodiment, an antibody of the invention comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3 wherein each, in order, comprises SEQ ID NO-9, 2, 3, 4, 5 and 66, or SEQ ID NO 9, 2, 3, 4, 5, 63 or SEQ ID NO-9, 2, 3, 4, 5, 64 or SEQ ID NO-9, 2, 3, 4, 5, and 65 or SEQ ID NO 9, 67, 3, 4, 5, 64 or SEQ ID NO 9, 68, 3, 4, 5, 64.

Variant HVRA in an antibody of the invention can have modifications of one or more residues within the HVR and the HVRA and/or framework regions may be humanized.

Embodiments of the invention in which there is an HVR and/or framework modification include, without limitation, the following potential claims for this application:

2. The antibody of claim 1 or any of its embodiments, wherein A8 in a variant HVR-L1 is S, D or T

and A9 is L.

- 3 The antibody of claim 1 or any of its embodiments, wherein the antibody is humanized
- 34 The antibody of claim 1 or any of its embodiments, wherein at least a portion of the framework sequence is a human consensus framework sequence.
- 5 The antibody of claim 1 or any of its embodiments, wherein said modification is substitution, insertion or deletion.
- 10 6 The antibody of claim 1 or any of its embodiments, wherein a HVR-L1 variant comprises 1-10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 or 10) substitutions in any combination of the following positions A2 (G, S, T, or V), A3 (G, I, K, N, P, Q, R, or T), A4 (A, D, G, H, I, K, L, N, Q, R, or V), A5 (A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, V, or Y), A6 (A, G, I, K, L, M, Q, or R), A7 (A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, T, or V), A8 (S, D, E, G, P, or N) and A9 (L, I, or M), A10 (A, I, M, or V), and A11 (F, S, or Y).
- 7 The antibody of claim 1 or any of its embodiments, wherein a HVR-L2 variant comprises 1-4 (1, 2, 3 or 4) substitutions in any combination of the following positions B1 (N), B5 (S), B6 (R or L), and B7 (T, E, K, or V)
- 20 8. The antibody of claim 1 or any of its embodiments, wherein a HVR-L3 variant comprises at least one substitution at position C8 (W, Y, R, S, A, F, H, I, L, M, N, T, or V)
- 9 The antibody of claim 1 or any of its embodiments, wherein a HVR-H2 variant comprises 1-7 (1, 2, 3, 4, 5, 6, or 7) substitutions in any combination of the following positions E2 (V, D, or F), E6 (G), E10 (Y), E12 (A, D, or T), E13 (D, A or H), E15 (V), E17 (G).
- 25 10. The antibody of claim 1 or any of its embodiments, wherein a HVR-H3 variant comprises at 1 or 2 substitutions in any combination of the following positions. F2 (A, E, G, Q, R, or S), and F11 (Y)
- 30 11 The antibody of claim 1 or any of its embodiments, comprising an HVR-L1 having the sequence of SEQ ID NO 7
- 35 12. The antibody of claim 1 or any of its embodiments, comprising an HVR-L1 having the sequence of SEQ ID NO 8

- 13 The antibody of claim 1 or any of its embodiments, comprising an HVR-L1 having the sequence of SEQ ID NO-9
14. The antibody of any one of claims 11-13 comprising a heavy chain human subgroup III heavy
5 chain consensus framework sequence comprising a substitution at position 71, 73 and/or 78
- 15 The antibody of claim 14, wherein the substitution is R71A, N73T and/or N78A.
- 16 The antibody of claim 1 or any of its embodiments, comprising an HVR-L3 having the sequence
10 of SEQ ID NO:3
- 17 The antibody of claim 1 or any of its embodiments wherein A8 in a variant HVR-L1 is S
- 18 The antibody of claim 1 or any of its embodiments, wherein A8 in a variant HVR-L1 is D
15
- 19 The antibody of claim 1 or any of its embodiments, wherein A9 in a variant HVR-L1 is L.
- 20 The antibody of claim 1 or any of its embodiments, wherein a framework sequence between
sequence E1-E17 and F1-F11 is HFR3-1-HFR3-31 and wherein HFR3-6 is A or R, HFR3-8 is N
20 or T, and HFR3-13 is L or A or F
- 21 A humanized anti-beta7 antibody wherein monovalent affinity of the antibody to human beta7 is
substantially the same as monovalent affinity of a rat antibody comprising a light chain and
heavy chain variable sequence as depicted in Fig. 9
25
22. A humanized anti-beta7 antibody wherein monovalent affinity of the antibody to human beta7 is
at least 3-fold greater than monovalent affinity of a rat antibody comprising a light chain and
heavy chain variable sequence as depicted in Fig. 9
- 3023 The humanized antibody of claim 21 or 22 wherein the rat antibody is produced by hybridoma
cell line deposited under American Type Culture Collection Accession Number ATCC with
designation HB-293
- 24 The antibody of any of claims 21-23 wherein the binding affinity is expressed as a Kd value.
35
- 25 The antibody of any of claim 21-24 wherein the binding affinity is measured by Biacore™ or
radioimmunoassay

26. The antibody of claim 1 comprising human κ subgroup I light chain consensus framework sequence.
- 527 The antibody of claim 1 comprising heavy chain human subgroup III heavy chain consensus framework sequence
- 28 The antibody of claim 27 wherein the framework sequence comprises a substitution at position 71, 73 and/or 78
- 10 29 The antibody of claim 28 wherein said substitution is R71A, N73T and/or N78A or wherein the substituted amino acid at position 71 is R or A, and/or the amino acid substitution at position 78 is N or T, and/or the amino acid substitution at position 78 is L or A or F
- 15 30 The antibody of claim 28 wherein said substitution is L78F or A78F or A78L or L78A.
- 31 A method of inhibiting the interaction of a human beta7 integrin subunit with a second integrin subunit and/or a ligand by contacting the antibody of any one of claims 1-30 with the second integrin subunit and/or the ligand.
- 20 32. The method of claim 31, wherein the second integrin subunit is alpha4 integrin subunit, and wherein the ligand is MAdCAM, VCAM or fibronectin
- 33 The method of claim 32, wherein the alpha4 integrin subunit is human
- 25 34 The method of claim 33, wherein the ligand is human.
- 35 The method of claim 32, wherein the second integrin subunit is alphaE integrin subunit, and wherein the ligand is E-cadherin
- 30 36 The method of claim 35, wherein the alphaE integrin subunit is human
- 37 The method of claim 36, wherein the ligand is human
- 35 38 The method of claim 31, wherein the inhibiting reduces or alleviates symptoms of a disorder selected from inflammation, asthma, inflammatory bowel disease, Crohn's disease,

ulcerative colitis, diabetes, inflammation resulting of organ transplantation, graft versus host disorder, and inflammation associated with allograft disorders

Further embodiments of the invention include without limitation the following.

In one embodiment, a HVR-L1 is SEQ ID NO 1, 7, 8, or 9 or a HVR-L1 variant of SEQ ID NO 1, 7, 8, or 9 which comprises 1-10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10) substitutions at relative positions A1-A11, in any combination of the following positions A2 (A, G, S, T, or V), A3 (S, G, I, K, N, P, Q, R, or T), A4 (E, A, D, G, H, I, K, L, N, Q, R, or V), A5 (S, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, V, or Y), A6 (V, A, G, I, K, L, M, Q, or R), A7 (D, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, T, or V), A8 (T, S, D, E, G, P, or N) and A9 (Y, L, I, or M), A10 (L, A, I, M, or V) and A11 (H, F, S, or Y). In one embodiment, a HVR-L2 is SEQ ID NO 2, 67, or 68 or a HVR-L2 variant of SEQ ID NO 2, 67, or 68 which HVR-L2 variant comprises 1-4 (1, 2, 3, 4, or 5) substitutions at relative positions B1-B8, in any combination of the following positions B1 (K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y or X (where X represents any amino acid), B4 (S), B5 (Q or S), B6 (S, R or L), and B7 (I, T, E, K, or V). In one embodiment, a HVR-L3 is SEQ ID NO 3 or a HVR-L3 variant of SEQ ID NO 3 which comprises at least one substitution at relative positions C1-C8, such as at position C8 (W, Y, R, S, A, F, E, I, L, M, N, T or V). In one embodiment, a HVR-H1 is SEQ ID NO 4. In one embodiment, a HVR-H2 is SEQ ID NO 5 or a HVR-H2 variant of SEQ ID NO 5 which HVR-H2 variant comprises 1-7 (1, 2, 3, 4, 5, 6, or 7) substitutions at relative positions E1-E17 in any combination of the following positions E2 (Y, V, D, or F), E6 (S or G), E10 (S or Y), E12 (N, A, D, or T), E13 (P, D, A, or H), E15 (L or V), E17 (S or G). In one embodiment, a HVR-H3 is SEQ ID NOs 6, 63, 64, 65, or 66 or a HVR-H3 variant of SEQ ID NOs 6, 63, 64, 65, or 66 which comprises at relative positions F1-F11 for SEQ ID NOs 63, 64, and 65 or at relative positions F2-F11 for SEQ ID NOs 6 and 66, 1 or 2 substitutions in any combination of the following positions F2 (M, A, E, G, Q, R, or S), and F11 (F or Y). Letter(s) in parenthesis following each position indicates an illustrative substitution (i.e., replacement) amino acid for a consensus or other amino acid as would be evident to one skilled in the art, suitability of other amino acids as substitution amino acids in the context described herein can be routinely assessed using techniques known in the art and/or described herein.

In one embodiment, a HVR-L1 comprises the sequence of SEQ ID NO 1. In one embodiment, A8 in a variant HVR-L1 is D. In one embodiment, A8 in a variant HVR-L1 is S. In one embodiment, A9 in a variant HVR-L1 is L. In one embodiment, A8 in a variant HVR-L1 is D and A9 in a variant HVR-L1 is L. In one embodiment, A8 in a variant HVR-L1 is S and A9 in a variant HVR-L1 is L. In some embodiments of the invention comprises these variations in the HVR-L1, the HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3 comprises or consists of or consists essentially of, in order, SEQ ID NO 2, 3, 4, 5, and 6. In some embodiments, HVR-H3 comprises or consists of or consists essentially of SEQ ID NO 6 or 66 (for relative positions F2-F11) or SEQ ID NO 63 or 64 or 65 (for relative positions F1-F11).

In one embodiment, A8 in a variant HVR-L1 is I and the and A9 in a variant HVR-L1 is L,

which variant further comprises the HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, each HVR comprising, consisting of, or consist essentially of in order, SEQ ID NO 2, 3, 4, 5, and 6

In one embodiment, A8, A9, and A10 in a variant HVR-L1 are D, L, and V, respectively, which variant further comprises the HVR-L2, HVR L3 HVR-H1 HVR-H2, and HVR-H3, each HVR comprising, consisting of, or consist essentially of in order, SEQ ID NO 2 3, 4, 5, and 6.

In one embodiment, A8 and A9 in a variant HVR-L1 are N and L, respectively, which variant further comprises the HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, each HVR comprising, consisting of, or consist essentially of, in order, SEQ ID NO 2, 3 4, 5, and 6.

In one embodiment, A8 and A9 in a variant HVR-L1 are P and L, respectively, and B6 and B7 in a variant HVR-L2 are R and T, respectively, which variant further comprises the HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, each HVR comprising, consisting of, or consist essentially of, in order SEQ ID NO 3, 4, 5, and 6.

In one embodiment, A2, A4 A8, A9, and A10 in a variant HVR-L1 are S, D, S, L, and V respectively, which variant further comprises the HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, each HVR comprising, consisting of, or consist essentially of, in order, SEQ ID NO-2, 3, 4, 5, and 6

In one embodiment, A5 and A9 in a variant HVR-L1 are D and T, respectively, which variant further comprises the HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, each HVR comprising, consisting of, or consist essentially of, in order, SEQ ID NO.2, 3, 4, 5, and 6

In one embodiment, A5 and A9 in a variant HVR-L1 are N and L, respectively which variant further comprises the HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 HVR-H2, and HVR-H3, each HVR comprising, consisting of, or consist essentially of, in order SEQ ID NO 2, 3 4, 5 and 6

In one embodiment, A9 in a variant HVR-L1 is L, which variant further comprises the HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3 each HVR comprising, consisting of, or consist essentially of, in order, SEQ ID NO-2, 3, 4, 5, and 6

In one embodiment, the antibody or anti-beta7 binding polypeptide of the invention comprises an HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3 HVR-H1 HVR-H2, and HVR-H3, each HVR comprising, consisting of, or consisting essentially of in order SEQ ID NO-9, 2, 3, 4, 5, and 64 In another embodiment, each HVR comprises, consists of or consists essentially of, in order, SEQ ID NO-9, 67, 3, 4, 5, and 64 In another embodiment, each HVR comprises, consists of, or consists essentially of, in order, SEQ ID NO-9, 68, 3, 4, 5, and 64. In another embodiment, each HVR comprises, consists of, or consists essentially of, in order, SEQ ID NO-9, 2 or 67 or 68, 3, 4, 5, and 66.

In some embodiments, said variant HVR-L1 antibody variants further comprises HVR-L2, HVR-L3, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs 2 3, 4, 5, and 6. Where the antibody variant comprises HVR-L1 A8(P) and A9(L) and HVR-L2 B6(R) and B7(T), in some embodiments said HVR-L1, HVR-L2

variant further comprises HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs 3, 4, 5, and 6

In some embodiments, these antibodies further comprise a human subgroup III heavy chain framework consensus sequence. In one embodiment of these antibodies, the framework consensus sequence comprises substitution at position 71, 73 and/or 78. In some embodiments of these antibodies, position 71 is A, 73 is T and/or 78 is A. In one embodiment of these antibodies, these antibodies further comprise a human κ light chain framework consensus sequence.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a HVR-L1 comprising SEQ ID NO 1. In one embodiment, a variant antibody of the invention comprises a variant HVR-L1 wherein A10 is V. In one embodiment, said variant antibody further comprises HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 and HVR-H3, wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs 2, 3, 4, 5 and 6. In some embodiments, these antibodies further comprise a human subgroup III heavy chain framework consensus sequence. In one embodiment of these antibodies, the framework consensus sequence comprises substitution at position 71, 73 and/or 78. In some embodiments of these antibodies, position 71 is A, 73 is T and/or 78 is A. In one embodiment of these antibodies, these antibodies further comprise a human κ light chain framework consensus sequence.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a HVR-L3 comprising SEQ ID NO 3. In one embodiment, a variant antibody of the invention comprises a variant HVR-L3 wherein C8 is L. In one embodiment, said variant antibody further comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 and HVR-H3, wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs 1, 2, 4, 5 and 6. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-L3 wherein C8 is W. In one embodiment, said variant antibody further comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 and HVR-H3, wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs 1, 2, 4, 5 and 6. In some embodiment, HVR-L1 comprises SEQ ID NO 7, 8, or 9. In some embodiments, these antibodies further comprise a human subgroup III heavy chain framework consensus sequence. In one embodiment of these antibodies, the framework consensus sequence comprises substitution at position 71, 73 and/or 78. In some embodiments of these antibodies, position 71 is A, 73 is T and/or 78 is A. In one embodiment of these antibodies, these antibodies further comprise a human κ light chain framework consensus sequence.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a HVR-H3 comprising SEQ ID NO 6. In one embodiment, a variant of said antibody comprises a variant HVR-H3 wherein F1 is Q. In one embodiment, said variant antibody further comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 and HVR-H2, wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs 1, 2, 3, 4, and 5. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H3 wherein F1 is R. In one embodiment, said variant antibody further comprises HVR L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 and HVR-H2, wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs 1, 2, 3, 4 and 5. In one embodiment, HVR-L1 comprises SEQ ID NO 7, 8, or 9. In some embodiments,

these antibodies further comprise a human subgroup III heavy chain framework consensus sequence. In one embodiment of these antibodies, the framework consensus sequence comprises substitution at position 71, 73 and/or 78. In some embodiments of these antibodies, position 71 is A, 73 is T and/or 78 is A. In one embodiment of these antibodies, these antibodies further comprise a human κ light chain framework consensus sequence.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a HVR-L1 comprising SEQ ID NO 1. In one embodiment, the antibody comprises a variant HVR-L1 wherein A4 is Q. In one embodiment, said variant antibody further comprises HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 and HVR-H3, wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs 2, 3, 4, 5, and 6. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-L1 wherein A6 is I. In one embodiment, said variant antibody further comprises HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 and HVR-H3 wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs 2, 3, 4, 5 and 6. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-L1 wherein A7 is S. In one embodiment, said variant antibody further comprises HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 and HVR-H3, wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs 2, 3, 4, 5, and 6. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-L1 wherein A8 is D or N. In one embodiment, said variant antibody further comprises HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 and HVR-H3, wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs 2, 3, 4, 5, and 6. In some embodiments, these antibodies further comprise a human subgroup III heavy chain framework consensus sequence. In one embodiment of these antibodies, the framework consensus sequence comprises substitution at position 71, 73 and/or 78. In some embodiments of these antibodies, position 71 is A, 73 is T and/or 78 is A. In one embodiment of these antibodies, these antibodies further comprise a human κ light chain framework consensus sequence.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a HVR-L2 comprising SEQ ID NO 2. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-L2 wherein B1 is N. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-L2 wherein B5 is S. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-L2 wherein B6 is L. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-L2 wherein B7 is V. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-L2 wherein B7 is E or K. In some embodiments, said variant antibody further comprises HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 and HVR-H3 wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs 1, 3, 4, 5, and 6. In some embodiments, HVR-L1 comprises SEQ ID NO 7, 8, or 9. In some embodiments, these antibodies further comprise a human subgroup III heavy chain framework consensus sequence. In one embodiment of these antibodies, the framework consensus sequence comprises substitution at position 71, 73 and/or 78. In some embodiments of these antibodies, position 71 is A, 73 is T and/or 78 is A. In one embodiment of these antibodies, these antibodies further comprise a human κ light

chain framework consensus sequence

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a HVR-L3 comprising SEQ ID NO 3. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-L3 wherein C3 is W, Y, R, or S. In some embodiments, said variant antibody further comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 and HVR-H3, wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs 1, 2, 4, 5, and 6. In some embodiments, HVR-L1 comprises SEQ ID NO-7, 8, or 9. In some embodiments, these antibodies further comprise a human subgroup III heavy chain framework consensus sequence. In one embodiment of these antibodies, the framework consensus sequence comprises substitution at position 71, 73 and/or 78. In some embodiments of these antibodies, position 71 is A, 73 is T and/or 78 is A. In one embodiment of these antibodies, these antibodies further comprise a human κ light chain framework consensus sequence.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a HVR-H2 comprising SEQ ID NO.5. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H2 wherein E2 is F. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H2 wherein E2 is V or D. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H2 wherein E6 is G. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H2 wherein E10 is Y. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H2 wherein E12 is A, D, or T. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H2 wherein E13 is D, A, or N. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H2 wherein E15 is V. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H2 wherein E17 is G. In some embodiments, said variant antibody further comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 and HVR-H3, wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs 1, 2, 3, 4, and 6. In some embodiments, HVR-L1 comprises SEQ ID NO-7, 8, or 9. In some embodiments, these antibodies further comprise a human subgroup III heavy chain framework consensus sequence. In one embodiment of these antibodies, the framework consensus sequence comprises substitution at position 71, 73 and/or 78. In some embodiments of these antibodies, position 71 is A, 73 is T and/or 78 is A. In one embodiment of these antibodies, these antibodies further comprise a human κ light chain framework consensus sequence.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a HVR-H3 comprising SEQ ID NO-6. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant HVR-H3 wherein F11 is Y. In some embodiments, said variant antibody further comprises HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 and HVR-H3, wherein each comprises, in order, the sequence depicted in SEQ ID NOs 1, 2, 3, 4, and 6. In some embodiments, HVR-L1 comprises SEQ ID NO-7, 8, or 9. In some embodiments, these antibodies further comprise a human subgroup III heavy chain framework consensus sequence. In one embodiment of these antibodies, the framework consensus sequence comprises substitution at position 71, 73 and/or 78. In some embodiments of these antibodies, position 71 is A, 73 is T and/or 78 is A. In one embodiment of these antibodies, these antibodies

further comprise a human κ I light chain framework consensus sequence

In some embodiments, these antibodies further comprise a human subgroup III heavy chain framework consensus sequence. In one embodiment of these antibodies, the framework consensus sequence comprises substitution at position 71, 73 and/or 78. In some embodiments of these antibodies, position 71 is A, 73 is T and/or 78 is A. In one embodiment of these antibodies, these antibodies further comprise a human κ I light chain framework consensus sequence.

A therapeutic agent for use in a host subject preferably elicits little to no immunogenic response against the agent in said subject. In one embodiment, the invention provides such an agent. For example, in one embodiment, the invention provides a humanized antibody that elicits and/or is expected to elicit a human anti-rodent antibody response (such as anti-mouse or anti-rat response) or a human anti-human response at a substantially reduced level compared to an antibody comprising the sequence comprising SEQ ID NOs 10 and/or 11 (Figs 1A and 1B) or SEQ ID NOs 12 and/or 13 (Figs 9A and 9B depicting rat anti-mouse Fib504 amino acid sequences) in a host subject. In another example, the invention provides a humanized antibody that elicits and/or is expected to elicit no human anti-rodent (such as human anti-mouse (HAMA) or human anti-mouse) or human anti-human antibody response (HABA).

A humanized antibody of the invention may comprise one or more human and/or human consensus non-hypervariable region (e.g., framework) sequences in its heavy and/or light chain variable domain. In some embodiments, one or more additional modifications are present within the human and/or human consensus non-hypervariable region sequences. In one embodiment, the heavy chain variable domain of an antibody of the invention comprises a human consensus framework sequence, which in one embodiment is the subgroup III consensus framework sequence. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant subgroup III consensus framework sequence modified at at least one amino acid position. For example, in one embodiment, a variant subgroup III consensus framework sequence may comprise a substitution at one or more of positions 71, 73, 78 and/or 94. In one embodiment, said substitution is R71A, N73T, L78A, and/or R94M, in any combination thereof.

As is known in the art, and as described in greater detail hereinafter, the amino acid position/boundary delineating a hypervariable region of an antibody can vary, depending on the context and the various definitions known in the art (as described below). Some positions within a variable domain may be viewed as hybrid hypervariable positions in that these positions can be deemed to be within a hypervariable region under one set of criteria while being deemed to be outside a hypervariable region under a different set of criteria. One or more of these positions can also be found in extended hypervariable regions (as further defined below). The invention provides antibodies comprising modifications in these hybrid hypervariable positions. In one embodiment, these hybrid hypervariable positions include one or more of positions 26-30, 33-35B, 47-49, 49, 57-65, 93, 94 and 102 in a heavy chain variable domain. In one embodiment, these hybrid

hypervariable positions include one or more of positions 24-29, 35-36, 46-49, 49, 56 and 97 in a light chain variable domain. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant human subgroup consensus framework sequence modified at one or more hybrid hypervariable positions. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain comprising a variant human subgroup III consensus framework sequence modified at one or more of positions 28-35, 49, 50, 52a, 53, 54, 58-61, 63, 65, 94 and 102. In one embodiment, the antibody comprises a, T28F, F29I, S30T, S31N, Y32N, A33Y, M34W and S35G substitution. In one embodiment, the antibody comprises a S49G substitution. In one embodiment, the antibody comprises a V50F or V50D or V50Y substitution. In one embodiment, the antibody comprises a G53Y substitution. In one embodiment, the antibody comprises a G54S substitution. In one embodiment, the antibody comprises a Y58S substitution. In one embodiment, the antibody comprises a A60N or A60D or A60T substitution. In one embodiment, the antibody comprises a D61P or D61A or D61H substitution. In one embodiment, the antibody comprises a V63L substitution. In one embodiment, the antibody comprises a G65S substitution. In one embodiment, the antibody comprises a R94M substitution. In one embodiment, the antibody comprises a R94A or R94E or R94G or R94Q or R94S substitution. In one embodiment, the antibody comprises a G95T substitution. In one embodiment, the antibody comprises one or more of the substitutions at positions 28-35, 49, 50, 52a, 53, 54, 58-61, 63, 65, 94 and 102 and further comprises one or more of the substitutions at positions R71A or N73T or L78A or L78F. In one embodiment, the antibody comprises a Y102F substitution. It can be seen by reference to Fig. 1B that these substitutions are in the HVR-H1, HVR-H2, and/or HVR-H3 of the heavy chain.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a light chain variable domain comprising a variant human subgroup I consensus framework sequence modified at one or more of positions 27, 29-31, 33, 34, 49, 50, 53-55, 91 and 96.. In one embodiment, the antibody comprises a Q27E substitution. In one embodiment, the antibody comprises a I29V substitution. In one embodiment, the antibody comprises a S30D substitution. In one embodiment, the antibody comprises a N31T or N31S or N31D substitution. In one embodiment, the antibody comprises a Y32L. In one embodiment, the antibody comprises a A34H substitution. In one embodiment, the antibody comprises a Y49K substitution. In one embodiment, the antibody comprises a A50Y substitution. In one embodiment, the antibody comprises a S53Q substitution. In one embodiment, the antibody comprises a L54S substitution. In one embodiment, the antibody comprises a E55I or E55V substitution. In one embodiment, the antibody comprises a Y91G substitution. In one embodiment, the antibody comprises a W96N or W96L substitution. In one embodiment, the antibody comprises a A25S substitution. In one embodiment, the antibody comprises a A25 to G, S, T, or V substitution. In one embodiment, the antibody comprises a modification selected from one or more of the following groups of substitutions. For example, in one embodiment, the antibody comprises a S26 to G, I, K, N, P, Q, or T substitution. In one embodiment, the antibody comprises a

Q27 to E, A, D, G, H, I, K, L, N, Q, R, or V substitution. In one embodiment, the antibody
 comprises a S28 to A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, V or Y substitution. In one embodiment, the
 antibody comprises a E29 to V, A, G, K, L, M, Q or R substitution. In one embodiment, the antibody
 comprises a S30 to D, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, T or V substitution. In one embodiment, the
 5 antibody comprises a N31 to D, T, E, or G substitution. In one embodiment, the antibody comprises
 a Y32 to L, I or M substitution. In one embodiment, the antibody comprises a L33 to A, I, M or V
 substitution. In one embodiment, the antibody comprises a A34 to H, F, Y or S substitution. In one
 embodiment, the antibody comprises a Y49 to K or N substitution. In one embodiment, the
 antibody comprises a A50Y substitution. In one embodiment, the antibody comprises S53Q
 10 substitution. In one embodiment, the antibody comprises a L54S substitution. In one embodiment,
 the antibody comprises a E55 to V, I or K substitution. In one embodiment, the antibody comprises
 a Y91G substitution. In one embodiment, the antibody comprises a W96 to N, L, W, Y, R, S, A, F,
 H, I, M, N, R, S, T, V or Y substitution. It can be seen by reference to Fig. 1A that these
 substitutions are in the HVR-L1, HVR-L2, and/or HVR-L3 of the light chain.

15 An antibody of the invention can comprise any suitable human or human consensus light
 chain framework sequences, provided the antibody exhibits the desired biological characteristics
 (e.g. a desired binding affinity). In one embodiment, an antibody of the invention comprises at least
 a portion (or all) of the framework sequence of human κ light chain. In one embodiment, an
 antibody of the invention comprises at least a portion (or all) of human κ subgroup I framework
 20 consensus sequence.

In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy and/or light chain
 variable domain comprising framework sequences depicted SEQ ID NOS.34-41 and in FIGS 1, 7
 and 8, provided positions 49 of the light chain and 94 of the heavy chain are included in the
 extended HVRs, and provided said position 49 is K and said position 94 is preferably but not
 25 necessarily M and may be R.

Antagonists of the invention can be used to modulate one or more aspects of beta7
 associated effects, including but not limited to association with alpha4 integrin subunit, association
 with alphaE integrin subunit, binding of alpha4beta7 integrin to MAdCAM, VCAM-1 or fibronectin
 and binding of alphaEbeta7 integrin to E-cadherin. These effects can be modulated by any
 30 biologically relevant mechanism, including disruption of ligand binding to beta7 subunit or to the
 alpha4beta7 or alphaEbeta7 dimeric integrin, and/or by disrupting association between the alpha and
 beta integrin subunits such that formation of the dimeric integrin is inhibited. Accordingly, in one
 embodiment, the invention provides a beta7 antagonist antibody that inhibits binding of alpha4 to
 beta7. In one embodiment, a beta7 antagonist antibody of the invention disrupts binding of
 35 alpha4beta7 to MAdCAM. In one embodiment, a beta7 antagonist antibody of the invention
 disrupts binding of alpha4beta7 to VCAM-1. In one embodiment, a beta7 antagonist antibody of the
 invention disrupts binding of alpha4beta7 to fibronectin. In one embodiment, a beta7 antagonist

antibody of the invention disrupts binding of beta7 to alphaE. In one embodiment, a beta7 antagonist antibody of the invention disrupts binding alphaEbeta7 integrin to E-cadherin. Interference can be direct or indirect. For example, a beta7 antagonist antibody may bind to beta7 within a sequence of the alpha4beta7 or alphaEbeta7 dimerization region, and thereby inhibit interaction of the integrin subunits and formation of an integrin dimer. In a further example, a beta7 antagonist antibody may bind to a sequence within the ligand binding domain of beta7 subunit and thereby inhibit interaction of said bound domain with its binding partner (such as fibronectin, VCAM, and/or MAdCAM for the alpha4beta7 integrin, or E-cadherin for the alphaEbeta7 integrin). In another example, a beta7 antagonist antibody may bind to a sequence that is not within the integrin subunit dimerization domain or a ligand binding domain, but wherein said beta7 antagonist antibody binding results in disruption of the ability of the beta7 domain to interact with its binding partner (such as an alpha4 or alphaE integrin subunit and/or a ligand such as fibronectin, VCAM, MAdCAM, or E-cadherin). In one embodiment, an antagonist antibody of the invention binds to beta7 (for example, the extracellular domain) such that beta7 dimerization with the alpha4 or alphaE subunit is disrupted. In one embodiment, an antagonist antibody of the invention binds to beta7 such that ability of beta7 and/or an alpha4beta7 and/or an alphaEbeta7 integrin to bind to its respective ligand or ligands is disrupted. For example, in one embodiment, the invention provides an antagonist antibody which upon binding to a beta7 molecule inhibits dimerization of said molecule. In one embodiment, a beta7 antagonist antibody of the invention specifically binds a sequence in the ligand binding domain of beta7. In one embodiment, a beta7 antagonist antibody of the invention specifically binds a sequence in the ligand binding domain of beta7 such that ligand binding (i.e., fibronectin, VCAM, and/or MAdCAM) to the alpha4beta7 integrin is disrupted. In one embodiment, a beta7 antagonist antibody of the invention specifically binds a sequence in the ligand binding domain of beta7 such that ligand binding (i.e., E-cadherin) to the alphaEbeta7 integrin is disrupted.

In one embodiment, an antagonist antibody of the invention disrupts beta7 dimerization comprising heterodimerization (i.e., beta7 dimerization with an alpha4 or alphaE integrin subunit molecule).

In one embodiment, an antagonist antibody of the invention binds to an epitope on the beta7 integrin subunit that maps to amino acids 176-237. In another embodiment, an antagonist antibody of the invention binds to the same epitope on the beta7 integrin that is the substantially the same epitope as Fib504.64 (ATCC HB-293). Determination of epitope binding is by standard techniques including without limitation competition binding analysis.

In one aspect, the invention provides an antibody comprising a combination of one, two, three, four, five or all of the HVR sequences depicted in the table of amino acid substitutions in Fig. 13.

A therapeutic agent for use in a host subject preferably elicits little to no immunogenic

response against the agent in said subject. In one embodiment, the invention provides such an agent. For example, in one embodiment, the invention provides a humanized antibody that elicits and/or is expected to elicit a human anti-rat or human anti-mouse or human anti-human antibody response at a substantially reduced level compared to an antibody comprising the sequence of SEQ ID NOS 10, 11, 12 and/or SEQ ID NO-13 (rat anti-mouse Fib504 (ATCC HB-293), FIGS 1 and 9) in a host subject. In another example, the invention provides a humanized antibody that elicits and/or is expected to elicit no human anti-mouse, human anti-rat, or human anti-human antibody response.

A humanized antibody of the invention may comprise one or more human and/or human consensus non-hypervariable region (e.g., framework) sequences in its heavy and/or light chain variable domain. In some embodiments, one or more additional modifications are present within the human and/or human consensus non-hypervariable region sequences. In one embodiment, the heavy chain variable domain of an antibody of the invention comprises a human consensus framework sequence, which in one embodiment is the subgroup III consensus framework sequence. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a variant subgroup III consensus framework sequence modified at at least one amino acid position. For example, in one embodiment, a variant subgroup III consensus framework sequence may comprise a substitution at one or more of positions 71, 73, 78 and/or 94, although position 94 is part of an extended heavy chain hypervariable region-H3 of the present invention. In one embodiment, said substitution is R71A, N73T, N78A, and/or R94M, in any combination thereof.

An antibody of the invention can comprise any suitable human or human consensus light chain framework sequences, provided the antibody exhibits the desired biological characteristics (e.g., a desired binding affinity). In one embodiment, an antibody of the invention comprises at least a portion (or all) of the framework sequence of human κ light chain. In one embodiment, an antibody of the invention comprises at least a portion (or all) of human κ subgroup I framework consensus sequence.

Antagonists of the invention can be used to modulate one or more aspects of beta7 associated effects. For example, a beta7 antagonist antibody may bind to beta7 within a sequence of the alpha4beta7 or alphaEbeta7 dimerization region, and thereby inhibit interaction of the integrin subunits and formation of an integrin dimer. In a further example, a beta7 antagonist antibody may bind to a sequence within the ligand binding domain of beta7 subunit and thereby inhibit interaction of said bound domain with its binding partner (such as fibronectin, VCAM, and/or MAdCAM for the alpha4beta7 integrin, or E-cadherin for the alphaEbeta7 integrin). In another example, a beta7 antagonist antibody may bind to a sequence that is not within the integrin subunit dimerization domain or a ligand binding domain, but wherein said beta7 antagonist antibody binding results in disruption of the ability of the beta7 domain to interact with its binding partner (such as an alpha4 or alphaE integrin subunit and/or a ligand such as fibronectin, VCAM, MAdCAM, or E-cadherin). In one embodiment, an antagonist antibody of the invention binds to beta7 (for example, the



extracellular domain) such that beta7 dimerization with the alpha4 or alphaE subunit is disrupted. In one embodiment, an antagonist antibody of the invention binds to beta7 such that ability of beta7 and/or an alpha4beta7 and/or an alphaEbeta7 integrin to bind to its respective ligand or ligands is disrupted. For example, in one embodiment, the invention provides an antagonist antibody which upon binding to a beta7 molecule inhibits dimerization of said molecule. In one embodiment, a beta7 antagonist antibody of the invention specifically binds a sequence in the ligand binding domain of beta7. In one embodiment, a beta7 antagonist antibody of the invention specifically binds a sequence in the ligand binding domain of beta7 such that ligand binding (i.e., fibronectin, VCAM, and/or MAdCAM) to the alpha4beta7 integrin is disrupted. In one embodiment, a beta7 antagonist antibody of the invention specifically binds a sequence in the ligand binding domain of beta7 such that ligand binding (i.e., E-cadherin) to the alphaEbeta7 integrin is disrupted.

In one embodiment, an antagonist antibody of the invention disrupts beta7 dimerization comprising heterodimerization (i.e., beta7 dimerization with an alpha4 or alphaE integrin subunit molecule).

In some instances, it may be advantageous to have a beta7 antagonist antibody that does not interfere with binding of a ligand (such as fibronectin, VCAM, MAdCAM, or alphaE) to beta7 subunit as part of an integrin or to an alpha4beta7 integrin or an alphaEbeta7 integrin as a dimer. Accordingly, in one embodiment, the invention provides an antibody that does not bind a fibronectin, VCAM, MAdCAM, or E-cadherin binding site on beta7 but, instead, inhibits interaction between beta7 subunit and an alpha subunit (such as alpha4 or alphaE integrin subunit) such that a biologically active integrin is prevented from forming. In one example, an antagonist antibody of the invention can be used in conjunction with one or more other antagonists, wherein the antagonists are targeted at different processes and/or functions within the beta7 integrin axis. Thus, in one embodiment, a beta7 antagonist antibody of the invention binds to an epitope on beta7 distinct from an epitope bound by another beta7 or an alpha/beta integrin antagonist (such as an alpha4beta7 antibody, including monoclonal antibody or an antibody, such as a humanized antibody or monoclonal antibody derived from and/or having the same or effectively the same binding characteristics or specificity as an antibody derived from a murine antibody).

In one embodiment, the invention provides a beta7 antagonist antibody that disrupts beta7-alpha4 or -alphaE multimerization into the respective integrin as well as ligand binding. For example, an antagonist antibody of the invention that inhibits beta7 dimerization with alpha4 or alphaE integrin subunit may further comprise an ability to compete with ligand for binding to beta7 or the integrin dimer (e.g., it may interfere with the binding of fibronectin, VCAM, and/or MAdCAM to beta7 and/or alpha4beta7, or it may interfere with the binding of E-cadherin to beta7 or alphaEbeta7).

In one embodiment of a beta7 antagonist antibody of the invention, binding of the antagonist to beta7 inhibits ligand binding activated cellular adhesion. In another embodiment of a

beta7 antagonist antibody of the invention, binding of the antagonist to beta7 in a cell inhibits recruitment of the cell to the cells and/or tissue in which the beta7-containing integrin is expressed.

In one embodiment, a beta7 antagonist antibody of the invention specifically binds at least a portion of amino acids 176-250 (optionally amino acids 176-237) of the beta7 extracellular domain (see Tidswell, M. et al (1997) *J Immunol.* 159 1497-1505) or variant thereof, and reduces or blocks binding of ligands MAdCAM, VCAM-1, fibronectin, and/or E-cadherin. In one embodiment, such blocking of ligand binding disrupts, reduces and/or prevents adhesion of a cell expressing the ligand to a cell expressing the beta7-containing ligand. In one embodiment, an antagonist antibody of the invention specifically binds an amino acid sequence of beta7 comprising residues 176-237. In one embodiment, an antagonist antibody of the invention specifically binds a conformational epitope formed by part or all of at least one of the sequences selected from the group consisting of residues 176-237 of beta7. In one embodiment, an antagonist antibody of the invention specifically binds an amino acid sequence having at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 95%, at least 98% at least 99% sequence identity or similarity with the amino acid sequence of residues 176-237 or residues 176-250 of human beta7. In one embodiment, the antagonist anti-beta7 antibody of the invention binds the same epitope as the anti-beta7 antibody Fib504 produced by hybridoma ATCC HB-293.

In one aspect, the invention provides compositions comprising one or more antagonist antibodies of the invention and a carrier. In one embodiment, the carrier is pharmaceutically acceptable.

In one aspect, the invention provides nucleic acids encoding a beta7 antagonist antibody of the invention.

In one aspect, the invention provides vectors comprising a nucleic acid of the invention.

In one aspect, the invention provides host cells comprising a nucleic acid or a vector of the invention. A vector can be of any type, for example a recombinant vector such as an expression vector. Any of a variety of host cells can be used. In one embodiment, a host cell is a prokaryotic cell, for example, *E. coli*. In one embodiment, a host cell is a eukaryotic cell, for example a mammalian cell such as Chinese Hamster Ovary (CHO) cell.

In one aspect, the invention provides methods for making an antagonist of the invention. For example, the invention provides a method of making a beta7 antagonist antibody (which, as defined herein includes full length and fragments thereof), said method comprising expressing in a suitable host cell a recombinant vector of the invention encoding said antibody (or fragment thereof), and recovering said antibody.

In one aspect, the invention provides an article of manufacture comprising a container, and a composition contained within the container, wherein the composition comprises one or more beta7 antagonist antibodies of the invention. In one embodiment, the composition comprises a nucleic acid of the invention. In one embodiment, a composition comprising an antagonist antibody further

comprises a carrier, which in some embodiments is pharmaceutically acceptable. In one embodiment, an article of manufacture of the invention further comprises instructions for administering the composition (for example, the antagonist antibody) to a subject.

In one aspect, the invention provides a kit comprising a first container comprising a composition comprising one or more beta7 antagonist antibodies of the invention, and a second container comprising a buffer. In one embodiment, the buffer is pharmaceutically acceptable. In one embodiment, a composition comprising an antagonist antibody further comprises a carrier, which in some embodiments is pharmaceutically acceptable. In one embodiment, a kit further comprises instructions for administering the composition (for example, the antagonist antibody) to a subject.

Beta7 integrins and their ligands are variously expressed in disease states. [The expression of MAdCAM-1 on gut endothelium is increased in sites of mucosal inflammation in patients with inflammatory bowel disease (UC and CD) and colonic lamina propria of UC and CD patients also show increased CD3+ and alpha4beta7+ cells compared to IBS controls (see Souza H., et al., Gut 45 856 (1999)) MAdCAM-1 expression was observed to be associated with portal tract inflammation in liver diseases and may be important in recruitment of alpha4beta7+ lymphocytes to the liver during inflammation. (Hillan, K., et al, Liver 19(6) 509-18 (1999)) MAdCAM-1 on hepatic vessels supports adhesion of alpha4beta7+ lymphocytes from patients with IBD and primary sclerosing cholangitis. The adhesion was inhibited by anti-MAdCAM-1 anti-alpha4beta7 or anti-alpha4 antibodies. (Grant AJ et al, Hepatology 33(5) 1065-72 (2001)) MAdCAM-1 VCAM-1 and E-cadherin are expressed on brain endothelial cells and/or on microvessels in the inflamed central nervous system. Beta7 integrins contribute to demyelinating disease of the CNS (Kanwar et al., J Neuroimmunology 103, 146 (2000)) Expression of alpha4beta7 was significantly higher in the LPL of CD than in controls and patients with UC (Oshimi, N et al., International Journal of Molecular Medicine 12, 715-719 (2003)) IELs from CD patients may be chronically stimulated and recruited from the periphery (Meresse, B, et al., Human Immunology, 62, 694-700 (2001)) In human liver disease, alpha4beta7 T cells (CD4+ and CD8+) are preferentially accumulated in human livers where E-cadherin is expressed on hepatocytes and bile duct epithelium (Shimizu, Y., et al., Journal of Hepatology 39 918-924 (2003)) In chronic pancreatitis, CD8+CD103+ T cells, analogous to intestinal intraepithelial lymphocytes, infiltrate the pancreas in chronic pancreatitis (Matthias, P, et al, Am J Gastroenterol 93 2141-2147 (1998)) Upregulation of alpha4beta7 is found in systemic lupus erythematosus patients with specific epithelial involvement (Pang et al., Arthritis & Rheumatism 41 1456-1463 (1998)). In Sjogren's Syndrome, CD8+ alpha4beta7+ T cells adhere and kill acinar epithelial cells by inducing apoptosis (Kroneld et al., Scand J Rheumatol 27:215-218, 1998) Integrin alpha4beta7 and alpha4beta7 play a role in T cell epidermotropism during skin inflammation and contribute to skin allograft rejection (Sun et al., Transplantation 74, 1202, 2002) Teraki and Shiohara showed preferential expression of alpha4beta7 integrin on CD8+ T cells in psoriatic

30

epidermis (Teraki and Shiohara, Br J Dermatology 147, 1118, 2002) Sputum T lymphocytes are activated IELs (CD69+ CD103+) in asthma, COPD, and normal subjects (Leckie et. al., Thorax 58, 23 2003) CD103+ (aE β 7+) CTL accumulate with graft epithelium during clinical renal allograft rejection (Hadley et al., Transplantation 72, 1548, 2001)]Thus, in one aspect, the invention provides use of a beta7 antagonist antibody of the invention to inhibit beta7 integrin-ligand interaction to reduce or alleviate disease, such as one or more of the above described disease states In one embodiment, the antibody of the invention is used in the preparation of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of a disease, such as an inflammatory disease including without limitation inflammatory bowel disease (such as Crohn's disease and ulcerative colitis), inflammatory liver disease, inflammation of the CNS, chronic pancreatitis, systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome, psoriasis and skin inflammation, asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), interstitial lung disease, allergy autoimmune disease, transplantation rejection, renal graft rejection graft versus host disease, diabetes, and cancer

In one aspect, the invention provides use of a nucleic acid of the invention in the preparation of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of a disease, such as an immune (such as autoimmune or inflammatory) disorder including without limitation, inflammatory bowel disease (such as Crohn's disease or ulcerative colitis) and allergic reaction (such as disorders of the respiratory system, skin, joints, allergic asthma and other organs affected by allergic reaction mediated by a beta7-containing integrin)

In one aspect, the invention provides use of an expression vector of the invention in the preparation of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of a disease, such as an immune (such as autoimmune or inflammatory) disorder including without limitation, inflammatory bowel disease (such as Crohn's disease or ulcerative colitis) and allergic reaction (such as disorders of the respiratory system, skin, joints, and other organs affected by allergic reaction mediated by a beta7-containing integrin)

In one aspect, the invention provides use of a host cell of the invention in the preparation of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of a disease, such as an immune (such as autoimmune or inflammatory) disorder including without limitation, inflammatory bowel disease (such as Crohn's disease or ulcerative colitis) and allergic reaction (such as disorders of the respiratory system, skin, joints, and other organs affected by allergic reaction mediated by a beta7-containing integrin)

In one aspect, the invention provides use of an article of manufacture of the invention in the preparation of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of a disease, such as an immune (such as autoimmune or inflammatory) disorder including without limitation, inflammatory bowel disease (such as Crohn's disease or ulcerative colitis) and allergic reaction (such as disorders of the respiratory system, skin, joints and other organs affected by allergic reaction mediated by a beta7-containing integrin)

31

In one aspect, the invention provides use of a kit of the invention in the preparation of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of a disease, such as an immune (such as autoimmune or inflammatory) disorder including without limitation, inflammatory bowel disease (such as Crohn's disease or ulcerative colitis) and allergic reaction (such as disorders of the respiratory system, skin, joints, and other organs affected by allergic reaction mediated by a beta7-containing integrin)

The invention provides methods and compositions useful for modulating disease states associated with dysregulation of the beta7 integrin mediated cell-cell interaction process. The beta7 integrins are involved in multiple biological and physiological functions, including, for example, inflammatory disorders and allergic reactions. Thus, in one aspect, the invention provides a method comprising administering to a subject an antibody of the invention

In one aspect, the invention provides a method of inhibiting beta7 integrin mediated inflammation, said method comprising contacting a cell or tissue with an effective amount of an antibody of the invention, whereby lymphocyte or B-cell interaction and binding to a beta7 integrin-expressing cell is inhibited.

In one aspect, the invention provides a method of treating a pathological condition associated with dysregulation of beta7 integrin binding in a subject, said method comprising administering to the subject an effective amount of an antibody of the invention, whereby said condition is treated

In one aspect, the invention provides a method of inhibiting the binding of a lymphocyte expressing a beta7 integrin ligand (such as a cell expressing MAdCAM, VCAM, E-cadherin or fibronectin) to a cell that expresses beta7 integrin (such as alpha4beta7 or alphaEbeta7 integrins), said method comprising contacting said cell with an antibody of the invention thereby inhibiting or preventing adhesion of the cells and causing a reduction of inflammatory reaction

In one aspect, the invention provides a method for treating or preventing an inflammatory disorder associated with increased expression or activity of beta7 integrin or increased interaction between a beta7 integrin on one cell and a beta7 integrin receptor on another cell, said method comprising administering to a subject in need of such treatment an effective amount of an antibody of the invention, thereby effectively treating or preventing said inflammatory disorder. In one embodiment, said inflammatory disorder is inflammatory bowel disease (IBD). In another embodiment, said inflammatory disorder is an allergic reaction.

Methods of the invention can be used to affect any suitable pathological state, for example, cells and/or tissues associated with dysregulation of the beta7 integrin binding pathway. Beta7 integrins are expressed primarily on leukocytes (Tidswell, M. et al. (1997) supra). In one embodiment, a leukocyte is targeted in a method of the invention and is prevented from binding to a cell expressing a ligand of the beta7 integrin. For example, an intra-epithelial lymphocyte expressing E-cadherin is prevented, according to the invention, from binding to an alphaEbeta7-

expressing cell by an antagonist anti-beta7 antibody. Cells expressing MAdCAM, VCAM-1 or fibronectin are prevented by an antagonist anti-beta7 antibody of the invention from binding to a leukocyte expressing alpha4beta7.

Methods of the invention can further comprise additional treatment steps. For example, in one embodiment, a method further comprises a step wherein a targeted cell and/or tissue (for example, an endothelial cell of the intestinal lining) is exposed to an anti-TNF antibody or a small molecule therapeutic agent including without limitation 5-ASA compounds (including without limitation

As described herein, beta7 integrins mediate important biological processes the dysregulation of which leads to numerous pathological conditions. Accordingly, in one embodiment of methods of the invention, a cell that is targeted (for example, an endothelial cell) is one in which adhesion of a cell expressing a beta7 integrin ligand of a beta7 integrin (where the cell may be, without limitation, a lymphocyte, and the ligand may be MAdCAM, VCAM or E-cadherin) is disrupted, inhibited, or prevented as compared to the cells in the absence of the anti beta7 antagonist antibody of the invention. In one embodiment, a method of the invention inhibits lymphocyte homing, thereby inhibiting inflammation at the site of beta7 integrin expression. For example, contact with an antagonist of the invention may result in a cell's inability to adhere to a cell expressing a ligand of a beta7 integrin.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIGS. 1A and 1B depict alignment of sequences of the variable light and heavy chains for the following: light chain human subgroup kappa I consensus sequence (Fig. 1A, SEQ ID NO 23) heavy chain human subgroup III consensus sequence (Fig. 1B, SEQ ID NO 24), rat anti-mouse beta7 antibody (Fib504) variable light chain (Fig. 1A, SEQ ID NO 10), rat anti-mouse beta7 antibody (Fib504) variable heavy chain (Fig. 1B, SEQ ID NO 11), and humanized antibody variants. Humanized hu504K graft variable light chain (Fig. 1A, SEQ ID NO 25), humanized hu504K graft variable heavy chain (Fig. 1B, SEQ ID NO 26), variant hu504.5 (amino acid variations from humanized hu504K graft are indicated in Fig. 1A (light chain) and Fig. 1B (heavy chain) for variants hu504.5, hu504.16, and hu504.32. Additional amino acid substitutions in the HVR-H1 and HVR-H2 of the hu504K graft which resulted in beta7 binding antibodies are indicated in Fig. 1C.

FIGS. 2A and 2B depict the full length sequence of the human consensus subgroup III sequence light chain (Fig. 2A, SEQ ID NO 27) and heavy chain (Fig. 2B, SEQ ID NO 28). HVRs are underlined.

FIGS. 3A and 3B depict the full length sequence of the humanized504 graft containing rat Fib504 hypervariable regions (as described herein) grafted into the human kappa I consensus sequence light chain (Fig. 3A, SEQ ID NO 29) and into the human subgroup III consensus sequence

heavy chain (Fig. 3B, SEQ ID NO:30). HVRs are underlined.

FIGS 4A and 4B depict the full length sequence of the humanized 504Kgraft in which position 49 of the light chain of the hu504 graft is a Y49K substitution. The hu504Kgraft light chain is depicted by SEQ ID NO 31 and the hu504Kgraft heavy chain is depicted by SEQ ID NO 30. HVRs are underlined.

FIGS 5A and 5B depict the full length sequence of the hu504K-RF graft in which positions 71 and 78 of the heavy chain of the hu504 graft are an A71R substitution and a A78P substitution from the hu504Kgraft sequence. The hu504K-RF graft light chain is depicted by SEQ ID NO 31 and the hu504K-RF graft heavy chain is depicted by SEQ ID NO 32. HVRs are underlined.

FIGS 6A and 6B depict the full length sequence of the hu504 32 variant comprising the heavy chain of the hu504K-RF graft (SEQ ID NO 32) and T31D and Y32L substitutions in the light chain of the hu504Kgraft (SEQ ID NO 33). HVRs are underlined.

FIG 7A- FIG 7B and FIG 8A -FIG 8B depict exemplary acceptor human consensus framework sequences for use in practicing the instant invention with sequence identifiers as follows

Variable light (VL) consensus frameworks (FIG. 7A,B)

human VL kappa subgroup I consensus framework (SEQ ID NO 14)
human VL kappa subgroup I consensus framework minus extended HVR-L2 (SEQ ID NO 15)
human VL kappa subgroup II consensus framework (SEQ ID NO-16)
human VL kappa subgroup III consensus framework (SEQ ID NO 17)
human VL kappa subgroup IV consensus framework (SEQ ID NO 18)
Shaded regions represent light chain HVRs (indicated as L1, L2, and L3)

Variable heavy (VH) consensus frameworks (FIG. 8A, B)

human VH subgroup I consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO 19)
human VH subgroup I consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs 20-22)
human VH subgroup II consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:48)
human VH subgroup II consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs 49-51)
human VH subgroup III consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:52)
human VH subgroup III consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs 53-55)
human VH acceptor framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:56)
human VH acceptor framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs 57-58)
human VH acceptor 2 framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO 59)
human VH acceptor 2 framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs 60-62)

FIGS 9A and 9B depict an amino acid sequence of the variable chains of rat anti-mouse integrin beta7 Fib504 antibody produced by the hybridoma ATCC HB-293. HVRs are underlined. Variable light chain is depicted in Fig. 9A (SEQ ID NO 12) and variable heavy chain is depicted in Fig. 9B (SEQ ID NO 13).

FIG 10A depicts amino acid positions in the heavy chain of various consensus sequences (hu subgroups I-III). The consensus sequence used for development of the Herceptin® anti-HER2 antibody, rat Fib504, and hu504-RL and hu504-RF frameworks are described in the Examples herein. Fig. 10B is a bar graph showing the relative binding of alpha4beta7 to hu504graft antibody and hu504Kgraft antibody as a function of "RL" or "RF" framework modifications as described in Example 1.

FIG 11A-11C. FIG 11A tabulates the HVR changes resulting from affinity-maturation performed by offering a limited range of amino acid substitutions in the hu504.16 variant. The results are from libraries with individually modified HVRs in the hu504.16 variant as described in Example 2 herein. Amino acid abbreviations in boxes are amino acids found more frequently in the beta7-binding antibodies (phage-selected antibodies). FIGS 11B and 11C are bar graphs of the results in Fig. 11A indicating the number and type of amino acid substitutions in the hu504.16 variant (light chain, Fig. 11B, heavy chain, Fig. 11C) detectable by the mutagenesis and selection methods of Example 2.

FIG 12 tabulates the results of affinity maturation performed by offering a broad range of possible amino acid substitutions in the HVRs of hu504.32 variant as described in Example 2. The shaded boxes indicate the amino acid that was detected most frequently in antibodies detected as beta7-binding antibodies by the mutagenesis and selection methods of Example 2.

FIG 13 depicts HVR sequences of rat anti-mouse Fib504 (ATCC-293), and the human consensus (left column). Examples of amino acid substitutions observed for each HVR position (not meant to be limiting) by the assays described in the Examples (amino acid substitutions observed by soft amino acid randomization, broad amino acid substitution scan, and limited amino acid substitution scan) are shown to the right, (a useful method of modifying HVRs for humanization, applicable to variants of the present invention, is found in US Application Serial No. 60/545,840, filed February 19, 2004).

FIG 14 is an exemplary graphical representation of Fib504 and variant antibody binding to MAdCAM as a function of antibody concentration as described in Example 3. IC₅₀ and IC₉₀ values for the antibodies were determined.

FIG 15 depicts the light and heavy chain HVR amino acid sequences for the 504.32R anti-beta7 antibody with respect to position according to the Kabat numbering system and a relative numbering system (A-F) for the six HVRs of the antibody. Amino acids at positions 71, 73, and 78 of the heavy chain FR3 region are also depicted. Useful amino acid substitutions are also listed for many of the positions in the HVRs or the heavy chain FR3 region.

FIG 16 shows bar graphs of the relative ability of the 504.32M and 504.32R antibodies to block homing of radiolabelled T cells to the colon of mice experiencing inflammatory bowel disease.

MODES FOR CARRYING OUT THE INVENTION

The invention provides methods, compositions, kits and articles of manufacture for identifying and/or using inhibitors of the beta7 signaling pathway

Details of these methods, compositions, kits and articles of manufacture are provided herein.

General Techniques

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of molecular biology (including recombinant techniques), microbiology, cell biology, biochemistry, and immunology, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature, such as, "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)

Definitions

By "beta7 subunit" or "β7 subunit" is meant the human β7 integrin subunit (Eris *et al.*, (1991) *J Biol Chem.* 266 11009-11016) The beta7 subunit associates with alpha4 integrin subunit, such as the human α4 subunit (Kilger and Holzmann (1995) *J Mol Biol.* 73:347-354) The alpha4beta7 integrin is expressed on a majority of mature lymphocytes, as well as a small population of thymocytes, bone marrow cells and mast cells. (Kilahaw and Murant (1991) *Eur J Immunol* 21 2591-2597, Gurah *et al.*, (1992) 149 1964-1972, and Shaw, S.K. and Brenner, M.B (1995) *Semin Immunol.* 7 335) The beta7 subunit also associates with the alphaE subunit, such as the human alphaE integrin subunit (Ceppek, K.L., et al. (1993) *J Immunol.* 150:3459) The alphaEbeta7 integrin is expressed on intra-intestinal epithelial lymphocytes (IELs) (Ceppek, K.L. (1993) *supra*) The beta7 subunit that binds to the humanized anti-beta7 antibody of the invention may be naturally occurring and may be soluble or localized to the surface of a cell.

By "alphaE subunit" or "alphaE integrin subunit" or "αE subunit" or "αE integrin subunit" or "CD103" is meant an integrin subunit found to be associated with beta7 integrin on intra-epithelial lymphocytes, which alphaEbeta7 integrin mediates binding of the IELs to intestinal epithelium expressing E-cadherin (Ceppek, K.L. et al. (1993) *J Immunol.* 150:3459, Shaw, S.K. and Brenner, M.B (1995) *Semin. Immunol.* 7 335)

"MAdCAM" or "MAdCAM-1" are used interchangeably in the context of the present invention and refer to the protein mucosal addressin cell adhesion molecule-1 which is a single chain polypeptide comprising a short cytoplasmic tail, a transmembrane region and an extracellular sequence composed of three immunoglobulin-like domains. The cDNAs for murine, human and macaque MAdCAM-1 have been cloned (Briskin, *et al.*, (1993) *Nature*, 363:461-464, Shyjan *et al.*, (1996) *J Immunol* 156:2851-2857)

36

"VCAM-1" or "vascular cell adhesion molecule-1" "CD106" refers to a ligand of alpha4beta7 and alpha4beta1, expressed on activated endothelium and important in endothelial-leukocyte interactions such as binding and transmigration of leukocytes during inflammation.

5 "E-cadherin" refers to a member of the family of cadherins, where E-cadherin is expressed on epithelial cells. E-cadherin is a ligand of the alpha5beta7 integrin and mediates binding of iHL-expressed alpha5beta7 to intestinal epithelium, although its function in lymphocyte homing is unclear (E-cadherin expression is upregulated by TGF-beta1

10 "Fibronectin" refers to Fibronectin is involved in tissue repair, embryogenesis, blood clotting, and cell migration/adhesion. It serves as a linker in the ECM (extracellular matrix), and as dimer found in the plasma (plasma fibronectin). The plasma form is synthesized by hepatocytes, while the ECM form is made by fibroblasts, chondrocytes, endothelial cells, macrophages, as well as certain epithelial cells. In this context, it interacts with the alpha4beta7 integrin to mediate aspects of lymphocyte homing or adhesion. The ECM form of fibronectin serves as a general cell adhesion molecule by anchoring cells to collagen or proteoglycan substrates. Fibronectin also can serve to
15 organize cellular interaction with the ECM by binding to different components of the extracellular matrix and to membrane-bound fibronectin receptors on cell surfaces. Finally, fibronectin is important in cell migration events during embryogenesis.

19 "Gastrointestinal inflammatory disorders" are a group of chronic disorders that cause inflammation and/or ulceration in the mucous membrane. These disorders include, for example,
20 inflammatory bowel disease (e.g., Crohn's disease, ulcerative colitis, indeterminate colitis and infectious colitis), mucositis (e.g., oral mucositis, gastrointestinal mucositis, nasal mucositis and proctitis), necrotizing enterocolitis and esophagitis.

25 "Inflammatory Bowel Disease" or "IBD" is used interchangeably herein to refer to diseases of the bowel that cause inflammation and/or ulceration and includes without limitation Crohn's disease and ulcerative colitis.

30 "Crohn's disease (CD)" or "ulcerative colitis (UC)" are chronic inflammatory bowel diseases of unknown etiology. Crohn's disease, unlike ulcerative colitis, can affect any part of the bowel. The most prominent feature Crohn's disease is the granular, reddish-purple edematous thickening of the bowel wall. With the development of inflammation, these granulomas often lose their circumscribed borders and integrate with the surrounding tissue. Diarrhea and obstruction of the bowel are the predominant clinical features. As with ulcerative colitis, the course of Crohn's disease may be continuous or relapsing, mild or severe, but unlike ulcerative colitis, Crohn's disease is not curable by resection of the involved segment of bowel. Most patients with Crohn's disease require surgery at some point, but subsequent relapse is common and continuous medical treatment
35 is usual.

Crohn's disease may involve any part of the alimentary tract from the mouth to the anus, although typically it appears in the ileocolic, small-intestinal or colonic-ano-rectal regions.

37

Histopathologically the disease manifests by discontinuous granulomatous, crypt abscesses, fissures and aphthous ulcers. The inflammatory infiltrate is mixed, consisting of lymphocytes (both T and B cells), plasma cells, macrophages, and neutrophils. There is a disproportionate increase in IgM- and IgG-secreting plasma cells, macrophages and neutrophils.

5 Anti-inflammatory drugs sulfasalazine and 5-aminosalicylic acid (5-ASA) are useful for treating mildly active colonic Crohn's disease and is commonly prescribed to maintain remission of the disease. Metronidazole and ciprofloxacin are similar in efficacy to sulfasalazine and appear to be particularly useful for treating perianal disease. In more severe cases, corticosteroids are effective in treating active exacerbations and can even maintain remission. Azathioprine and 6-mercaptopurine

10 have also shown success in patients who require chronic administration of corticosteroids. It is also possible that these drugs may play a role in the long-term prophylaxis. Unfortunately, there can be a very long delay (up to six months) before onset of action in some patients.

Antidiarrheal drugs can also provide symptomatic relief in some patients. Nutritional therapy or elemental diet can improve the nutritional status of patients and induce symptomatic improvement of acute disease, but it does not induce sustained clinical remissions. Antibiotics are used in treating secondary small bowel bacterial overgrowth and in treatment of pyogenic complications.

15

"Ulcerative colitis (UC)" afflicts the large intestine. The course of the disease may be continuous or relapsing, mild or severe. The earliest lesion is an inflammatory infiltration with abscess formation at the base of the crypts of Lieberkühn. Coalescence of these distended and ruptured crypts tends to separate the overlying mucosa from its blood supply, leading to ulceration. Symptoms of the disease include cramping, lower abdominal pain, rectal bleeding, and frequent, loose discharges consisting mainly of blood, pus and mucus with scanty fecal particles. A total colectomy may be required for acute, severe or chronic, unremitting ulcerative colitis.

20

The clinical features of UC are highly variable, and the onset may be insidious or abrupt, and may include diarrhea, tenesmus and relapsing rectal bleeding. With fulminant involvement of the entire colon, toxic megacolon, a life-threatening emergency, may occur. Extraintestinal manifestations include arthritis, pyoderma gangrenosum, uveitis, and erythema nodosum.

25

Treatment for UC includes sulfasalazine and related salicylate-containing drugs for mild cases and corticosteroid drugs in severe cases. Topical administration of either salicylates or corticosteroids is sometimes effective, particularly when the disease is limited to the distal bowel, and is associated with decreased side effects compared with systemic use. Supportive measures such as administration of iron and antidiarrheal agents are sometimes indicated. Azathioprine, 6-mercaptopurine and methotrexate are sometimes also prescribed for use in refractory corticosteroid-dependent cases.

30

35

A "modification" of an amino acid residue/position, as used herein, refers to a change of a primary amino acid sequence as compared to a starting amino acid sequence, wherein the change

2/ 38

results from a sequence alteration involving said amino acid residue/positions. For example, typical modifications include substitution of the residue (or at said position) with another amino acid (e.g., a conservative or non-conservative substitution), insertion of one or more (generally fewer than 5 or 3) amino acids adjacent to said residue/position, and deletion of said residue/position. An "amino acid substitution," or variation thereof, refers to the replacement of an existing amino acid residue in a predetermined (starting) amino acid sequence with a different amino acid residue. Generally and preferably, the modification results in alteration in at least one physicochemical activity of the variant polypeptide compared to a polypeptide comprising the starting (or "wild type") amino acid sequence. For example, in the case of an antibody, a physicochemical activity that is altered can be binding affinity, binding capability and/or binding effect upon a target molecule.

The term "amino acid" within the scope of the present invention is used in its broadest sense and is meant to include the naturally occurring L α -amino acids or residues. The commonly used one- and three-letter abbreviations for naturally occurring amino acids are used herein (Lehninger, A. L., *Biochemistry*, 2d ed., pp. 71-92, (Worth Publishers, New York, New York, 1975). The term includes D-amino acids as well as chemically modified amino acids such as amino acid analogs, naturally occurring amino acids that are not usually incorporated into proteins such as norleucine, and chemically synthesized compounds having properties known in the art to be characteristic of an amino acid. For example, analogs or mimetics of phenylalanine or proline, which allow the same conformational restriction of the peptide compounds as natural Phe or Pro are included within the definition of amino acid. Such analogs and mimetics are referred to herein as "functional equivalents" of an amino acid. Other examples of amino acids are listed by Roberts and Vellacio, *The Peptide Analysis, Synthesis, Biology*, Gross and Melchior, Eds., Vol. 5, p. 341 (Academic Press, Inc., New York, New York, 1983), which is incorporated herein by reference. Where a single letter is used to designate one of the naturally occurring amino acid, the designations are as commonly found in the relevant literature (see, for example, Alberts, B. et al. *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed., Garland Publishing, Inc. 1994, page 57).

An "isolated" antibody is one which has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials which would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequencer, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody *in situ* within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one

purification step

The term "variable domain residue numbering as in Kabat" or "amino acid position numbering as in Kabat", and variations thereof, refers to the numbering system used for heavy chain variable domains or light chain variable domains of the compilation of antibodies in Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Using this numbering system, the actual linear amino acid sequence may contain fewer or additional amino acids corresponding to a shortening of, or insertion into, a FR or CDR of the variable domain. For example, a heavy chain variable domain may include a single amino acid insert (residue 52a according to Kabat) after residue 52 of H2 and inserted residues (e.g. residues 82a, 82b, and 82c, etc according to Kabat) after heavy chain FR residue 82. The Kabat numbering of residues may be determined for a given antibody by alignment at regions of homology of the sequence of the antibody with a "standard" Kabat numbered sequence.

The phrase "substantially similar" or "substantially the same", as used herein, denotes a sufficiently high degree of similarity between two numeric values (generally one associated with an antibody of the invention and the other associated with a reference/comparator antibody) such that one of skill in the art would consider the difference between the two values to be of little or no biological and/or statistical significance within the context of the biological characteristic measured by said values (e.g., Kd values). The difference between said two values is preferably less than about 50%, preferably less than about 40%, preferably less than about 30%, preferably less than about 20% preferably less than about 10% as a function of the value for the reference/comparator antibody.

"Binding affinity" generally refers to the strength of the sum total of noncovalent interactions between a single binding site of a molecule (e.g., an antibody) and its binding partner (e.g., an antigen). Unless indicated otherwise, as used herein, "binding affinity" refers to intrinsic binding affinity which reflects a 1:1 interaction between members of a binding pair (e.g., antibody and antigen). The affinity of a molecule X for its partner Y can generally be represented by the dissociation constant (Kd). Affinity can be measured by common methods known in the art, including those described herein. Low-affinity antibodies generally bind antigen slowly and tend to dissociate readily, whereas high-affinity antibodies generally bind antigen faster and tend to remain bound longer. A variety of methods of measuring binding affinity are known in the art, any of which can be used for purposes of the present invention. Specific illustrative embodiments are described in the following.

In one embodiment, the "Kd" or "Kd value" according to this invention is measured by a radiolabeled antigen binding assay (RIA) performed with the Fab version of an antibody of interest and its antigen as described by the following assay that measures solution binding affinity of Fabs for antigen by equilibrating Fab with a minimal concentration of (¹²⁵I)-labeled antigen in the presence of a titration series of unlabeled antigen, then capturing bound antigen with an anti-Fab

40

antibody-coated plate (Chen, et al, (1999) *J Mol Biol* 293 865-881) To establish conditions for the assay, microtiter plates (Dynax) are coated overnight with 5 ug/ml of a capturing anti-Fab antibody (Cappel Labs) in 50 mM sodium carbonate (pH 9.6), and subsequently blocked with 2% (w/v) bovine serum albumin in PBS for two to five hours at room temperature (approximately 23°C). In a non-adsorbant plate (Nunc #269620), 100 pM or 26 pM [¹²⁵I]-antigen are mixed with serial dilutions of a Fab of interest (e.g. consistent with assessment of an anti-VEGF antibody, Fab-12, in Presta et al (1997) *Cancer Res* 57 4593-4599). The Fab of interest is then incubated overnight, however, the incubation may continue for a longer period (e.g., 65 hours) to insure that equilibrium is reached. Thereafter, the mixtures are transferred to the capture plate for incubation at room temperature (e.g., for one hour). The solution is then removed and the plate washed eight times with 0.1% Tween 20 in PBS. When the plates have dried, 150 ul/well of scintillant (MicroScint-20 Packard) is added, and the plates are counted on a Topcount gamma counter (Packard) for ten minutes. Concentrations of each Fab that give less than or equal to 20% of maximal binding are chosen for use in competitive binding assays. According to another embodiment the K_d or K_d value is measured by using surface plasmon resonance assays using a BIAcore™-2000 or a BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) at 25°C with immobilized antigen CM5 chips at ~10 response units (RU). Briefly, carboxymethylated dextran biosensor chips (CM5, BIAcore Inc.) are activated with *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) according to the supplier's instructions. Antigen is diluted with 10mM sodium acetate, pH 4.8, into 5ug/ml (~0.2uM) before injection at a flow rate of 5ul/minute to achieve approximately 10 response units (RU) of coupled protein. Following the injection of antigen, 1M ethanolamine is injected to block unreacted groups. For kinetics measurements, two-fold serial dilutions of Fab (0.78 nM to 500 nM) are injected in PBS with 0.05% Tween 20 (PBST) at 25°C at a flow rate of approximately 25ul/min. Association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) are calculated using a simple one-to-one Langmuir binding model (BIAcore Evaluation Software version 3.2) by simultaneous fitting the association and dissociation sensorgram. The equilibrium dissociation constant (K_d) is calculated as the ratio k_{off}/k_{on}. See, e.g., Chen, Y., et al., (1999) *J Mol Biol* 293 865-881. If the on-rate exceeds 10⁶ M⁻¹ S⁻¹ by the surface plasmon resonance assay above, then the on-rate can be determined by using a fluorescent quenching technique that measures the increase or decrease in fluorescence emission intensity (excitation = 295 nm, emission = 340 nm, 16 nm band-pass) at 25°C of a 20nM anti-antigen antibody (Fab form) in PBS, pH 7.2, in the presence of increasing concentrations of antigen as measured in a spectrometer, such as a stop-flow equipped spectrophotometer (Aviv Instruments) or a 8000-series SLM-Aminco spectrophotometer (ThermoSpectromics) with a stir red cuvette.

An "on-rate" or "rate of association" or "association rate" or "k_{on}" according to this

invention can also be determined with the same surface plasmon resonance technique described above using a BIAcoreTM-2000 or a BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) at 25°C with immobilized antigen CM5 chips at ~10 response units (RU). Briefly, carboxymethylated dextran biosensor chips (CM5, BIAcore Inc.) are activated with *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) according to the supplier's instructions. Antigen is diluted with 10mM sodium acetate, pH 4.8, into 5ng/ml (~0.2nM) before injection at a flow rate of 5ul/minute to achieve approximately 10 response units (RU) of coupled protein. Following the injection of 1M ethanolamine to block unreacted groups. For kinetics measurements, two-fold serial dilutions of Fab (0.78 nM to 500 nM) are injected in PBS with 0.05% Tween 20 (PBST) at 25°C at a flow rate of approximately 25ul/min. Association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) are calculated using a simple one-to-one Langmuir binding model (BIAcore Evaluation Software version 3.2) by simultaneous fitting the association and dissociation sensorgram. The equilibrium dissociation constant (K_d) was calculated as the ratio k_{off}/k_{on} . See, e.g., Chen, Y. et al., (1999) *J Mol Biol* 293:865-881. However, if the on-rate exceeds $10^6 M^{-1} S^{-1}$ by the surface plasmon resonance assay above, then the on-rate is preferably determined by using a fluorescent quenching technique that measures the increase or decrease in fluorescence emission intensity (excitation = 295 nm, emission = 340 nm, 16 nm band-pass) at 25°C of a 20nM anti-antigen antibody (Fab form) in PBS, pH 7.2, in the presence of increasing concentrations of antigen as measured in a spectrometer, such as a stop-flow equipped spectrophotometer (Aviv Instruments) or a 8000-series SLM-Aminco spectrophotometer (ThermoSpectronic) with a stirred cuvette. The "Kd" or "Kd value" according to this invention is in one embodiment measured by a radiolabeled antigen binding assay (RIA) performed with the Fab version of the antibody and antigen molecule as described by the following assay that measures solution binding affinity of Fabs for antigen by equilibrating Fab with a minimal concentration of (¹²⁵I)-labeled antigen in the presence of a titration series of unlabeled antigen, then capturing bound antigen with an anti-Fab antibody-coated plate (Chen et al., (1999) *J Mol Biol* 293:865-881). To establish conditions for the assay, microtiter plates (Dynex) are coated overnight with 5 ng/ml of a capturing anti-Fab antibody (Cappel Labs) in 50 mM sodium carbonate (pH 9.6), and subsequently blocked with 2% (w/v) bovine serum albumin in PBS for two to five hours at room temperature (approximately 23°C). In a non-adsorbant plate (Nunc #269620), 100 pM or 26 pM [¹²⁵I]-antigen are mixed with serial dilutions of a Fab of interest (consistent with assessment of an anti-VEGF antibody, Fab-12, in Presta et al., (1997) *Cancer Res* 57:4593-4599). The Fab of interest is then incubated overnight; however, the incubation may continue for a longer period (e.g., 65 hours) to insure that equilibrium is reached. Thereafter, the mixtures are transferred to the capture plate for incubation at room temperature for one hour. The solution is then removed and the plate washed eight times with 0.1% Tween-20 in PBS. When the plates have dried, 150 ul/well of scintillant (MicroScint-20; Packard) is added, and

42

the plates are counted on a Topcount gamma counter (Packard) for ten minutes. Concentrations of each Fab that give less than or equal to 20% of maximal binding are chosen for use in competitive binding assays. According to another embodiment, the K_d or K_d value is measured by using surface plasmon resonance assays using a BIAcoreTM-2000 or a BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) at 25°C with immobilized antigen CM5 chips at ~10 response units (RU). Briefly, carboxymethylated dextran biosensor chips (CM5, BIAcore Inc.) are activated with *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) according to the supplier's instructions. Antigen is diluted with 10mM sodium acetate, pH 4.8, into 5µg/ml (~0.2µM) before injection at a flow rate of 5µl/minute to achieve approximately 10 response units (RU) of coupled protein. Following the injection of antigen, 1M ethanolamine is injected to block unreacted groups. For kinetics measurements, two-fold serial dilutions of Fab (0.78 nM to 500 nM) are injected in PBS with 0.05% Tween 20 (PBST) at 25°C at a flow rate of approximately 25µl/min. Association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) are calculated using a simple one-to-one Langmuir binding model (BIAcore Evaluation Software version 3.2) by simultaneous fitting the association and dissociation sensorgram. The equilibrium dissociation constant (K_d) is calculated as the ratio k_{off}/k_{on} . See, e.g., Chen, Y., et al., (1999) *J Mol Biol* 293 865-881. If the on-rate exceeds $10^6 M^{-1} S^{-1}$ by the surface plasmon resonance assay above, then the on-rate can be determined by using a fluorescent quenching technique that measures the increase or decrease in fluorescence emission intensity (excitation = 295 nm, emission = 340 nm, 16 nm band-pass) at 25°C of a 20nM anti-antigen antibody (Fab form) in PBS, pH 7.2, in the presence of increasing concentrations of antigen as measured in a spectrometer, such as a stop-flow equipped spectrophotometer (Aviv Instruments) or a 8000-series SLM-Aminco spectrophotometer (ThermoSpectronic) with a stir red cuvette.

In one embodiment, an "on-rate" or "rate of association" or "association rate" or " k_{on} " according to this invention is determined with the same surface plasmon resonance technique described above using a BIAcoreTM-2000 or a BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc. Piscataway, NJ) at 25°C with immobilized antigen CM5 chips at ~10 response units (RU). Briefly, carboxymethylated dextran biosensor chips (CM5, BIAcore Inc.) are activated with *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) according to the supplier's instructions. Antigen is diluted with 10mM sodium acetate, pH 4.8, into 5µg/ml (~0.2µM) before injection at a flow rate of 5µl/minute to achieve approximately 10 response units (RU) of coupled protein. Following the injection of 1M ethanolamine to block unreacted groups. For kinetics measurements, two-fold serial dilutions of Fab (0.78 nM to 500 nM) are injected in PBS with 0.05% Tween 20 (PBST) at 25°C at a flow rate of approximately 25µl/min. Association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) are calculated using a simple one-to-one Langmuir binding model (BIAcore Evaluation Software version 3.2) by simultaneous fitting the

43

association and dissociation sensorgram. The equilibrium dissociation constant (K_d) was calculated as the ratio k_{off}/k_{on} . See, e.g., Chen, Y, et al, (1999) *J Mol Biol* 293 865-881. However, if the on-rate exceeds $10^6 M^{-1} S^{-1}$ by the surface plasmon resonance assay above, then the on-rate is preferably determined by using a fluorescent quenching technique that measures the increase or decrease in fluorescence emission intensity (excitation = 295 nm, emission = 340 nm, 16 nm band-pass) at 25°C of a 20nM anti-antigen antibody (Fab form) in PBS, pH 7.2, in the presence of increasing concentrations of antigen as measured in a spectrometer, such as a stop-flow equipped spectrophotometer (Aviv Instruments) or a 8000-series SLM-Aminco spectrophotometer (ThermoSpectronic) with a stirred cuvette.

The phrase "substantially reduced," or "substantially different" as used herein, denotes a sufficiently high degree of difference between two numeric values (generally one associated with an antibody of the invention and the other associated with a reference/comparator antibody) such that one of skill in the art would consider the difference between the two values to be of statistical significance within the context of the biological characteristic measured by said values (e.g., K_d values, HAMA response). The difference between said two values is preferably greater than about 10%, preferably greater than about 20%, preferably greater than about 30%, preferably greater than about 40%, preferably greater than about 50% as a function of the value for the reference/comparator antibody.

"Percent (%) amino acid sequence identity" with respect to a peptide or polypeptide sequence is defined as the percentage of amino acid residues in a candidate sequence that are identical with the amino acid residues in the specific peptide or polypeptide sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Alignment for purposes of determining percent amino acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN or Megalign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % amino acid sequence identity values are generated using the sequence comparison computer program ALIGN-2, wherein the complete source code for the ALIGN-2 program is provided in Table A below. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc. and the source code shown in Table A below has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559 where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXU510087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California or may be compiled from the source code provided in Figure 8 below. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2

program and do not vary

In situations where ALIGN-2 is employed for amino acid sequence comparisons, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows.

100 times the fraction X/Y

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A.

Unless specifically stated otherwise, all % amino acid sequence identity values used herein are obtained as described in the immediately preceding paragraph using the ALIGN-2 computer program.

Table A

/*

*

* C-C increased from 12 to 15

* Z is average of BQ

* 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},

1

WO 2006/026759

PCT/US2005/031401

```

#define PINS1      4      /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP], /* size of jmp (neg for dely) */
5    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 */
10       long       offset;     /* offset of prev block */
        short      ijmp,       /* current jmp index */
        struct jmp  jp;        /* list of jumps */
    },

15  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) */
    },

20  char        *ofile,         /* output file name */
    char        *namex[2],     /* seq names  getseqs() */
    char        *prog;         /* prog name for our msgs */
    char        *secp[2];      /* seqs  getseqs() */
25  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 */
30  int         len0, len1,     /* seq lens */
    int         ngapx, ngapy,   /* total size of gaps */
    int         smax,          /* max score  irw() */
    int         *xbm,          /* bitmap for matching */
    long        offset;        /* current offset in jmp file */
35  struct diag  *dx,           /* holds diagonals */
    struct path  pp[2],        /* holds path for seqs */

```

char *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy(),
char *gstseq(), *g_calloc(),

5

/* Needleman-Wunsch alignment program

*

10

* usage: prog 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)

15

* A sequence with 1/3 or more of its elements ACCTU 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

20

*/

#include "nw.h"

#include "day.h"

static _dbval[26] = {

25

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,

30

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'))

},

35

main(ac, av)

main

int ac,

char *av[],

U✓

48

WO 2006/026759

PCT/US2005/031401

```
prog = av[0],
if (ac != 3) {
    fprintf(stderr, "usage %s file1 file2\n" prog)
5    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),
10 }
namex[0] = av[1],
namex[1] = av[2],
seqx[0] = getseq(namex[0] &len0)
seqx[1] = getseq(namex[1] &len1),
15 xbm = (dna)? _dbval _pbval,

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

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

cleanup(0),           /* unlink any tmp files */
25 }

/* do the alignment, return best score. main()
30 * 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
35 */
nw()
{
nw
```

49

```

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 */
5 int        ms,             /* 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 */
10 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)),
15 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,
20

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

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

```

2

```

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

15
    for (py = seqx[1], yy = 1, yy <= len1, py++, yy++) {
        mls = col0[yy-1]
        if (dna)
            mls += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT  DMIS,
20         else
            mls += _day[*px-'A'][*py-'A'],

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

```

51

```

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

5
/* update penalty for del in y seq,
 * favor new del over ongoing del
 */
if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1),
        ndelx = 1,
    } else {
        delx -= ms1
15
        ndelx++;
    }
} else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1),
20
        ndelx = 1,
    } else
        ndelx++,
    }

25
/* pick the maximum score, we're favoring
 * ms over any del and delx over dely
 */

30

--HW

id = xx - yy + len1 - 1
if (ms >= delx && ms >= dely[yy])
35
    col1[yy] = ms,
else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx,
45
```


52

```

ij = dx[id].ijmp,
if (dx[id].jp.n[0] && (ldna || (ndelx >= MAXJMP
&& xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
    dx[id].ijmp++,
3     if (++ij >= MAXJMP) {
        writejumps(id),
        ij = dx[id].ijmp = 0,
        dx[id].offset = offset,
        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset),
10    }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx,
    dx[id].jp.x[ij] = xx,
    dx[id].score = delx,
15    }
    else {
        col1[yy] = dely[yy],
        ij = dx[id].ijmp,
        if (dx[id].jp.n[0] && (ldna || (ndely[yy] >= MAXJMP
20     && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
            dx[id].ijmp++
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejumps(id),
                ij = dx[id].ijmp = 0,
25             dx[id].offset = offset,
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset),
            }
        }
        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy]
        dx[id].jp.x[ij] = xx
30         dx[id].score = dely[yy],
    }
    if (xx == len0 && yy < len1) {
        /* last col
35         */
        if (endgaps)
            col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy),

```

27 53

WO 2006/026759

PCT/US2005/031401

```

        if (col1[yy] > smax) {
            smax = col1[yy],
            dmax = id,
        }
5      }
    }
    if (endgaps && xx < len0)
        col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx)
    if (col1[yy-1] > smax) {
10      smax = col1[yy-1],
        dmax = id,
    }
    tmp = col0; col0 = col1 col1 = tmp,
}
15 (void) free((char *)ndely),
    (void) free((char *)dely),
    (void) free((char *)col0),
    (void) free((char *)col1),
}

20 /*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static
25 * 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, [sum]) dumpblock()
30 * stars() -- put a line of stars dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw h"

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

```

74 54

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

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

print()                                print
{
    int    lx ly firstgap, lastgap, /* overlap */
10
    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s can't write %s\n" prog, ofile),
        cleanup(1),
    }
15 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,
20 firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1,
        ly -= pp[0].spc,
    }
25 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 */
30 lastgap = len0 - dmax0 - 1,
        lx -= lastgap,
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1)
35 ly -= lastgap,
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap),
```

55

WO 2006/026759

PCT/US2005/031401

```

    pr_align(),
}

3

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
10 static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly;                                /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap,                      /* leading trailing overlap */
{
15     int    nm, i0, i1, siz0, siz1,
    char    outx[32],
    double   pct;
    register    n0, n1,
    register char    *p0, *p1,
20
    /* get total matches, score
    */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0,
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc,
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc,
25     n0 = pp[1].spc + 1,
    n1 = pp[0].spc + 1,

    nm = 0;
30     while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++,
            n1++,
            siz0--,
35         }
        else if (siz1) {
            p0++;

```

56

```

        n0++,
        siz1--,
    }
    else {
5         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])
10                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }
15
    /* pct homology
    * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
    * else, knock off overhangs and take shorter core
    */
20    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1,
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly,
    pct = 100 *(double)nm/(double)lx,
25    fprintf(fx, "\n"),
    fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d % 2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct),

30
    fprintf(fx, "<gaps in first sequence. %d", gapx),
    if (gapx) {
        (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
35        ngapx, (dna)? "base" : "residue", (ngapx == 1)? "" : "s"),
        fprintf(fx, "%s", outx),
    }

```

--getmat

77 57

```
fprintf(fx " gaps in second sequence. %d", gapy),
if (gapy) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapy, (dna)? "base" "residue", (ngapy == 1)? "" "s"),
5    fprintf(fx, "%s", outx),
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
10    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),
15    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"),
20    else
        fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n"),
}

static nm; /* matches in core — for checking */
25 static lmax, /* lengths of stripped file names */
static y[2], /* jmp index for a path */
static nc[2], /* number at start of current line */
static nu[2], /* current elem number — for gapping */
static siz[2],
30 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() */

35 /*
* print alignment of described in struct path pp[]
*/
```

58

```

static
pr_align0
{
    int      nm,    /* char count */
5      int      more,
      register    i,

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2, i++) {
        nm = stripname(name[i]),
10      if (nm > lmax)
            lmax = nm,

        nc[i] = 1
        ni[i] = 1,
15      siz[i] = ij[i] = 0,
        ps[i] = seqx[i],
        po[i] = out[i]    }

20      for (nm = nm = 0  more = 1, more, ) {
        for (i = more = 0, i < 2, i++) {
            /*
             * do we have more of this sequence?
             */
25      if (!*ps[i])
                continue,

            more++;

30      if (pp[i].spc) { /* leading space */
                *po[i]++ = ' ';
                pp[i].spc--;
            }
            else if (siz[i]) { /* in a gap */
35      *po[i]++ = '-';
                siz[i]--;
            }
        }
    }
}

```

pr_align

-pr_align

```

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

    /*
10    * are we at next gap for this seq?
    */
    if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
        /*
        * we need to merge all gaps
15    * 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]]++,
20    }
        ni[i]++,
    }
}
if (++nn == olen || !more && m) {
25    dumpblock(),
    for (i = 0, i < 2, i++)
        po[i] = out[i],
        nn = 0;
}
30 }

/*
* dump a block of lines, including numbers, starts pr_align()
35 */
static
dumpblock()

```

dumpblock

60

WO 2006/026759

PCT/US2005/031401

```

{
    register    i,

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

    (void) puts("\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),
        }
    }
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(lx)
    int    lx,    /* 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 = ' ',

```

__dumpblock

nums

41

```

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

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

        for (px = names[ix], i = 0, *px && *px != ' ', px++, i++)
            (void) puts(*px, fx),

```

62

```

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

    /* these count from 1
5      * 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),
10    (void)putc('\n', fx),
}

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

        if (!(*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(p0[0] == ' ')) ||
            !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(p0[1] == ' ')))
25            return,
        px = star;
        for (i = lmax+P_SPC, i, i--)
            *px++ = ' ';

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

                if (xbrn[*p0-'A']&xbrn[*p1-'A']) {
                    cx = '*';
35                    nm++;
                }
                else if (ldna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)

```

WO 2006/026759

PCT/US2005/031401

```

        cx = ''
    else
        cx = ''
    }
5      else
        cx = '',
        *px++ = cx,
    }
    *px++ = '\n',
10    *px = '\0',
}

15

/*
 * strip path or prefix from pn return len pr_align()
20 */
static
stripname(pn)                                stripname
    char *pn, /* file name (may be path) */
{
25    register char *px, *py

    py = 0,
    for (px = pn, *px, px++)
        if (*px == '/')
30            py = px + 1

    if (py)
        (void) strcpy(pn, py),
        return(strlen(pn)),
35    }

```

65

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

5
if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
    fprintf(stderr, "%s can't read %s\n", prog, file),
    exit(1),
}
10
tlen = natgc = 0,
while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue,
    for (px = line; *px != '\n', px++)
15
        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);
20
    exit(1),
}
pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0',

25

                                __getseq

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

30
while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue,
    for (px = line, *px != '\n', px++) {
35
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px,
        else if (islower(*px))
```

```

        *py++ = toupper(*px),
        if (index("ATGCU",*(py-1)))
            natgc++,
    }
5      }
      *py++ = '\0';
      *py = '\0';
      (void) fclose(fp);
      dna = natgc > (flen/3),
10     return(paeq+4),
}

char *
g_malloc(msg, nx, sz)                                g_malloc
15     char *msg /* program, calling routine */
     int nx, sz, /* number and size of elements */
{
     char *px, *calloc(),

20     if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
         if (*msg) {
             fprintf(stderr, "%s g_malloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx,
sz),
             exit(1),
25         }
     }
     return(px);
}

30 /*
 * get final jumps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax main()
 */
readjumps()                                readjumps
{
35     int fd = -1,
        int siz, i0, i1,
        register i, j, xx,

```

WO 2006/026759

PCT/US2003/031401

```
if (f) {
    (void) fclose(f),
    if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
5         fprintf(stderr, "%s can't open() %s\n", prog, jname),
        cleanup(1),
    }
}
for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax xx = len0 i++) {
10     while (1) {
        for (j = dx[dmax] ijmp, j >= 0 && dx[dmax] jp.x[j] >= xx, j--)

                                                    ...readjmps
15         if (j < 0 && dx[dmax].offset && f) {
            (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
20         }
        else
            break,
    }
    if (i >= JMPS) {
25         fprintf(stderr, "%s too many gaps in alignment\n", prog),
        cleanup(1),
    }
    if (j >= 0) {
        siz = dx[dmax].jp.n[j]
30         xx = dx[dmax].jp.x[j]
        dmax += siz,
        if (siz < 0) { /* gap in second seq */
            pp[1].n[i1] = -siz,
            xx += siz,
35         /* id = xx - yy + len1 - 1
            */
            pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1,
```

68 5A

WO 2006/026759

PCT/US2005/031401

```

        gapy++,
        ngapy -= siz,
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz MAXGAP,
5         i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz,
        pp[0].x[i0] = xx,
10         gapx++
        ngapx += siz,
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz MAXGAP;
        i0++,
15         }
    }
    else
        break,
}

20
/* 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,
25     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,
30 }
if (fd >= 0)
    (void) close(fd),
if (fj) {
    (void) unlink(jname),
35     fj = 0,
    offset = 0,
}
}

```


69

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any) nw()
5  */
writejmps(ix)                                writejmps
{
    int    ix,
10    char  *mktemp(),

    if (!f) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s can't mktemp() %s\n", prog, jname),
            cleanup(1),
15        }
        if ((f = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s can't write %s\n", prog, jname),
            exit(1),
        }
20    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix] jp, sizeof(struct jmp), 1, f),
    (void) fwrite((char *)&dx[ix] offset, sizeof(dx[ix] offset), 1, f),

```

25 The term "vector," as used herein, is intended to refer to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments may be ligated. Another type of vector is a phage vector. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments may be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of
30 autonomous replication in a host cell into which they are introduced (e.g., bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (e.g., non-episomal mammalian vectors) can be integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred
35 to herein as "recombinant expression vectors" (or simply, "recombinant vectors"). In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" may be used interchangeably as the plasmid is the

most commonly used form of vector

"Polynucleotide," or "nucleic acid," as used interchangeably herein, refer to polymers of nucleotides of any length, and include DNA and RNA. The nucleotides can be deoxyribonucleotides, ribonucleotides, modified nucleotides or bases, and/or their analogs, or any substrate that can be incorporated into a polymer by DNA or RNA polymerase, or by a synthetic reaction. A polynucleotide may comprise modified nucleotides, such as methylated nucleotides and their analogs. If present, modification to the nucleotide structure may be imparted before or after assembly of the polymer. The sequence of nucleotides may be interrupted by non-nucleotide components. A polynucleotide may be further modified after synthesis, such as by conjugation with a label. Other types of modifications include, for example, "caps" substitution of one or more of the naturally occurring nucleotides with an analog, internucleotide modifications such as, for example, those with uncharged linkages (e.g., methyl phosphonates, phosphotriesters, phosphoramidates, carbamates, etc.) and with charged linkages (e.g., phosphorothioates, phosphorodithioates, etc.) those containing pendant moieties, such as, for example, proteins (e.g., nucleases, toxins, antibodies, signal peptides, poly-L-lysine, etc.), those with intercalators (e.g., acridine, psoralen, etc.) those containing chelators (e.g., metals, radioactive metals, boron, oxidative metals, etc.), those containing alkylators, those with modified linkages (e.g., alpha anomeric nucleic acids, etc.), as well as unmodified forms of the polynucleotide(s). Further, any of the hydroxyl groups ordinarily present in the sugars may be replaced, for example, by phosphonate groups, phosphate groups, protected by standard protecting groups, or activated to prepare additional linkages to additional nucleotides, or may be conjugated to solid or semi-solid supports. The 5' and 3' terminal OH can be phosphorylated or substituted with amines or organic capping group moieties of from 1 to 20 carbon atoms. Other hydroxyls may also be derivatized to standard protecting groups. Polynucleotides can also contain analogous forms of ribose or deoxyribose sugars that are generally known in the art, including, for example, 2'-O-methyl-, 2'-O-allyl-, 2'-fluoro- or 2'-azido-ribose, carbocyclic sugar analogs, alpha-anomeric sugars, epimeric sugars such as arabinose, xyloses or lyxoses, pyranose sugars, furanose sugars, sedoheptuloses, acyclic analogs and abasic nucleoside analogs such as methyl riboside. One or more phosphodiester linkages may be replaced by alternative linking groups. These alternative linking groups include, but are not limited to, embodiments wherein phosphate is replaced by P(O)S("thioate"), P(S)S("dithioate"), "(O)NR₂("amidate"), P(O)R, P(O)OR', CO or CH₂ ("formacetal"), in which each R or R' is independently H or substituted or unsubstituted alkyl (1-20 C) optionally containing an ether (-O-) linkage, aryl, alkynyl, cycloalkyl, cycloalkenyl or aralkyl. Not all linkages in a polynucleotide need be identical. The preceding description applies to all polynucleotides referred to herein, including RNA and DNA.

"Oligonucleotide," as used herein, generally refers to short, generally single stranded, generally synthetic polynucleotides that are generally, but not necessarily, less than about 200 nucleotides in length.

The terms "oligonucleotide" and "polynucleotide" are not mutually exclusive. The description above for polynucleotides is equally and fully applicable to oligonucleotides.

The terms "antibody" and "immunoglobulin" are used interchangeably in the broadest sense and include monoclonal antibodies (for example, full length or intact monoclonal antibodies), polyclonal antibodies, multivalent antibodies, multispecific antibodies (e.g., bispecific antibodies so long as they exhibit the desired biological activity) and may also include certain antibody fragments (as described in greater detail herein). An antibody can be human, humanized and/or affinity matured.

"Antibody fragments" comprise only a portion of an intact antibody, wherein the portion preferably retains at least one, preferably most or all, of the functions normally associated with that portion when present in an intact antibody. In one embodiment, an antibody fragment comprises an antigen binding site of the intact antibody and thus retains the ability to bind antigen. In another embodiment, an antibody fragment, for example one that comprises the Fc region, retains at least one of the biological functions normally associated with the Fc region when present in an intact antibody, such as FcRn binding, antibody half life modulation, ADCC function and complement binding. In one embodiment, an antibody fragment is a monovalent antibody that has an in vivo half life substantially similar to an intact antibody. For example, such an antibody fragment may comprise an antigen binding arm linked to an Fc sequence capable of conferring in vivo stability to the fragment.

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigen. Furthermore, in contrast to polyclonal antibody preparations that typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen.

The monoclonal antibodies herein specifically include "chimeric" antibodies in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (U.S. Patent No. 4,816,567 and Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)).

"Humanized" forms of non-human (e.g., murine) antibodies are chimeric antibodies that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a hypervariable

region of the recipient are replaced by residues from a hypervariable region of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit or nonhuman primate having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues that are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are made to further refine antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FRs are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optionally will also comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For further details, see Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986), Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988) and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). See also the following review articles and references cited therein: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998), Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995), Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

An "antigen" is a predetermined antigen to which an antibody can selectively bind. The target antigen may be polypeptide, carbohydrate, nucleic acid, lipid, hapten or other naturally occurring or synthetic compound. Preferably, the target antigen is a polypeptide. An "acceptor human framework" for the purposes herein is a framework comprising the amino acid sequence of a VL or VH framework derived from a human immunoglobulin framework, or from a human consensus framework. An acceptor human framework "derived from" a human immunoglobulin framework or human consensus framework may comprise the same amino acid sequence thereof, or may contain pre-existing amino acid sequence changes. Where pre-existing amino acid changes are present, preferably no more than 5 and preferably 4 or less or 3 or less, pre-existing amino acid changes are present. Where pre-existing amino acid changes are present in a VH, preferably those changes are only at three, two or one of positions 71H, 73H and 78H, for instance, the amino acid residues at those positions may be 71A, 73T and/or 78A. In one embodiment, the VL acceptor human framework is identical in sequence to the VL human immunoglobulin framework sequence or human consensus framework sequence.

A "human consensus framework" is a framework which represents the most commonly occurring amino acid residue in a selection of human immunoglobulin VL or VH framework sequences. Generally, the selection of human immunoglobulin VL or VH sequences is from a subgroup of variable domain sequences. Generally, the subgroup of sequences is a subgroup as in Kabat *et al.* In one embodiment, for the VL, the subgroup is subgroup kappa I as in Kabat *et al.* In one embodiment, for the VH, the subgroup is subgroup III as in Kabat *et al.*

A "VL subgroup I consensus framework" comprises the consensus sequence obtained from the amino acid sequences in variable light kappa subgroup I of Kabat *et al.* In one embodiment, the VL subgroup I consensus framework amino acid sequence comprises at least a portion or all of each of the following sequences

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTC (SEQ ID NO 34)-L1-WYQQKPGKAPKLLI (SEQ ID NO 35)-
L2-GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO 36)-L3-FGQGTKVHIKR (SEQ
ID NO 37)

A "VH subgroup III consensus framework" comprises the consensus sequence obtained from the amino acid sequences in variable heavy subgroup III of Kabat *et al.* In one embodiment, the VH subgroup III consensus framework amino acid sequence comprises at least a portion or all of each of the following sequences EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO 38)-H1-
WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO 39)-H2-RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
(SEQ ID NO 40)-H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO 41)

An "unmodified human framework" is a human framework which has the same amino acid sequence as the acceptor human framework, *e.g.* lacking human to non-human amino acid substitution(s) in the acceptor human framework.

An "altered hypervariable region" for the purposes herein is a hypervariable region comprising one or more (*e.g.* one to about 16) amino acid substitution(s) therein.

An "un-modified hypervariable region" for the purposes herein is a hypervariable region having the same amino acid sequence as a non-human antibody from which it was derived, *i.e.* one which lacks one or more amino acid substitutions therein

The term "hypervariable region", "HVR", or "HV", when used herein refers to the regions of an antibody variable domain which are hypervariable in sequence and/or form structurally defined loops. Generally, antibodies comprise six hypervariable regions, three in the VH (H1, H2, H3) and three in the VL (L1, L2, L3). A number of hypervariable region delineations are in use and are encompassed herein. The Kabat Complementarity Determining Regions (CDRs) are based on sequence variability and are the most commonly used (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Chothia refers instead to the location of the structural loops (Chothia and Lesk *J Mol Biol* 196 901-917 (1987)). The AbM hypervariable regions represent a compromise between the Kabat CDRs and Chothia structural loops, and are used by Oxford Molecular's AbM antibody modeling software. The "contact" hypervariable regions are based on an analysis of the available complex crystal structures. The residues from each of these hypervariable regions are noted below

Table 1

Loop	Kabat	AbM	Chothia	Contact
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 Kabat numbering	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1 Chothia numbering	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Hypervariable regions may comprise "extended hypervariable regions" as follows 24-36 or 24-34 (L1) 46-56 or 49-56 or 50-56 or 52-56 (L2) and 89-97 (L3) in the VL and 26-35 (H1), 50-65 or 49-65 (H2) and 93-102, 94-102 or 95-102 (H3) in the VH. The variable domain residues are numbered according to Kabat *et al*, *supra* for each of these definitions

"Framework" or "FR" residues are those variable domain residues other than the hypervariable region residues as herein defined.

A "human antibody" is one which possesses an amino acid sequence which corresponds to that of an antibody produced by a human and/or has been made using any of the techniques for making human antibodies as disclosed herein. This definition of a human antibody specifically excludes a humanized antibody comprising non-human antigen-binding residues

An "affinity matured" antibody is one with one or more alterations in one or more CDRs thereof which result in an improvement in the affinity of the antibody for antigen, compared to a parent antibody which does not possess those alteration(s). Preferred affinity matured antibodies will have nanomolar or even picomolar affinities for the target antigen. Affinity matured antibodies are produced by procedures known in the art. Marks *et al. BioTechnology* 10:779-783 (1992) describes affinity maturation by VH and VL domain shuffling. Random mutagenesis of CDR and/or framework residues is described by 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)

A "blocking" antibody or an "antagonist" antibody is one which inhibits or reduces biological activity of the antigen it binds. Preferred blocking antibodies or antagonist antibodies substantially or completely inhibit the biological activity of the antigen.

An "agonist antibody", as used herein, is an antibody which mimics at least one of the functional activities of a polypeptide of interest

A "disorder" is any condition that would benefit from treatment with a substance/molecule or method of the invention. This includes chronic and acute disorders or diseases including those pathological conditions which predispose the mammal to the disorder in question. Non-limiting

examples of disorders to be treated herein include malignant and benign tumors, non-leukemias and lymphoid malignancies, neuronal, glial, astrocytic, hypothalamic and other glandular macrophagal, epithelial, stromal and blastocoele disorders, and inflammatory, immunologic and other angiogenesis-related disorders

5 The term "immune related disease" means a disease in which a component of the immune system of a mammal causes, mediates or otherwise contributes to a morbidity in the mammal. Also included are diseases in which stimulation or intervention of the immune response has an ameliorative effect on progression of the disease. Included within this term are immune-mediated inflammatory diseases, non-immune-mediated inflammatory diseases, infectious diseases, immunodeficiency diseases, neoplasia, etc

10 Examples of immune-related and inflammatory diseases, some of which are immune or T cell mediated, which can be treated according to the invention include systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, juvenile chronic arthritis, spondyloarthropathies, systemic sclerosis (scleroderma), idiopathic inflammatory myopathies (dermatomyositis, polymyositis), Sjögren's syndrome, systemic vasculitis, sarcoidosis, autoimmune hemolytic anemia (immune pancytopenia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria), autoimmune thrombocytopenia (idiopathic thrombocytopenic purpura, immune-mediated thrombocytopenia), thyroiditis (Grave's disease, Hashimoto's thyroiditis, juvenile lymphocytic thyroiditis, atrophic thyroiditis), diabetes mellitus, immune-mediated renal disease (glomerulonephritis, tubulointerstitial nephritis), demyelinating diseases of the central and peripheral nervous systems such as multiple sclerosis, idiopathic demyelinating polyneuropathy or Guillain-Barré syndrome, and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, hepatobiliary diseases such as infectious hepatitis (hepatitis A, B, C, D, E and other non-hepatotropic viruses), autoimmune chronic active hepatitis, primary biliary cirrhosis, granulomatous hepatitis, and sclerosing cholangitis, inflammatory bowel disease (ulcerative colitis, Crohn's disease), gluten-sensitive enteropathy, and Whipple's disease, autoimmune or immune-mediated skin diseases including bullous skin diseases, erythema multiforme and contact dermatitis, psoriasis, allergic diseases such as asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis, food hypersensitivity and urticaria, immunologic diseases of the lung such as eosinophilic pneumonias, idiopathic pulmonary fibrosis and hypersensitivity pneumonitis, transplantation associated diseases including graft rejection and graft-versus-host-disease. Infectious diseases including viral diseases such as AIDS (HIV infection), hepatitis A, B, C, D, and E, herpes, etc, bacterial infections, fungal infections, protozoal infections and parasitic infections

An "autoimmune disorder" or "autoimmune disease" as used interchangeably herein is a non-malignant disease or disorder arising from and directed against an individual's own tissues

35 The autoimmune diseases described herein specifically exclude malignant or cancerous diseases or conditions, particularly excluding B cell lymphoma, acute lymphoblastic leukemia (ALL), chronic lymphocytic leukemia (CLL), hairy cell leukemia, and chronic myeloblastic leukemia. Examples of

autoimmune diseases or disorders include, but are not limited to, inflammatory responses such as inflammatory skin diseases including psoriasis and dermatitis (for example, atopic dermatitis), systemic scleroderma and sclerosis, responses associated with inflammatory bowel disease (such as Crohn's disease and ulcerative colitis) respiratory distress syndrome (including adult respiratory distress syndrome, ARDS), dermatitis, meningitis, encephalitis, uveitis, colitis, glomerulonephritis, allergic conditions such as eczema and asthma and other conditions involving infiltration of T cells and chronic inflammatory responses, atherosclerosis, leukocyte adhesion deficiency, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus (SLE), diabetes mellitus (e.g. Type I diabetes mellitus or insulin dependent diabetes mellitus), multiple sclerosis, Reynaud's syndrome, autoimmune thyroiditis, allergic encephalomyelitis Sjogren's syndrome, juvenile onset diabetes, and immune responses associated with acute and delayed hypersensitivity mediated by cytokines and T-lymphocytes typically found in tuberculosis, sarcoidosis, polymyositis, granulomatosis and vasculitis, pernicious anemia (Addison's disease), diseases involving leukocyte diapedesis central nervous system (CNS) inflammatory disorder, multiple organ injury syndrome, hemolytic anemia (including, but not limited to cryoglobulinemia or Coombs positive anemia), myasthenia gravis, antigen-antibody complex mediated diseases, anti-glomerular basement membrane disease, antiphospholipid syndrome, allergic neuritis, Graves' disease, Lambert-Eaton myasthenic syndrome, pemphigoid bullous, pemphigus, autoimmune polyendocrinopathies; Renter's disease, stiff-man syndrome, Behcet disease, giant cell arteritis, immune complex nephritis, IgA nephropathy, IgM polyneuropathies; immune thrombocytopenic purpura (ITP) or autoimmune thrombocytopenia etc.

The term "gastrointestinal inflammatory disorders" is a group of chronic disorders that cause inflammation and/or ulceration in the mucous membrane. As such, the term includes inflammatory bowel disease (e.g., Crohn's disease, ulcerative colitis, indeterminate colitis and infectious colitis), mucositis (e.g., oral mucositis, gastrointestinal mucositis, nasal mucositis and proctitis), necrotizing enterocolitis and esophagitis

The terms "cell proliferative disorder" and "proliferative disorder" refer to disorders that are associated with some degree of abnormal cell proliferation. In one embodiment the cell proliferative disorder is cancer

"Tumor", as used herein, refers to all neoplastic cell growth and proliferation, whether malignant or benign, and all pre-cancerous and cancerous cells and tissues. The terms "cancer", "cancerous", "cell proliferative disorder", "proliferative disorder" and "tumor" are not mutually exclusive as referred to herein

The terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth/proliferation. Examples of cancer include but are not limited to, carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia. More particular examples of such cancers include squamous cell cancer, small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung, squamous carcinoma of the lung, cancer of the

pentoneum, hepatocellular cancer, gastrointestinal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, breast cancer, colon cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney cancer, liver cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma and various types of head and neck cancer

Dysregulation of angiogenesis can lead to many disorders that can be treated by compositions and methods of the invention. These disorders include both non-neoplastic and neoplastic conditions. Neoplasias include but are not limited to those described above. Non-neoplastic disorders include but are not limited to undesired or aberrant hypertrophy arthritis, rheumatoid arthritis (RA), psoriasis, psoriatic plaques, sarcoidosis, atherosclerosis, atherosclerotic plaques, diabetic and other proliferative retinopathies including retinopathy of prematurity, retrolental fibroplasia, neovascular glaucoma, age-related macular degeneration, diabetic macular edema, corneal neovascularization, corneal graft neovascularization, corneal graft rejection, retinal/choroidal neovascularization, neovascularization of the angle (rubeosis), ocular neovascular disease, vascular restenosis, arteriovenous malformations (AVM), meningioma, hemangioma, angiofibroma, thyroid hyperplasias (including Grave's disease), corneal and other tissue transplantation, chronic inflammation, lung inflammation, acute lung injury/ARDS, sepsis, primary pulmonary hypertension, malignant pulmonary effusions, cerebral edema (e.g., associated with acute stroke/ closed head injury/ trauma), synovial inflammation, pannus formation in RA, myositis ossificans, hypertrophic bone formation, osteoarthritis (OA), refractory ascites, polycystic ovarian disease, endometriosis, 3rd spacing of fluid diseases (pancreatitis, compartment syndrome, burns, bowel disease), uterine fibroids, premature labor, chronic inflammation such as IBD (Crohn's disease and ulcerative colitis), renal allograft rejection, inflammatory bowel disease, nephrotic syndrome, undesired or aberrant tissue mass growth (non-cancer), hemophilic joints, hypertrophic scars, inhibition of hair growth, Oskar-Weber syndrome, pyogenic granuloma, retrolental fibroplasias, scleroderma, trachoma, vascular adhesions, synovitis, dermatitis, preeclampsia, ascites, pericardial effusion (such as that associated with pericarditis), and pleural effusion.

As used herein, "treatment" refers to clinical intervention in an attempt to alter the natural course of the individual or cell being treated, and can be performed either for prophylaxis or during the course of clinical pathology. Desirable effects of treatment include preventing occurrence or recurrence of disease, alleviation of symptoms, diminishment of any direct or indirect pathological consequences of the disease, preventing metastasis, decreasing the rate of disease progression, amelioration or palliation of the disease state, and remission or improved prognosis. In some embodiments, antibodies of the invention are used to delay development of a disease or disorder.

An "effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired therapeutic or prophylactic result.

A "therapeutically effective amount" of a substance/molecule of the invention, agonist or

antagonist may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the ability of the substance/molecule, agonist or antagonist to elicit a desired response in the individual. A therapeutically effective amount is also one in which any toxic or detrimental effects of the substance/molecule, agonist or antagonist are outweighed by the therapeutically beneficial effects. A
 5 "prophylactically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired prophylactic result. Typically but not necessarily, since a prophylactic dose is used in subjects prior to or at an earlier stage of disease, the prophylactically effective amount will be less than the therapeutically effective amount.

The term "cytotoxic agent" as used herein refers to a substance that inhibits or prevents the
 10 function of cells and/or causes destruction of cells. The term is intended to include radioactive isotopes (e.g., At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{213} , P^{32} and radioactive isotopes of Lu), chemotherapeutic agents e.g. methotrexate, adriamycin, vinca alkaloids (vincristine, vinblastine, etoposide), doxorubicin, melphalan, mitomycin C, chlorambucil, daunorubicin or other intercalating agents, enzymes and fragments thereof such as nucleolytic enzymes, antibiotics, and toxins such as
 15 small molecule toxins or enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant or animal origin, including fragments and/or variants thereof, and the various antitumor or anticancer agents disclosed below. Other cytotoxic agents are described below. A tumoricidal agent causes destruction of tumor cells.

A "chemotherapeutic agent" is a chemical compound useful in the treatment of cancer.
 20 Examples of chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and CYTOXAN® cyclophosphamide, alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan, aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa, ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, trietylenephosphoramide, triethylenethiophosphoramide and trimethylolmelamine, acetogenins (especially bullatacin and
 25 bullatacinone), delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachone, lapachol, colchicines, betulinic acid, a camptothecin (including the synthetic analogue topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetylcamptothecin, scoplectin, and 9-ammocamptothecin); bryostatin, calystatin, CC-1065 (including its adozelesin, carzelesin and bizelesin synthetic analogues), podophyllotoxin, podophyllinic acid, teniposide; cryptophycins (particularly cryptophycin 1 and cryptophycin 8), dolastatin, duocarmycin (including the synthetic analogues, KW-2189 and CB1-TM1), eleutherobin, pancratistatin, a sarcodictyn, spongistatin, nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenestorine, prednimustine, trifosfamide, uracil mustard, nitroureas such as carmustine,
 30 chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, and ranimustine, antibiotics such as the enedryne antibiotics (e.g., calicheamicin, especially calicheamicin gammaII and calicheamicin omegaII (see, e.g. Agnew, *Chem. Int. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994))) dynemicin, including dynemicin A, an

 79

esperamicin, as well as neocarzinostatin chromophore and related chromoprotein onediyne
antibiotic chromophores), aclacinomycin, actinomycin, anthramycin, azaserine, bleomycin,
cactinomycin, carabycin, carminomycin, carzinophilin, chromomycin, daunomycin, daunorubicin,
detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, ADRIAMYCIN® doxorubicin (including morpholino-
5 doxorubicin, cyanomorpholino-doxorubicin, 2-pyrrolino-doxorubicin and deoxydoxorubicin),
epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins such as mitomycin C, mycophenolic
acid, nogalamycin, olivomycin, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin,
streptomycin, streptozocin, tuberulin, ubenimex, zinzolitin, zorubicin, anti-metabolites such as
methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, methotrexate,
10 pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine,
thioguanine, pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine,
dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine, androgens such as calusterone,
dromostanolone propionate, epiandrosterone, mepitostane, testolactone, anti-adrenals such as
aminoglutethimide, mitotane, trilostane, folic acid replenisher such as frolinic acid, aceglatone,
15 aldophosphamide glycoide; aminolevulinic acid, enilfurfuril, amasurine, bestabucil, bisantrene,
edatrexate, defofamine, demecolcine; diaziquone, elformithine, elliptinium acetate; an epothilone,
etoglucid, gallium nitrate, hydroxyurea, leutin, lonidamine, maytansinoids such as maytansine
and ansamitocins, mitoguanine; mitoxantrone; mopidanmol, nitracrine, pentostatin, phenamet,
pirarubicin, losoxantrone, 2-ethylhydrazide; procarbazine, PSK® polysaccharide complex (JHS
20 Natural Products, Eugene, OR), razoxane, rhizoxin, azofiran, spirogermanium; tenazone acid,
triaziquone, 2,2',2''-trichloroethylamine, trichothecenes (especially T-2 toxin, verrucarin A,
roridin A and angustine), urethan, vindesine (ELDINSIN®, FILDRIN®), dacarbazine;
mannomustine, mitobronitol, mitolactol, pipobroman, gacytosine, araboside ("Ara-C"), thiotepa,
taxoids, e.g. TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ),
25 ABRAXANE™ Cremophor-free, albumin-engineered nanoparticle formulation of paclitaxel
(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), and TAXOTERB® docetaxel (Rhône-
Poulenc Rorer, Antony, France), chlorambucil, gemcitabine (GEMZAR®), 6-thioguanine;
mercaptopurine, methotrexate; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin, vinblastine
(VELBAN®), platinum, etoposide (VP-16), ifosfamide, mitoxantrone, vincristine (ONCOVIN®)
30 oxaliplatin, leucovorin, vinorelbine (NAVELBINE®), novantrone, edatrexate, daunomycin,
aminopterin, ibandronate, topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO),
retinoids such as retinoic acid, capecitabine (XELODA®), pharmaceutically acceptable salts, acids
or derivatives of any of the above, as well as combinations of two or more of the above such as
CHOP, an abbreviation for a combined therapy of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and
35 prednisolone, and FOLFOX, an abbreviation for a treatment regimen with oxaliplatin
(ELOXATIN™) combined with 5-FU and leucovorin

Also included in this definition are anti-hormonal agents that act to regulate, reduce, block, or inhibit the effects of hormones that can promote the growth of cancer, and are often in the form of systemic or whole-body treatment. They may be hormones themselves. Examples include anti-estrogens and selective estrogen receptor modulators (SERMs), including, for example, tamoxifen (including NOLVADEX® tamoxifen), EVISTA® raloxifene, droloxifene, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, and FARESTON® toremifene, anti-progesterones, estrogen receptor down-regulators (ERDs), agents that function to suppress or shut down the ovaries, for example, luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists such as LUPRON® and ELIGARD® leuprolide acetate, goserelin acetate, buserelin acetate and triptorelin, other anti-androgens such as flutamide, mitutamide and bicalutamide, and aromatase inhibitors that inhibit the enzyme aromatase, which regulates estrogen production in the adrenal glands, such as, for example, 4(5)-imidazoles, aminoglutethimide, MBGASE® megestrol acetate, AROMASIN® exemestane, formestane, fadrozole, RIVISOR® vorozole, FEMARA® letrozole and ARIMIDEX® anastrozole. In addition, such definition of chemotherapeutic agents includes bisphosphonates such as clodronate (for example, BONEPOS® or OSTAC®) DIDROCAL® etidronate, NE-58095, ZOMETA® zoledronic acid/zoledronate, FOSAMAX® alendronate, AREDIA® pamidronate, SKELID® tiludronate, or ACTONEL® risedronate, as well as troxacitabine (a 1,3-dioxolane nucleoside cytosine analog), antisense oligonucleotides particularly those that inhibit expression of genes in signaling pathways implicated in aberrant cell proliferation, such as, for example, PKC-alpha, Raf, H-Ras, and epidermal growth factor receptor (EGF-R), vaccines such as THERATOPE® vaccine and gene therapy vaccines, for example, ALLOVECTIN® vaccine, LEUVECTIN® vaccine, and VAXID® vaccine, LURTOTECAN® topoisomerase I inhibitor, ABARELIX® rnrh, lapatinib ditosylate (an ErbB-2 and EGFR dual tyrosine kinase small-molecule inhibitor also known as GW572016), and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above.

A "growth inhibitory agent" when used herein refers to a compound or composition which inhibits growth of a cell whose growth is dependent upon beta7 activation either *in vitro* or *in vivo*. Thus, the growth inhibitory agent may be one which significantly reduces the percentage of beta7-dependent cells in S phase. Examples of growth inhibitory agents include agents that block cell cycle progression (at a place other than S phase), such as agents that induce G1 arrest and M-phase arrest. Classical M-phase blockers include the vincas (vincristine and vinblastine), taxanes, and topoisomerase II inhibitors such as doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, etoposide, and bleomycin. Those agents that arrest G1 also spill over into S-phase arrest, for example, DNA alkylating agents such as tamoxifen, prednisone, dacarbazine, mechlorethamine, cisplatin, methotrexate, 5-fluorouracil, and ara-C. Further information can be found in The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al (WB Saunders Philadelphia, 1995), especially p 13. The taxanes (paclitaxel and docetaxel) are anticancer drugs both derived from the yew tree. Docetaxel

(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derived from the European yew, is a semisynthetic analogue of paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel and docetaxel promote the assembly of microtubules from tubulin dimers and stabilize microtubules by preventing depolymerization, which results in the inhibition of mitosis in cells.

5 "Doxorubicin" is an anthracycline antibiotic. The full chemical name of doxorubicin is (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexapyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-(hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,12-naphthacenedione.

Compounds useful in combination therapy with an antagonist anti-beta7 antibody of the invention include antibodies (including without limitation other anti-beta7 antagonist antibodies (Fib 10 21, 22, 27, 30 (Tidswell, M. (1997) *supra*) or humanized derivatives thereof), anti-alpha4 antibodies (such as ANTEGEN®), anti-TNF (REMICADE®)) or non-protein compounds including without limitation 5-ASA compounds ASACOL®, PENTASA™, ROWASA™, COLAZAL™, and other compounds such as Purinethol and steroids such as prednisone. In an embodiment, the invention encompasses a method of treating a patient, such as a human patient, with the antagonist anti-beta7 15 antibody of the invention alone or in combination with a second compound that is also useful in treating inflammation. In one embodiment the second compound is selected from the group consisting of Fib 21, 22, 27, 30, or humanized derivatives thereof, anti-alpha4 antibodies, ANTEGEN®, anti-TNF, REMICADE®, 5-ASA compounds, ASACOL®, PENTASA™, ROWASA™, COLAZAL™, Purinethol, steroids and prednisone. In one embodiment of the 20 invention, administration of the antagonist anti-beta7 antibody of the invention substantially reduces the dose of the second compound. In one embodiment, said reduction in the dose of the second compound is at least 30%, at least 40%, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 95%. In one embodiment of the invention, the combination of the antibody of the 25 invention and the reduced dose of the second compound relieves symptoms in the patient to substantially the same degree or better than administration of the second compound alone.

Generating variant antibodies exhibiting reduced or absence of HAMA response

Reduction or elimination of a HAMA (human anti-mouse (also applicable to human anti-rat or human anti-human) response is a significant aspect of clinical development of suitable therapeutic agents. See, e.g., Khaznazi et al., *J. Natl. Cancer Inst.* (1988), 80:937; Jaffers et al., *Transplantation* (1986), 41:572; Shawler et al., *J. Immunol.* (1985), 135:1530; Sears et al., *J. Biol. Response Mod.* (1984), 3:138; Miller et al., *Blood* (1983), 62:988; Hakimi et al., *J. Immunol.* (1991), 147:1352; Reichmann et al., *Nature* (1988), 332:323; Junghans et al., *Cancer Res.* (1990), 50:1495. As described herein, the invention provides antibodies that are humanized such that HAMA response is reduced or eliminated. Variants of these antibodies can further be obtained using routine methods known in the art, some of 35 which are further described below.

For example, an amino acid sequence from an antibody as described herein can serve as a starting (parent) sequence for diversification of the framework and/or hypervariable sequence(s). A selected

Handwritten signature and number 82

framework sequence to which a starting hypervariable sequence is linked is referred to herein as an acceptor human framework. While the acceptor human frameworks may be from, or derived from, a human immunoglobulin (the VL and/or VH regions thereof), preferably the acceptor human frameworks are from, or derived from, a human consensus framework sequence as such frameworks have been demonstrated to have minimal, or no, immunogenicity in human patients.

Where the acceptor is derived from a human immunoglobulin, one may optionally select a human framework sequence that is selected based on its homology to the donor framework sequence by aligning the donor framework sequence with various human framework sequences in a collection of human framework sequences, and select the most homologous framework sequence as the acceptor

In one embodiment, human consensus frameworks herein are from, or derived from, VH subgroup III and/or VL kappa subgroup I consensus framework sequences

Thus, the VH acceptor human framework may comprise one, two, three or all of the following framework sequences

FR1 comprising EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:38),

FR2 comprising WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO 39)

FR3 comprising FR3 comprises RPTISX1DX2SKNTX3YLQMNSLRARDTAVYYCA (SEQ ID NO.42), wherein X1 is A or R, X2 is T or N, and X3 is A, L, or F,

FR4 comprising WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO.41)

Examples of VH consensus frameworks include.

human VH subgroup I consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO 19);

human VH subgroup I consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs 20-22),

human VH subgroup II consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:48),

human VH subgroup II consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs.49-51),

human VH subgroup III consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO 52),

human VH subgroup III consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NO 53-55),

human VH acceptor framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:56),

human VH acceptor framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs 57-58)

human VH acceptor 2 framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO.59), or

human VH acceptor 2 framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs 60-62)

In one embodiment, the VH acceptor human framework comprises one, two, three or all of the following framework sequences

FR1 comprising EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO 38),

FR2 comprising WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO 39),

FR3 comprising FR3 comprises RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO:43), RFTISRDTSEKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO:44), RFTISRDTSEKNIFYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO:45), RFTISADTSKNTIFYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO:46),
 5 FR4 comprising WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:41)

The VL acceptor human framework may comprise one, two, three or all of the following framework sequences

FR1 comprising DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTC (SEQ ID NO 34),
 10 FR2 comprising WYQQKPGKAPKLLI (SEQ ID NO 35)
 FR3 comprising GVPSTRFSGSGSDTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO 36),
 FR4 comprising PGQGTKVEIKR (SEQ ID NO 37)

Examples of VL consensus frameworks include

human VL kappa subgroup I consensus framework (SEQ ID NO 14),
 15 human VL kappa subgroup I consensus framework (extended HVR-L2) (SEQ ID NO 15),
 human VL kappa subgroup II consensus framework (SEQ ID NO 16),
 human VL kappa subgroup III consensus framework (SEQ ID NO 17), or
 human VL kappa subgroup IV consensus framework (SEQ ID NO 18)

While the acceptor may be identical in sequence to the human framework sequence selected,
 20 whether that is from a human immunoglobulin or a human consensus framework, the present invention contemplates that the acceptor sequence may comprise pre-existing amino acid substitutions relative to the human immunoglobulin sequence or human consensus framework sequence. These pre-existing substitutions are preferably minimal, usually four, three, two or one amino acid differences only relative to the human immunoglobulin sequence or consensus
 25 framework sequence.

Hypervariable region residues of the non-human antibody are incorporated into the VL and/or VH acceptor human frameworks. For example, one may incorporate residues corresponding to the Kabat CDR residues, the Chothia hypervariable loop residues, the Abm residues, and/or contact residues. Optionally, the extended hypervariable region residues as follows are
 30 incorporated. 24-34 (L1), 49-56 (L2) and 89-97 (L3), 26-35 (H1), 50-65 or 49-65 (H2) and 93-102, 94-102, or 95-102 (H3)

While "incorporation" of hypervariable region residues is discussed herein, it will be appreciated that this can be achieved in various ways, for example, nucleic acid encoding the desired amino acid sequence can be generated by mutating nucleic acid encoding the mouse variable domain sequence so
 35 that the framework residues thereof are changed to acceptor human framework residues, or by mutating nucleic acid encoding the human variable domain sequence so that the hypervariable domain residues are changed to non-human residues, or by synthesizing nucleic acid encoding the desired sequence, etc.

84

In the examples herein, hypervariable region-grafted variants were generated by Kunkel mutagenesis of nucleic acid encoding the human acceptor sequences, using a separate oligonucleotide for each hypervariable region Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154 367-382 (1987) Appropriate changes can be introduced within the framework and/or hypervariable region, using

5 routine techniques, to correct and re-establish proper hypervariable region-antigen interactions.

Phage(mid) display (also referred to herein as phage display in some contexts) can be used as a convenient and fast method for generating and screening many different potential variant antibodies in a library generated by sequence randomization. However, other methods for making and screening altered antibodies are available to the skilled person.

10 Phage(mid) display technology has provided a powerful tool for generating and selecting novel proteins which bind to a ligand, such as an antigen. Using the techniques of phage(mid) display allows the generation of large libraries of protein variants which can be rapidly sorted for those sequences that bind to a target molecule with high affinity. Nucleic acids encoding variant polypeptides are generally fused to a nucleic acid sequence encoding a viral coat protein, such as the

15 gene III protein or the gene VIII protein. Monovalent phagemid display systems where the nucleic acid sequence encoding the protein or polypeptide is fused to a nucleic acid sequence encoding a portion of the gene III protein have been developed (Basa, S. *Proteins*, 8 309 (1990), Lowman and Wells *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3-205 (1991)). In a monovalent phagemid display system, the gene fusion is expressed at low levels and wild type gene III proteins

20 are also expressed so that infectivity of the particles is retained. Methods of generating peptide libraries and screening those libraries have been disclosed in many patents (e.g. U.S. Patent No. 5,723,286 U.S. Patent No. 5,432,018, U.S. Patent No. 5,580,717, U.S. Patent No. 5,427,908 and U.S. Patent No. 5,498,530).

Libraries of antibodies or antigen binding polypeptides have been prepared in a number of

25 ways including by altering a single gene by inserting random DNA sequences or by cloning a family of related genes. Methods for displaying antibodies or antigen binding fragments using phage(mid) display have been described in U.S. Patent Nos. 5,750,373, 5,733,743, 5,837,242, 5,969,108, 6,172,197, 5,580,717, and 5,658,727. The library is then screened for expression of antibodies or antigen binding proteins with the desired characteristics.

30 Methods of substituting an amino acid of choice into a template nucleic acid are well established in the art, some of which are described herein. For example, hypervariable region residues can be substituted using the Kunkel method. See, for example, Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154-367-382 (1987).

The sequence of oligonucleotides includes one or more of the designed codon sets for the

35 hypervariable region residues to be altered. A codon set is a set of different nucleotide triplet sequences used to encode desired variant amino acids. Codon sets can be represented using symbols to designate particular nucleotides or equimolar mixtures of nucleotides as shown in below

87 85

according to the IUB code.

IUB CODES

G Guanine

5 A Adenine

T Thymine

C Cytosine

R (A or G)

Y (C or T)

10 M (A or C)

K (G or T)

S (C or G)

W (A or T)

H (A or C or T)

15 B (C or G or T)

V (A or C or G)

D (A or G or T) H

N (A or C or G or T)

20 For example, in the codon set DVK, D can be nucleotides A or G or T. V can be A or G or C and K can be G or T. This codon set can present 18 different codons and can encode amino acids Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Gln, Gly, and Cys.

Oligonucleotide or primer sets can be synthesized using standard methods. A set of oligonucleotides can be synthesized, for example, by solid phase synthesis, containing sequences that represent all possible combinations of nucleotide triplets provided by the codon set and that will encode the desired group of amino acids. Synthesis of oligonucleotides with selected nucleotide "degeneracy" at certain positions is well known in that art. Such sets of nucleotides having certain codon sets can be synthesized using commercial nucleic acid synthesizers (available from, for example, Applied Biosystems, Foster City, CA), or can be obtained commercially (for example, from Life Technologies, Rockville, MD). Therefore, a set of oligonucleotides synthesized having a particular codon set will typically include a plurality of oligonucleotides with different sequences, the differences established by the codon set within the overall sequence. Oligonucleotides, as used according to the invention, have sequences that allow for hybridization to a variable domain nucleic acid template and also can include restriction enzyme sites for cloning purposes.

35 In one method, nucleic acid sequences encoding variant amino acids can be created by oligonucleotide-mediated mutagenesis. This technique is well known in the art as described by Zoller *et al. Nucleic Acids Res* 10:6487-6504(1987). Briefly, nucleic acid sequences encoding

variant amino acids are created by hybridizing an oligonucleotide set encoding the desired codon sets to a DNA template, where the template is the single-stranded form of the plasmid containing a variable region nucleic acid template sequence. After hybridization, DNA polymerase is used to synthesize an entire second complementary strand of the template that will thus incorporate the oligonucleotide primer, and will contain the codon sets as provided by the oligonucleotide set.

Generally, oligonucleotides of at least 25 nucleotides in length are used. An optimal oligonucleotide will have 12 to 15 nucleotides that are completely complementary to the template on either side of the nucleotide(s) coding for the mutation(s). This ensures that the oligonucleotide will hybridize properly to the single-stranded DNA template molecule. The oligonucleotides are readily synthesized using techniques known in the art such as that described by Crea et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978).

The DNA template is generated by those vectors that are either derived from bacteriophage M13 vectors (the commercially available M13mp18 and M13mp19 vectors are suitable), or those vectors that contain a single-stranded phage origin of replication as described by Viera et al., *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Thus, the DNA that is to be mutated can be inserted into one of these vectors in order to generate single-stranded template. Production of the single-stranded template is described in sections 4.21-4.41 of Sambrook et al., above.

To alter the native DNA sequence, the oligonucleotide is hybridized to the single stranded template under suitable hybridization conditions. A DNA polymerizing enzyme, usually T7 DNA polymerase or the Klenow fragment of DNA polymerase I, is then added to synthesize the complementary strand of the template using the oligonucleotide as a primer for synthesis. A heteroduplex molecule is thus formed such that one strand of DNA encodes the mutated form of gene 1, and the other strand (the original template) encodes the native, unaltered sequence of gene 1. This heteroduplex molecule is then transformed into a suitable host cell, usually a prokaryote such as *E. coli* JM101. After growing the cells, they are plated onto agarose plates and screened using the oligonucleotide primer radiolabelled with a 32-Phosphate to identify the bacterial colonies that contain the mutated DNA.

The method described immediately above may be modified such that a homoduplex molecule is created wherein both strands of the plasmid contain the mutation(s). The modifications are as follows. The single stranded oligonucleotide is annealed to the single-stranded template as described above. A mixture of three deoxynucleotides, deoxyriboadenosine (dATP), deoxyriboguanosine (dGTP) and deoxyribothymidine (dTTP) is combined with a modified thymodeoxyribocytosine called dCTP-(aS) (which can be obtained from Amersham). This mixture is added to the template-oligonucleotide complex. Upon addition of DNA polymerase to this mixture, a strand of DNA identical to the template except for the mutated bases is generated. In addition, this new strand of DNA will contain dCTP-(aS) instead of dCTP, which serves to protect it from restriction endonuclease digestion. After the template strand of the double-stranded heteroduplex is

nicked with an appropriate restriction enzyme, the template strand can be digested with ExoIII
nuclease or another appropriate nuclease past the region that contains the site(s) to be mutagenized.
The reaction is then stopped to leave a molecule that is only partially single-stranded. A complete
double-stranded DNA homoduplex is then formed using DNA polymerase in the presence of all four
3 deoxyribonucleotide triphosphates, ATP, and DNA ligase. This homoduplex molecule can then be
transformed into a suitable host cell.

As indicated previously the sequence of the oligonucleotide set is of sufficient length to
hybridize to the template nucleic acid and may also, but does not necessarily, contain restriction
sites. The DNA template can be generated by those vectors that are either derived from
10 bacteriophage M13 vectors or vectors that contain a single-stranded phage origin of replication as
described by Viera *et al. Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Thus, the DNA that is to be mutated must be
inserted into one of these vectors in order to generate single-stranded template. Production of the
single-stranded template is described in sections 4.21-4.41 of Sambrook *et al., supra*.

According to another method, a library can be generated by providing upstream and
15 downstream oligonucleotide sets, each set having a plurality of oligonucleotides with different
sequences, the different sequences established by the codon sets provided within the sequence of the
oligonucleotides. The upstream and downstream oligonucleotide sets, along with a variable domain
template nucleic acid sequence, can be used in a polymerase chain reaction to generate a "library" of
PCR products. The PCR products can be referred to as "nucleic acid cassettes" as they can be fused
20 with other related or unrelated nucleic acid sequences, for example, viral coat proteins and
dimerization domains, using established molecular biology techniques.

The sequence of the PCR primers includes one or more of the designed codon sets for the solvent
accessible and highly diverse positions in a hypervariable region. As described above, a codon set is a set
of different nucleotide triplet sequences used to encode desired variant amino acids.

25 Antibody selectants that meet the desired criteria, as selected through appropriate
screening/selection steps can be isolated and cloned using standard recombinant techniques.
Vectors, Host Cells and Recombinant Methods

For recombinant production of an antibody of the invention, the nucleic acid encoding it is
isolated and inserted into a replicable vector for further cloning (amplification of the DNA) or for
30 expression. DNA encoding the antibody is readily isolated and sequenced using conventional
procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes
encoding the heavy and light chains of the antibody). Many vectors are available. The choice of
vector depends in part on the host cell to be used. Generally, preferred host cells are of either
prokaryotic or eukaryotic (generally mammalian) origin.

35 Generating antibodies using prokaryotic host cells.

Vector Construction

Polynucleotide sequences encoding polypeptide components of the antibody of the

invention can be obtained using standard recombinant techniques. Desired polynucleotide sequences may be isolated and sequenced from antibody producing cells such as hybridoma cells. Alternatively, polynucleotides can be synthesized using nucleotide synthesizer or PCR techniques. Once obtained, sequences encoding the polypeptides are inserted into a recombinant vector capable of replicating and expressing heterologous polynucleotides in prokaryotic hosts. Many vectors that are available and known in the art can be used for the purpose of the present invention. Selection of an appropriate vector will depend mainly on the size of the nucleic acids to be inserted into the vector and the particular host cell to be transformed with the vector. Each vector contains various components depending on its function (amplification or expression of heterologous polynucleotide, or both) and its compatibility with the particular host cell in which it resides. The vector components generally include, but are not limited to: an origin of replication, a selection marker gene, a promoter, a ribosome binding site (RBS), a signal sequence, the heterologous nucleic acid insert and a transcription termination sequence.

In general, plasmid vectors containing replicon and control sequences which are derived from species compatible with the host cell are used in connection with these hosts. The vector ordinarily carries a replication site, as well as marking sequences which are capable of providing phenotypic selection in transformed cells. For example, *E. coli* is typically transformed using pBR322, a plasmid derived from an *E. coli* species. pBR322 contains genes encoding ampicillin (Amp) and tetracycline (Tet) resistance and thus provides easy means for identifying transformed cells. pBR322, its derivatives, or other microbial plasmids or bacteriophage may also contain or be modified to contain promoters which can be used by the microbial organism for expression of endogenous proteins. Examples of pBR322 derivatives used for expression of particular antibodies are described in detail in Carter et al., U.S. Patent No. 5,648,237.

In addition, phage vectors containing replicon and control sequences that are compatible with the host microorganism can be used as transforming vectors in connection with these hosts. For example, bacteriophage such as λ GEM.TM.-11 may be utilized in making a recombinant vector which can be used to transform susceptible host cells such as *E. coli* LE392.

The expression vector of the invention may comprise two or more promoter-cistron pairs, encoding each of the polypeptide components. A promoter is an untranslated regulatory sequence located upstream (5') to a cistron that modulates its expression. Prokaryotic promoters typically fall into two classes, inducible and constitutive. Inducible promoter is a promoter that initiates increased levels of transcription of the cistron under its control in response to changes in the culture condition, e.g. the presence or absence of a nutrient or a change in temperature.

A large number of promoters recognized by a variety of potential host cells are well known. The selected promoter can be operably linked to cistron DNA encoding the light or heavy chain by removing the promoter from the source DNA via restriction enzyme digestion and inserting the isolated promoter sequence into the vector of the invention. Both the native promoter sequence and

many heterologous promoters may be used to direct amplification and/or expression of the target genes. In some embodiments, heterologous promoters are utilized, as they generally permit greater transcription and higher yields of expressed target gene as compared to the native target polypeptide promoter.

Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the *PhoA* promoter, the β -galactamase and lactose promoter systems, a tryptophan (*trp*) promoter system and hybrid promoters such as the *tac* or the *trc* promoter. However, other promoters that are functional in bacteria (such as other known bacterial or phage promoters) are suitable as well. Their nucleotide sequences have been published, thereby enabling a skilled worker operably to ligate them to cistrons encoding the target light and heavy chains (Siebenlist et al. (1980) Cell 20:269) using linkers or adaptors to supply any required restriction sites.

In one aspect of the invention, each cistron within the recombinant vector comprises a secretion signal sequence component that directs translocation of the expressed polypeptides across a membrane. In general, the signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of the target polypeptide DNA that is inserted into the vector. The signal sequence selected for the purpose of this invention should be one that is recognized and processed (i.e. cleaved by a signal peptidase) by the host cell. For prokaryotic host cells that do not recognize and process the signal sequences native to the heterologous polypeptides, the signal sequence is substituted by a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group consisting of the alkaline phosphatase, penicillinase, *lpp*, or heat-stable enterotoxin II (STII) leaders, *LamB*, *PhoB*, *PeIB*, *OmpA* and *MBP*. In one embodiment of the invention, the signal sequences used in both cistrons of the expression system are STII signal sequences or variants thereof.

In another aspect, the production of the immunoglobulins according to the invention can occur in the cytoplasm of the host cell, and therefore does not require the presence of secretion signal sequences within each cistron. In that regard, immunoglobulin light and heavy chains are expressed, folded and assembled to form functional immunoglobulins within the cytoplasm. Certain host strains (e.g., the *E. coli* *trxB* strains) provide cytoplasm conditions that are favorable for disulfide bond formation, thereby permitting proper folding and assembly of expressed protein subunits. Proba and Pluckhun *Gene*, 159:203 (1995).

The present invention provides an expression system in which the quantitative ratio of expressed polypeptide components can be modulated in order to maximize the yield of secreted and properly assembled antibodies of the invention. Such modulation is accomplished at least in part by simultaneously modulating translational strengths for the polypeptide components.

One technique for modulating translational strength is disclosed in Simmons et al., U.S. Pat. No. 5,840,523. It utilizes variants of the translational initiation region (TIR) within a cistron. For a given TIR, a series of amino acid or nucleic acid sequence variants can be created with a range of translational strengths, thereby providing a convenient means by which to adjust this factor for the

aw

desired expression level of the specific chain. TIR variants can be generated by conventional mutagenesis techniques that result in codon changes which can alter the amino acid sequence, although silent changes in the nucleotide sequence are preferred. Alterations in the TIR can include, for example, alterations in the number or spacing of Shine-Dalgarno sequences along with
5 alterations in the signal sequence. One method for generating mutant signal sequences is the generation of a "codon bank" at the beginning of a coding sequence that does not change the amino acid sequence of the signal sequence (i.e., the changes are silent). This can be accomplished by changing the third nucleotide position of each codon. Additionally, some amino acids, such as leucine, serine, and arginine, have multiple first and second positions that can add complexity in
10 making the bank. This method of mutagenesis is described in detail in Yansura et al. (1992)

METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4: 151-158

Preferably, a set of vectors is generated with a range of TIR strengths for each cistron therein. This limited set provides a comparison of expression levels of each chain as well as the yield of the desired antibody products under various TIR strength combinations. TIR strengths can
15 be determined by quantifying the expression level of a reporter gene as described in detail in Simmons et al. U.S. Pat. No. 5,840,523. Based on the translational strength comparison, the desired individual TIRs are selected to be combined in the expression vector constructs of the invention.

Prokaryotic host cells suitable for expressing antibodies of the invention include Archaeobacteria and Eubacteria, such as Gram-negative or Gram-positive organisms. Examples of
20 useful bacteria include *Escherichia* (e.g., *E. coli*), *Bacilli* (e.g., *B. subtilis*), *Enterobacteria*, *Pseudomonas* species (e.g., *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, or *Paracoccus*. In one embodiment, gram-negative cells are used. In one embodiment, *E. coli* cells are used as hosts for the invention. Examples of *E. coli* strains include strain W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol
25 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC Deposit No. 27,325) and derivatives thereof, including strain 33D3 having genotype W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) $ptr3$ $lacIq$ $lacLB$ $\Delta ompT$ $\Delta (nmpc-fupE)$ $degP41$ kan^r (U.S. Pat. No. 5,639,635). Other strains and derivatives thereof, such as *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31,537) and *E. coli* RV308 (ATCC 31,608) are also suitable. These examples are illustrative rather than limiting.
30 Methods for constructing derivatives of any of the above-mentioned bacteria having defined genotypes are known in the art and described in, for example, Bass et al., *Proteins*, 3:309-314 (1990). It is generally necessary to select the appropriate bacteria taking into consideration replicability of the replicon in the cells of a bacterium. For example, *E. coli*, *Serratia*, or *Salmonella* species can be suitably used as the host when well known plasmids such as pBR322, pBR325
35 pACYC177, or pKN410 are used to supply the replicon. Typically the host cell should secrete minimal amounts of proteolytic enzymes, and additional protease inhibitors may desirably be incorporated in the cell culture.

Antibody Production

Host cells are transformed with the above-described expression vectors and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences

Transformation means introducing DNA into the prokaryotic host so that the DNA is replicable, either as an extrachromosomal element or by chromosomal integrant. Depending on the host cell used, transformation is done using standard techniques appropriate to such cells. The calcium treatment employing calcium chloride is generally used for bacterial cells that contain substantial cell-wall barriers. Another method for transformation employs polyethylene glycol/DMSO. Yet another technique used is electroporation.

Prokaryotic cells used to produce the polypeptides of the invention are grown in media known in the art and suitable for culture of the selected host cells. Examples of suitable media include luria broth (LB) plus necessary nutrient supplements. In some embodiments, the media also contains a selection agent, chosen based on the construction of the expression vector, to selectively permit growth of prokaryotic cells containing the expression vector. For example, ampicillin is added to media for growth of cells expressing ampicillin resistant genes.

Any necessary supplements besides carbon, nitrogen, and inorganic phosphate sources may also be included at appropriate concentrations introduced alone or as a mixture with another supplement or medium such as a complex nitrogen source. Optionally the culture medium may contain one or more reducing agents selected from the group consisting of glutathione, cysteine, cystamine, thioglycollate, dithioerythritol and dithiothreitol.

The prokaryotic host cells are cultured at suitable temperatures. For *E. coli* growth, for example, the preferred temperature ranges from about 20°C to about 39°C, more preferably from about 25°C to about 37°C, even more preferably at about 30°C. The pH of the medium may be any pH ranging from about 5 to about 9, depending mainly on the host organism. For *E. coli*, the pH is preferably from about 6.8 to about 7.4, and more preferably about 7.0.

If an inducible promoter is used in the expression vector of the invention, protein expression is induced under conditions suitable for the activation of the promoter. In one aspect of the invention, PhoA promoters are used for controlling transcription of the polypeptides. Accordingly, the transformed host cells are cultured in a phosphate-limiting medium for induction. Preferably, the phosphate-limiting medium is the C.R.A.P. medium (see, for example, Simmons et al., *J Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). A variety of other inducers may be used, according to the vector construct employed, as is known in the art.

In one embodiment, the expressed polypeptides of the present invention are secreted into and recovered from the periplasm of the host cells. Protein recovery typically involves disrupting the microorganism, generally by such means as osmotic shock, sonication or lysis. Once cells are disrupted, cell debris or whole cells may be removed by centrifugation or filtration. The proteins

a2

may be further purified, for example, by affinity resin chromatography. Alternatively, proteins can be transported into the culture media and isolated therein. Cells may be removed from the culture and the culture supernatant being filtered and concentrated for further purification of the proteins produced. The expressed polypeptides can be further isolated and identified using commonly
5 known methods such as polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and Western blot assay.

In one aspect of the invention, antibody production is conducted in large quantity by a fermentation process. Various large-scale fed-batch fermentation procedures are available for production of recombinant proteins. Large-scale fermentations have at least 1000 liters of capacity, preferably about 1 000 to 100,000 liters of capacity. These fermentors use agitator impellers to
10 distribute oxygen and nutrients, especially glucose (the preferred carbon/energy source). Small scale fermentation refers generally to fermentation in a fermentor that is no more than approximately 100 liters in volumetric capacity, and can range from about 1 liter to about 100 liters.

In a fermentation process, induction of protein expression is typically initiated after the cells have been grown under suitable conditions to a desired density, e.g., an OD₅₅₀ of about 180-220, at
15 which stage the cells are in the early stationary phase. A variety of inducers may be used, according to the vector construct employed, as is known in the art and described above. Cells may be grown for shorter periods prior to induction. Cells are usually induced for about 12-50 hours, although longer or shorter induction time may be used.

To improve the production yield and quality of the polypeptides of the invention, various
20 fermentation conditions can be modified. For example, to improve the proper assembly and folding of the secreted antibody polypeptides, additional vectors overexpressing chaperone proteins, such as Dsb proteins (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD and or DsbG) or FkpA (a peptidylprolyl cis,trans-isomerase with chaperone activity) can be used to co-transform the host prokaryotic cells. The chaperone proteins have been demonstrated to facilitate the proper folding and solubility of
25 heterologous proteins produced in bacterial host cells. Chen et al. (1999) *J Bio Chem* 274 19601-19605, Georgiou et al., U.S. Patent No. 6,083,715, Georgiou et al., U.S. Patent No. 6,027,888, Bothmann and Pluckthun (2000) *J Biol. Chem.* 275 17100-17105, Ramm and Pluckthun (2000) *J Biol. Chem.* 275 17106-17113, Aris et al. (2001) *Mol. Microbiol.* 39 199-210.

To minimize proteolysis of expressed heterologous proteins (especially those that are
30 proteolytically sensitive), certain host strains deficient for proteolytic enzymes can be used for the present invention. For example, host cell strains may be modified to effect genetic mutation(s) in the genes encoding known bacterial proteases such as Protease III, OmpT, DegP, Tsp, Protease I, Protease M1, Protease V, Protease VI and combinations thereof. Some *E. coli* protease-deficient strains are available and described in, for example, Joly et al. (1998), *supra*; Georgiou et al., U.S.
35 Patent No. 5,264,365, Georgiou et al., U.S. Patent No. 5,508,192, Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2 63-72 (1996).

In one embodiment, *E. coli* strains deficient for proteolytic enzymes and transformed with

ces

93

WO 2006/026759

PCT/US2005/031401

plasmids overexpressing one or more chaperone proteins are used as host cells in the expression system of the invention

Antibody Purification

5 In one embodiment, the antibody protein produced herein is further purified to obtain preparations that are substantially homogeneous for further assays and uses. Standard protein purification methods known in the art can be employed. The following procedures are exemplary of suitable purification procedures: fractionation on immunoaffinity or ion-exchange columns, ethanol precipitation, reverse phase HPLC, chromatography on silica or on a cation-exchange resin such as DEAE, chromatofocusing, SDS-PAGE, ammonium sulfate precipitation, and gel filtration using, for
10 example, Sephadex G-75

In one aspect, Protein A immobilized on a solid phase is used for immunoaffinity purification of the full length antibody products of the invention. Protein A is a 41kD cell wall protein from *Staphylococcus aureus* which binds with a high affinity to the Fc region of antibodies. Lundmark et al (1983) *J Immunol. Meth.* 62.1-13. The solid phase to which Protein A is
15 immobilized is preferably a column comprising a glass or silica surface, more preferably a controlled pore glass column or a silicic acid column. In some applications, the column has been coated with a reagent, such as glycerol, in an attempt to prevent nonspecific adherence of contaminants

As the first step of purification, the preparation derived from the cell culture as described above is applied onto the Protein A immobilized solid phase to allow specific binding of the
20 antibody of interest to Protein A. The solid phase is then washed to remove contaminants non-specifically bound to the solid phase. Finally the antibody of interest is recovered from the solid phase by elution

Generating antibodies using eukaryotic host cells.

25 The vector components generally include, but are not limited to, one or more of the following: a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter and a transcription termination sequence.

(i) Signal sequence component

A vector for use in a eukaryotic host cell may also contain a signal sequence or other
30 polypeptide having a specific cleavage site at the N-terminus of the mature protein or polypeptide of interest. The heterologous signal sequence selected preferably is one that is recognized and processed (*i.e.*, cleaved by a signal peptidase) by the host cell. In mammalian cell expression, mammalian signal sequences as well as viral secretory leaders, for example, the herpes simplex gD signal, are available.

35 The DNA for such precursor region is ligated in reading frame to DNA encoding the antibody

(ii) Origin of replication

Ch

94

Generally, an origin of replication component is not needed for mammalian expression vectors. For example, the SV40 origin may typically be used only because it contains the early promoter.

(iii) Selection gene component

Expression and cloning vectors may contain a selection gene, also termed a selectable marker. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies, where relevant, or (c) supply critical nutrients not available from complex media.

One example of a selection scheme utilizes a drug to arrest growth of a host cell. Those cells that are successfully transformed with a heterologous gene produce a protein conferring drug resistance and thus survive the selection regimen. Examples of such dominant selection use the drugs neomycin, mycophenolic acid and hygromycin.

Another example of suitable selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells competent to take up the antibody nucleic acid, such as DHFR, thymidine kinase, metallothionein I and -II, preferably primate metallothionein genes, adenosine deaminase, ornithine decarboxylase, etc.

For example, cells transformed with the DHFR selection gene are first identified by culturing all of the transformants in a culture medium that contains methotrexate (Mtx), a competitive antagonist of DHFR. An appropriate host cell when wild-type DHFR is employed is the Chinese hamster ovary (CHO) cell line deficient in DHFR activity (e.g., ATCC CRL-9096).

Alternatively, host cells (particularly wild-type hosts that contain endogenous DHFR) transformed or co-transformed with DNA sequences encoding an antibody, wild-type DHFR protein, and another selectable marker such as aminoglycoside 3'-phosphotransferase (APH) can be selected by cell growth in medium containing a selection agent for the selectable marker such as an aminoglycosidic antibiotic, e.g., kanamycin, neomycin, or G418. See U.S. Patent No. 4,965,199.

(iv) Promoter component

Expression and cloning vectors usually contain a promoter that is recognized by the host organism and is operably linked to the antibody polypeptide nucleic acid. Promoter sequences are known for eukaryotes. Virtually all eukaryotic genes have an AT-rich region located approximately 25 to 30 bases upstream from the site where transcription is initiated. Another sequence found 70 to 80 bases upstream from the start of transcription of many genes is a CCAAT region where N may be any nucleotide. At the 3' end of most eukaryotic genes is an AATAAA sequence that may be the signal for addition of the poly A tail to the 3' end of the coding sequence. All of these sequences are suitably inserted into eukaryotic expression vectors.

Antibody polypeptide transcription from vectors in mammalian host cells is controlled, for example, by promoters obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus, adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, a

retrovirus, hepatitis-B virus and Simian Virus 40 (SV40), from heterologous mammalian promoters, e.g., the actin promoter or an immunoglobulin promoter, from heat-shock promoters provided such promoters are compatible with the host cell systems

The early and late promoters of the SV40 virus are conveniently obtained as an SV40 restriction fragment that also contains the SV40 viral origin of replication. The immediate early promoter of the human cytomegalovirus is conveniently obtained as a HindIII E restriction fragment. A system for expressing DNA in mammalian hosts using the bovine papilloma virus as a vector is disclosed in U.S. Patent No. 4,419,446. A modification of this system is described in U.S. Patent No. 4,601,978. See also Reyes *et al.*, *Nature* 297 598-601 (1982) on expression of human β -interferon cDNA in mouse cells under the control of a thymidine kinase promoter from herpes simplex virus. Alternatively, the Rous Sarcoma Virus long terminal repeat can be used as the promoter

(v) *Enhancer element component*

Transcription of DNA encoding the antibody polypeptide of this invention by higher eukaryotes is often increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Many enhancer sequences are now known from mammalian genes (globin, elastase, albumin, α -fetoprotein, and insulin). Typically, however, one will use an enhancer from a eukaryotic cell virus. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100-270), the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers. See also Yaniv, *Nature* 297 17-18 (1982) on enhancing elements for activation of eukaryotic promoters. The enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to the antibody polypeptide-encoding sequence, but is preferably located at a site 5' from the promoter

(vi) *Transcription termination component*

Expression vectors used in eukaryotic host cells will typically also contain sequences necessary for the termination of transcription and for stabilizing the mRNA. Such sequences are commonly available from the 5' and occasionally 3', untranslated regions of eukaryotic or viral DNAs or cDNAs. These regions contain nucleotide segments transcribed as polyadenylated fragments in the untranslated portion of the mRNA encoding an antibody. One useful transcription termination component is the bovine growth hormone polyadenylation region. See WO94/11026 and the expression vector disclosed therein.

(vii) *Selection and transformation of host cells*

Suitable host cells for cloning or expressing the DNA in the vectors herein include higher eukaryote cells described herein, including vertebrate host cells. Propagation of vertebrate cells in culture (tissue culture) has become a routine procedure. Examples of useful mammalian host cell lines are monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), human embryonic kidney line (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, Graham *et al.*,

af

96

J Gen Virol 36 59 (1977)), baby hamster kidney cells (BHK, ATCC CCL 10) Chinese hamster ovary cells/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4216 (1980)), mouse sertoli cells (TM4, Mather, *Biol Reprod* 23 243-251 (1980)), monkey kidney cells (CV1 ATCC CCL 70), African green monkey kidney cells (VERO-76, ATCC CRL-1587), human cervical carcinoma cells (HELA, ATCC CCL 2), canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL 34), buffalo rat liver cells (BRL 3A, ATCC CRL 1442), human lung cells (W138, ATCC CCL 75), human liver cells (Hep G2, HB 8065), mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL51) TRI cells (Mather *et al. Annals N Y Acad Sci* 383:44-68 (1982)), MRC 5 cells, FS4 cells, and a human hepatoma line (Hep G2)

Host cells are transformed with the above-described expression or cloning vectors for antibody production and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences

(viii) Culturing the host cells

The host cells used to produce an antibody of this invention may be cultured in a variety of media. Commercially available media such as Ham's F10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), and Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) are suitable for culturing the host cells. In addition, any of the media described in Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), U.S. Pat. Nos. 4,767,704, 4,657,866, 4,927,762, 4,560,655, or 5,122,469, WO 90/03430; WO 87/00195 or U.S. Patent Re. 30,985 may be used as culture media for the host cells. Any of these media may be supplemented as necessary with hormones and/or other growth factors (such as insulin, transferrin, or epidermal growth factor), salts (such as sodium chloride, calcium, magnesium, and phosphate), buffers (such as HEPES), nucleotides (such as adenosine and thymidine), antibiotics (such as GENTAMYCIN™ drug), trace elements (defined as inorganic compounds usually present at final concentrations in the micromolar range), and glucose or an equivalent energy source. Any other necessary supplements may also be included at appropriate concentrations that would be known to those skilled in the art. The culture conditions, such as temperature, pH, and the like, are those previously used with the host cell selected for expression, and will be apparent to the ordinarily skilled artisan.

(ix) Purification of antibody

When using recombinant techniques, the antibody can be produced intracellularly, or directly secreted into the medium. If the antibody is produced intracellularly, as a first step, the particulate debris, either host cells or lysed fragments are removed, for example, by centrifugation or ultrafiltration. Where the antibody is secreted into the medium, supernatants from such expression systems are generally first concentrated using a commercially available protein concentration filter, for example, an Amicon or Millipore Pellicon ultrafiltration unit. A protease

inhibitor such as PMSF may be included in any of the foregoing steps to inhibit proteolysis and antibiotics may be included to prevent the growth of adventitious contaminants

The antibody composition prepared from the cells can be purified using, for example, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, and affinity chromatography with affinity chromatography being the preferred purification technique. The suitability of protein A as an affinity ligand depends on the species and isotype of any immunoglobulin Fc domain that is present in the antibody. Protein A can be used to purify antibodies that are based on human $\gamma 1$, $\gamma 2$, or $\gamma 4$ heavy chains (Landmark *et al.* *J Immunol. Meth.* 62 1-13 (1983)). Protein G is recommended for all mouse isotypes and for human $\gamma 3$ (Guss *et al.* *EMBO J* 5 1567-1575 (1986)). The matrix to which the affinity ligand is attached is most often agarose, but other matrices are available. Mechanically stable matrices such as controlled pore glass or poly(styrene-divinyl)benzene allow for faster flow rates and shorter processing times than can be achieved with agarose. Where the antibody comprises a C₂3 domain, the Bactabond ABX™ resin (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) is useful for purification. Other techniques for protein purification such as fractionation on an ion-exchange column, ethanol precipitation, Reverse Phase HPLC, chromatography on silica, chromatography on heparin SEPHAROSE™, chromatography on an anion or cation exchange resin (such as a polyaspartic acid column), chromatofocusing, SDS-PAGE, and ammonium sulfate precipitation are also available depending on the antibody to be recovered.

Following any preliminary purification step(s), the mixture comprising the antibody of interest and contaminants may be subjected to low pH hydrophobic interaction chromatography using an elution buffer at a pH between about 2.5-4.5, preferably performed at low salt concentrations (e.g., from about 0-0.25M salt).

Activity Assays

The antibodies of the present invention can be characterized for their physical/chemical properties and biological functions by various assays known in the art.

The purified immunoglobulins can be further characterized by a series of assays including, but not limited to, N-terminal sequencing, amino acid analysis, non-denaturing size exclusion high pressure liquid chromatography (HPLC), mass spectrometry, ion exchange chromatography and papain digestion.

In certain embodiments of the invention, the immunoglobulins produced herein are analyzed for their biological activity. In some embodiments, the immunoglobulins of the present invention are tested for their antigen binding activity. The antigen binding assays that are known in the art and can be used herein include without limitation any direct or competitive binding assays using techniques such as western blots, radioimmunoassays, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoprecipitation assays, fluorescent immunoassays, and protein A immunoassays. An illustrative antigen binding assay is provided below in the Examples section.

92

In one embodiment, the present invention contemplates an altered antibody that possesses some but not all effector functions, which make it a desired candidate for many applications in which the half life of the antibody *in vivo* is important yet certain effector functions (such as complement and ADCC) are unnecessary or deleterious. In certain embodiments, the Fc activities of the produced immunoglobulin are measured to ensure that only the desired properties are maintained. *In vitro* and/or *in vivo* cytotoxicity assays can be conducted to confirm the reduction/depletion of CDC and/or ADCC activities. For example, Fc receptor (FcR) binding assays can be conducted to ensure that the antibody lacks FcγR binding (hence likely lacking ADCC activity), but retains FcRn binding ability. The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express FcγRIII only whereas monocytes express FcγRI, FcγRII and FcγRIII. FcR expression on hematopoietic cells is summarized in Table 3 on page 464 of Ravetch and Kinet, *Annu. Rev Immunol* 9:457-92 (1991). An example of an *in vitro* assay to assess ADCC activity of a molecule of interest is described in US Patent No. 5,500,362 or 5,821,337. Useful effector cells for such assays include peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Natural Killer (NK) cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecule of interest may be assessed *in vivo*, e.g., in a animal model such as that disclosed in Clynes *et al.* *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998). C1q binding assays may also be carried out to confirm that the antibody is unable to bind C1q and hence lacks CDC activity. To assess complement activation, a CDC assay, for example as described in Gazzano-Santoro *et al.*, *J Immunol. Methods* 202:163 (1996), may be performed. FcRn binding and *in vivo* clearance/half life determinations can also be performed using methods known in the art, for example those described in the Examples section.

Humanized Antibodies

The present invention encompasses humanized antibodies. Various methods for humanizing non-human antibodies are known in the art. For example, a humanized antibody can have one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers (Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525, Reichmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327, Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536), by substituting hypervariable region sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567) wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some hypervariable region residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

The choice of human variable domains, both light and heavy, to be used in making the humanized antibodies is very important to reduce antigenicity. According to the so-called "best-fit"

method, the sequence of the variable domain of a rodent antibody is screened against the entire library of known human variable-domain sequences. The human sequence which is closest to that of the rodent is then accepted as the human framework for the humanized antibody (Sims *et al.* (1993) *J Immunol.* 151:2296, Chothia *et al.* (1987) *J Mol. Biol.* 196:901. Another method uses a particular framework derived from the consensus sequence of all human antibodies of a particular subgroup of light or heavy chains. The same framework may be used for several different humanized antibodies (Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285, Presta *et al.* (1993) *J Immunol.*, 151:2623

It is further important that antibodies be humanized with retention of high affinity for the antigen and other favorable biological properties. To achieve this goal, according to one method, humanized antibodies are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three-dimensional models of the parental and humanized sequences. Three-dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, *i.e.*, the analysis of residues that influence the ability of the candidate immunoglobulin to bind its antigen. In this way FR residues can be selected and combined from the recipient and import sequences so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for the target antigen(s), is achieved. In general, the hypervariable region residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding.

Antibody Variants

In one aspect, the invention provides antibody fragment comprising modifications in the interface of Fc polypeptides comprising the Fc region, wherein the modifications facilitate and/or promote heterodimerization. These modifications comprise introduction of a protuberance into a first Fc polypeptide and a cavity into a second Fc polypeptide, wherein the protuberance is positionable in the cavity so as to promote complexing of the first and second Fc polypeptides. Methods of generating antibodies with these modifications are known in the art, for example, as described in U.S. Pat. No. 5,731,168.

In some embodiments, amino acid sequence modification(s) of the antibodies described herein are contemplated. For example, it may be desirable to improve the binding affinity and/or other biological properties of the antibody. Amino acid sequence variants of the antibody are prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the antibody nucleic acid or by peptide synthesis. Such modifications include, for example, deletions from, and/or insertions into and/or substitutions of, residues within the amino acid sequences of the antibody. Any combination of deletion, insertion, and substitution is made to arrive at the final construct, provided that the final construct possesses the desired characteristics. The amino acid alterations may be introduced in the

100

subject antibody amino acid sequence at the time that sequence is made

A useful method for identification of certain residues or regions of the antibody that are preferred locations for mutagenesis is called "alanine scanning mutagenesis" as described by Cunningham and Wells (1989) *Science* 244 1081 1085. Here, a residue or group of target residues are identified (e.g., charged residues such as arg, asp, his, lys, and glu) and replaced by a neutral or negatively charged amino acid (most preferably alanine or polyalanine) to affect the interaction of the amino acids with antigen. These amino acid locations demonstrating functional sensitivity to the substitutions then are refined by introducing further or other variants at, or for the sites of substitution. Thus, while the site for introducing an amino acid sequence variation is predetermined, the nature of the mutation *per se* need not be predetermined. For example, to analyze the performance of a mutation at a given site, ala scanning or random mutagenesis is conducted at the target codon or region and the expressed immunoglobulins are screened for the desired activity.

Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include an antibody with an N-terminal methionyl residue or the antibody fused to a cytotoxic polypeptide. Other insertional variants of the antibody molecule include the fusion to the N- or C-terminus of the antibody to an enzyme (e.g. for ADEPT) or a polypeptide which increases the serum half-life of the antibody.

Another type of variant is an amino acid substitution variant. These variants have at least one amino acid residue in the antibody molecule replaced by a different residue. The sites of greatest interest for substitutional mutagenesis include the hypervariable regions, but FR alterations are also contemplated. Conservative substitutions are shown in Table 2 under the heading of "preferred substitutions". If such substitutions result in a change in biological activity then more substantial changes, denominated "exemplary substitutions" in Table 2, or as further described below in reference to amino acid classes, may be introduced and the products screened.

TABLE 2

Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
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

101

Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
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
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

Substantial modifications in the biological properties of the antibody are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation
 (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain
 Amino acids may be grouped according to similarities in the properties of their side chains (in A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975))

- (1) non-polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) uncharged polar: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) acidic: Asp (D), Glu (E)
- (4) basic: Lys (K), Arg (R), His (H)

Alternatively, naturally occurring residues may be divided into groups based on common side-chain properties

- (1) hydrophobic: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile,
- (2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln,
- (3) acidic: Asp, Glu,
- (4) basic: His, Lys, Arg,
- (5) residues that influence chain orientation: Gly, Pro;
- (6) aromatic: Trp, Tyr, Phe.

102

102

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class. Such substituted residues also may be introduced into the conservative substitution sites or, more preferably, into the remaining (non-conserved) sites.

One type of substitutional variant involves substituting one or more hypervariable region residues of a parent antibody (e.g. a humanized or human antibody). Generally, the resulting variant(s) selected for further development will have improved biological properties relative to the parent antibody from which they are generated. A convenient way for generating such substitutional variants involves affinity maturation using phage display. Briefly, several hypervariable region sites (e.g. 6-7 sites) are mutated to generate all possible amino acid substitutions at each site. The antibodies thus generated are displayed from filamentous phage particles as fusions to the gene III product of M13 packaged within each particle. The phage-displayed variants are then screened for their biological activity (e.g. binding affinity) as herein disclosed. In order to identify candidate hypervariable region sites for modification, alanine scanning mutagenesis can be performed to identify hypervariable region residues contributing significantly to antigen binding. Alternatively, or additionally, it may be beneficial to analyze a crystal structure of the antigen-antibody complex to identify contact points between the antibody and antigen. Such contact residues and neighboring residues are candidates for substitution according to the techniques elaborated herein. Once such variants are generated, the panel of variants is subjected to screening as described herein and antibodies with superior properties in one or more relevant assays may be selected for further development.

Nucleic acid molecules encoding amino acid sequence variants of the antibody are prepared by a variety of methods known in the art. These methods include, but are not limited to, isolation from a natural source (in the case of naturally occurring amino acid sequence variants) or preparation by oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis, and cassette mutagenesis of an earlier prepared variant or a non-variant version of the antibody.

It may be desirable to introduce one or more amino acid modifications in an Fc region of the immunoglobulin polypeptides of the invention, thereby generating a Fc region variant. The Fc region variant may comprise a human Fc region sequence (e.g., a human IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4 Fc region) comprising an amino acid modification (e.g. a substitution) at one or more amino acid positions including that of a hinge system.

In accordance with this description and the teachings of the art, it is contemplated that in some embodiments, an antibody used in methods of the invention may comprise one or more alterations as compared to the wild type counterpart antibody, for example in the Fc region. These antibodies would nonetheless retain substantially the same characteristics required for therapeutic utility as compared to their wild type counterpart. For example, it is thought that certain alterations can be made in the Fc region that would result in altered (i.e., either improved or diminished) C1q binding and/or Complement Dependent Cytotoxicity (CDC), for example, as described in

WO99/51642. See also Duncan & Winter *Nature* 322:738-40 (1988), US Patent No. 5,648,260; US Patent No. 5,624,821, and WO94/29351 concerning other examples of Fc region variants

Immunocjugates

The invention also pertains to immunocjugates, or antibody-drug conjugates (ADC), comprising
 5 an antibody conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, a drug, a growth inhibitory agent, a toxin (e.g., an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (i.e., a radiocjugate)

The use of antibody-drug conjugates for the local delivery of cytotoxic or cytostatic agents, i.e., drugs to kill or inhibit tumor cells in the treatment of cancer (Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614, Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drug Del. Rev.* 26:151-172, U.S. patent 4,975,278) theoretically allows targeted delivery of the drug moiety to tumors, and intracellular accumulation therein, where systemic administration of these unconjugated drug agents may result in unacceptable levels of toxicity to normal cells as well as the tumor cells sought to be eliminated (Baldwin et al., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986) 603-05, Thorpe, (1985) "Antibody
 10 Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506). Maximal efficacy with minimal toxicity is sought thereby. Both polyclonal antibodies and monoclonal antibodies have been reported as useful in these strategies (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Drugs used in these methods include daunomycin, doxorubicin, methotrexate, and
 20 vindesine (Rowland et al., (1986) *supra*). Toxins used in antibody-toxin conjugates include bacterial toxins such as diphtheria toxin, plant toxins such as ricin, small molecule toxins such as geldanamycin (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), maytansinoids (EP 1391213, Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), and calicheamicin (Lode et al. (1998) *Cancer Res.* 58:2928, Hinman et al. (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). The toxins may effect their cytotoxic and cytostatic effects by mechanisms including tubulin binding, DNA binding, or topoisomerase inhibition. Some cytotoxic drugs tend to be inactive or less active when conjugated to large antibodies or protein receptor ligands.

ZEVALIN® (ibritumomab thiocyanate, Biogen/Idex) is an antibody-radioisotope conjugate
 30 composed of a murine IgG1 kappa monoclonal antibody directed against the CD20 antigen found on the surface of normal and malignant B lymphocytes and ¹¹¹In or ⁹⁰Y radioisotope bound by a thiourea linker-chelator (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). Although ZEVALIN has activity against B-cell non-
 35 Hodgkin's Lymphoma (NHL), administration results in severe and prolonged cytopenias in most patients. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), an antibody drug conjugate composed of a hu CD33 antibody linked to calicheamicin, was approved in 2000 for the

104

treatment of acute myeloid leukemia by injection (Drugs of the Future (2000) 25(7):686, US Patent Nos. 4970198, 5079233, 5585089, 5606040, 5693762, 5739116, 5767285, 5773001) Cantuzumab mertansine (Immunogen, Inc.), an antibody drug conjugate composed of the huC242 antibody linked via the disulfide linker SPP to the maytansinoid drug moiety, DM1, is advancing into Phase II trials for the treatment of cancers that express CanAg, such as colon, pancreatic, gastric, and others. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologicals, Immunogen Inc.), an antibody drug conjugate composed of an anti-prostate specific membrane antigen (PSMA) monoclonal antibody linked to the maytansinoid drug moiety, DM1, is under development for the potential treatment of prostate tumors. The auristatin peptides, auristatin E (AE), monomethylauristatin E (MMAE), and synthetic analogs of dolastatin, were conjugated to chimeric monoclonal antibodies cBR96 (specific to Lewis Y on carcinomas) and cAC10 (specific to CD30 on hematological malignancies) (Doronina et al. (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784 and Francisco, et al. (2003) Blood, 102, 1458-1465) and are under therapeutic development. Other compounds for use as drug conjugate cytotoxic agents include without limitation auristatin E (AE), MMAF (a variant of auristatin E (MMAE) with a phenylalanine at the C-terminus of the drug), and AEVB (auristatin E valeryl benzylhydrazone, an acid labile linker through the C-terminus of AE). Useful conjugate linkers for attaching a drug to an antibody include without limitation MC (maleimidocaproyl), Val Cit (valine-citrulline, dipeptide site in protease cleavable linker), Citrulline (2-amino-5 ureido pentanoic acid), PAB (p-aminobenzylcarbamoyl, a "self immolative" portion of linker), Me (N-methyl valine citrulline where the linker peptide bond has been modified to prevent its cleavage by cathepsin B), MC(PEG)6-OH (maleimidocaproyl- polyethylene glycol, attached to antibody cysteines), SPP (N-Succinimidyl 4-(2-pyridylthio) pentanoate), and SMCC (N-Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1 carboxylate). These and other useful drug conjugates and their preparation are disclosed, for example, in Doronina, S O et al., Nature Biotechnology 21 778-794 (2003), incorporated herein by reference in its entirety. Particularly preferred linker molecules include, for example, N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) (see, e.g., Carlsson et al., Biochem. J., 173, 723-737 (1978)), N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)butanoate (SPDB) (see, e.g., U.S. Pat. No. 4,563,304), N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoate (SPP) (see, e.g., CAS Registry number 341498-08-6), N-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) (see, e.g., Yoshitake et al., Eur. J. Biochem., 101, 395-399 (1979)), and N-succinimidyl 4-methyl-4-[2-(5-nitro-pyridyl)-dithio]pentanoate (SMNP) (see, e.g., U.S. Pat. No. 4,563,304).

Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunoconjugates have been described above. Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, *Aleurites fordii* proteins, dianthin proteins, *Phytolacca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S),

105

momordica charantia inhibitor, curcun, crocin, saponaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , and ^{186}Re . Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein-coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexamethylenediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as toluene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vietta *et al.*, *Science*, 238, 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methylmaleimide triaminopentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionuclide to the antibody. See WO94/11026.

Conjugates of an antibody and one or more small molecule toxins, such as a calicheamicin, maytansinoids, a tricothecene, and CC1065 and the derivatives of these toxins that have toxin activity, are also contemplated herein.

Maytansine and maytansinoids

In one embodiment, an antibody (full length or fragments) of the invention is conjugated to one or more maytansinoid molecules.

Maytansinoids are mitototic inhibitors which act by inhibiting tubulin polymerization. Maytansine was first isolated from the east African shrub *Maytenus serrata* (U.S. Patent No. 3,896,111). Subsequently, it was discovered that certain microbes also produce maytansinoids, such as maytansinol and C-3 maytansinol esters (U.S. Patent No. 4,151,042). Synthetic maytansinol and derivatives and analogues thereof are disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 4,137,230, 4,248,870, 4,256,746, 4,260,608, 4,265,814, 4,294,757, 4,307,016, 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, and 4,371,533, the disclosures of which are hereby expressly incorporated by reference.

Maytansinoid-antibody conjugates

In an attempt to improve their therapeutic index, maytansine and maytansinoids have been conjugated to antibodies specifically binding to tumor cell antigens. Immunoconjugates containing maytansinoids and their therapeutic use are disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 5,208,020, 5,416,064 and European Patent EP 0 425 235 B1, the disclosures of which are hereby expressly incorporated by reference. Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 8618-8623 (1996) described immunoconjugates comprising a maytansinoid designated DM1 linked to the monoclonal antibody C242 directed against human colorectal cancer. The conjugate was found to be highly cytotoxic towards cultured colon cancer cells, and showed antitumor activity in an *in vivo* tumor growth assay.

106

Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) describe immunoconjugates in which a maytansinoid was conjugated via a disulfide linker to the murine antibody A7 binding to an antigen on human colon cancer cell lines, or to another murine monoclonal antibody TA 1 that binds the HER-2/*neu* oncogene. The cytotoxicity of the TA.1-maytansinoid conjugate was tested *in vitro* on the human breast cancer cell line SK-BR-3, which expresses 3×10^5 HER-2 surface antigens per cell. The drug conjugate achieved a degree of cytotoxicity similar to the free maytansinoid drug, which could be increased by increasing the number of maytansinoid molecules per antibody molecule. The A7-maytansinoid conjugate showed low systemic cytotoxicity in mice.

Antibody-maytansinoid conjugates (immunoconjugates)

Antibody-maytansinoid conjugates are prepared by chemically linking an antibody to a maytansinoid molecule without significantly diminishing the biological activity of either the antibody or the maytansinoid molecule. An average of 3-4 maytansinoid molecules conjugated per antibody molecule has shown efficacy in enhancing cytotoxicity of target cells without negatively affecting the function or solubility of the antibody, although even one molecule of toxin/antibody would be expected to enhance cytotoxicity over the use of naked antibody. Maytansinoids are well known in the art and can be synthesized by known techniques or isolated from natural sources. Suitable maytansinoids are disclosed, for example, in U.S. Patent No. 5,208,020 and in the other patents and nonpatent publications referred to hereinabove. Preferred maytansinoids are maytansinol and maytansinol analogues modified in the aromatic ring or at other positions of the maytansinol molecule, such as various maytansinol esters.

There are many linking groups known in the art for making antibody-maytansinoid conjugates, including, for example, those disclosed in U.S. Patent No. 5,208,020 or EP Patent 0 425 235 B1, and Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992). The linking groups include disulfide groups, thioether groups, acid labile groups, photolabile groups, peptidase labile groups or esterase labile groups, as disclosed in the above-identified patents, disulfide and thioether groups being preferred.

Conjugates of the antibody and maytansinoid may be made using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate, iminothiolane (IT) bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis-(p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as toluene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). Particularly preferred coupling agents include N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 [1978]) and N-succinimidyl-4-(2-pyridyldithio)pentanoate (SPP) to provide for a disulfide linkage.

The linker may be attached to the maytansinoid molecule at various positions, depending on

10X
the type of the link. For example, an ester linkage may be formed by reaction with a hydroxyl group using conventional coupling techniques. The reaction may occur at the C-3 position having a hydroxyl group, the C-14 position modified with hydroxymethyl, the C-15 position modified with a hydroxyl group, and the C-20 position having a hydroxyl group. In a preferred embodiment, the linkage is formed at the C-3 position of maytansinol or a maytansinol analogue.

Calicheamicin

Another immunoconjugate of interest comprises an antibody conjugated to one or more calicheamicin molecules. The calicheamicin family of antibiotics are capable of producing double-stranded DNA breaks at sub-picomolar concentrations. For the preparation of conjugates of the calicheamicin family, see U.S. patents 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (all to American Cyanamid Company). Structural analogues of calicheamicin which may be used include, but are not limited to, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetyl- γ_1^I , PSAG and 6^I (Himmman et al., *Cancer Research* 53 3336-3342 (1993), Lode et al., *Cancer Research* 58 2925-2928 (1998) and the aforementioned U.S. patents to American Cyanamid). Another anti-tumor drug that the antibody can be conjugated is QFA which is an antifolate. Both calicheamicin and QFA have intracellular sites of action and do not readily cross the plasma membrane. Therefore, cellular uptake of these agents through antibody mediated internalization greatly enhances their cytotoxic effects.

Other cytotoxic agents

Other antitumor agents that can be conjugated to the antibodies of the invention include BCNU, streptozocin, vincristine and 5-fluorouracil, the family of agents known collectively LL-R33288 complex described in U.S. patents 5,053,394, 5,770,710, as well as esperamicins (U.S. patent 5,877,296).

Enzymatically active toxins and fragments thereof which can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, *Aleurites fordii* proteins, dianthin proteins, *Phytolacca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcun, croton, saponaria officinalis inhibitor, galonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin and the tunicamycins. See, for example, WO 93/21232 published October 28, 1993.

The present invention further contemplates an immunoconjugate formed between an antibody and a compound with nucleolytic activity (e.g., a ribonuclease or a DNA endonuclease such as a deoxyribonuclease, DNase).

For selective destruction of the tumor, the antibody may comprise a highly radioactive atom. A variety of radioactive isotopes are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Br^{212} , P^{32} , Pb^{212} and radioactive isotopes of Lu. When the conjugate is used for detection, it may comprise a radioactive atom for scintigraphic

studies, for example ^{99m}Tc or ^{123}I , or a spin label for nuclear magnetic resonance (NMR) imaging (also known as magnetic resonance imaging, mri), such as iodine-123 again, iodine-131, indium-111, fluorine-19, carbon-13, nitrogen-15, oxygen-17, gadolinium, manganese or iron.

The radio- or other labels may be incorporated in the conjugate in known ways. For example, the peptide may be biosynthesized or may be synthesized by chemical amino acid synthesis using suitable amino acid precursors involving, for example, fluorine-19 in place of hydrogen. Labels such as ^{99m}Tc or ^{123}I , Re^{186} , Re^{188} and In^{111} can be attached via a cysteine residue in the peptide. Yttrium-90 can be attached via a lysine residue. The IODOGEN method (Fraker et al (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57) can be used to incorporate iodine-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describes other methods in detail.

Conjugates of the antibody and cytotoxic agent may be made using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate, iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis-(p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), dicyanates (such as toluene 2,6-dicyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a rcm immunotoxin can be prepared as described in Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See WO94/11026. The linker may be a "cleavable linker" facilitating release of the cytotoxic drug in the cell. For example, an acid-labile linker, peptidase-sensitive linker, photolabile linker, dimethyl linker or disulfide-containing linker (Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992), U.S. Patent No. 5,208,020) may be used.

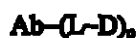
The compounds of the invention expressly contemplate, but are not limited to, ADC prepared with cross-linker reagents: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, and sulfo-SMPB, and SVSB (succinimidyl-(4-vinylsulfone)benzoate) which are commercially available (e.g., from Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.A.) See pages 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Preparation of antibody drug conjugates

In the antibody drug conjugates (ADC) of the invention, an antibody (Ab) is conjugated to one or more drug moieties (D), e.g., about 1 to about 20 drug moieties per antibody, through a linker (L). The ADC of Formula I may be prepared by several routes, employing organic chemistry reactions, conditions, and reagents known to those skilled in the art, including: (1) reaction of a nucleophilic group of an antibody with a bivalent linker reagent, to form Ab-L, via a covalent bond,

109

followed by reaction with a drug moiety D, and (2) reaction of a nucleophilic group of a drug moiety with a bivalent linker reagent, to form D-L, via a covalent bond, followed by reaction with the nucleophilic group of an antibody



I

Nucleophilic groups on antibodies include, but are not limited to (i) N-terminal amine groups, (ii) side chain amine groups, e.g. lysine, (iii) side chain thiol groups, e.g. cysteine, and (iv) sugar hydroxyl or amino groups where the antibody is glycosylated. Amine, thiol, and hydroxyl groups are nucleophilic and capable of reacting to form covalent bonds with electrophilic groups on linker moieties and linker reagents including: (i) active esters such as NHS esters, HOBt esters, haloformates, and acid halides, (ii) alkyl and benzyl halides such as haloacetamides, (iii) aldehydes, ketones, carboxyl, and maleimide groups. Certain antibodies have reducible interchain disulfides, i.e. cysteine bridges. Antibodies may be made reactive for conjugation with linker reagents by treatment with a reducing agent such as DTT (dithiothreitol). Each cysteine bridge will thus form, theoretically, two reactive thiol nucleophiles. Additional nucleophilic groups can be introduced into antibodies through the reaction of lysines with 2-iminothiolane (Traut's reagent) resulting in conversion of an amine into a thiol.

Antibody drug conjugates of the invention may also be produced by modification of the antibody to introduce electrophilic moieties, which can react with nucleophilic substituents on the linker reagent or drug. The sugars of glycosylated antibodies may be oxidized, e.g. with periodate oxidizing reagents, to form aldehyde or ketone groups which may react with the amine group of linker reagents or drug moieties. The resulting imine Schiff base groups may form a stable linkage, or may be reduced, e.g. by borohydride reagents to form stable amine linkages. In one embodiment, reaction of the carbohydrate portion of a glycosylated antibody with either *glactose oxidase* or sodium meta-periodate may yield carbonyl (aldehyde and ketone) groups in the protein that can react with appropriate groups on the drug (*Hermanson, Bioconjugate Techniques*). In another embodiment, proteins containing N-terminal serine or threonine residues can react with sodium meta-periodate, resulting in production of an aldehyde in place of the first amino acid (*Geoghagan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3 138-146, US 5362852*). Such aldehyde can be reacted with a drug moiety or linker nucleophile.

Likewise, nucleophilic groups on a drug moiety include, but are not limited to amine, thiol, hydroxyl, hydrazide, oxime, hydrazine, thiosemicarbazone, hydrazine carboxylate, and arylhydrazide groups capable of reacting to form covalent bonds with electrophilic groups on linker moieties and linker reagents including: (i) active esters such as NHS esters, HOBt esters, haloformates, and acid halides, (ii) alkyl and benzyl halides such as haloacetamides, (iii) aldehydes, ketones, carboxyl, and maleimide groups.

Alternatively, a fusion protein comprising the antibody and cytotoxic agent may be made,

110
1
e.g., by recombinant techniques or peptide synthesis. The length of DNA may comprise respective regions encoding the two portions of the conjugate either adjacent one another or separated by a region encoding a linker peptide which does not destroy the desired properties of the conjugate.

In yet another embodiment, the antibody may be conjugated to a "receptor" (such as streptavidin) for utilization in tumor pre-targeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration of a "ligand" (e.g., avidin) which is conjugated to a cytotoxic agent (e.g., a radionucleotide).

Antibody Derivatives

The antibodies of the present invention can be further modified to contain additional nonproteinaceous moieties that are known in the art and readily available. Preferably, the moieties suitable for derivatization of the antibody are water soluble polymers. Non-limiting examples of water soluble polymers include, but are not limited to, polyethylene glycol (PEG), copolymers of ethylene glycol/propylene glycol, carboxymethylcellulose, dextran, polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone, poly-1, 3-dioxolane, poly-1,3,6-trioxane, ethylene/maleic anhydride copolymer, polyaminoacids (either homopolymers or random copolymers), and dextran or poly(n-vinyl pyrrolidone)/polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols (e.g., glycerol), polyvinyl alcohol, and mixtures thereof. Polyethylene glycol propionaldehyde may have advantages in manufacturing due to its stability in water. The polymer may be of any molecular weight, and may be branched or unbranched. The number of polymers attached to the antibody may vary, and if more than one polymers are attached, they can be the same or different molecules. In general, the number and/or type of polymers used for derivatization can be determined based on considerations including, but not limited to, the particular properties or functions of the antibody to be improved, whether the antibody derivative will be used in a therapy under defined conditions, etc.

Pharmaceutical Formulations

Therapeutic formulations comprising an antibody of the invention are prepared for storage by mixing the antibody having the desired degree of purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed (1980)), in the form of aqueous solutions, lyophilized or other dried formulations. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, histidine and other organic acids, antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecylmethylbenzyl ammonium chloride, hexamethonium chloride, benzalkonium chloride, benzethonium chloride, phenol, butyl or benzyl alcohol, alkyl parabens such as methyl or propyl paraben, catechol, resorcinol, cyclohexanol, 3-pentanol, and m-cresol), low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides, proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins,

hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone, amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine, monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrins, chelating agents such as EDTA, sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol, salt-forming counter-ions such as sodium, metal complexes (e.g., Zn-protein complexes), and/or non-ionic surfactants such as TWEENTM, PLURONICSTM or polyethylene glycol (PEG)

The formulation herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsule prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsule and poly-(methylmethacrylate) microcapsule, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the immunoglobulin of the invention, which matrices are in the form of shaped articles, e.g. films, or microcapsule. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and γ -ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOTTM (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid. While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods. When encapsulated immunoglobulins remain in the body for a long time, they may denature or aggregate as a result of exposure to moisture at 37°C, resulting in a loss of biological activity and possible changes in immunogenicity. Rational strategies can be devised for stabilization depending on the mechanism involved. For example, if the aggregation mechanism is discovered to be intermolecular S-S bond formation through thio-disulfide interchange, stabilization may be achieved by modifying sulfhydryl residues, lyophilizing from acidic solutions, controlling moisture content, using appropriate additives, and developing specific polymer matrix compositions.

Uses

An antibody of the present invention may be used in, for example, *in vitro*, *ex vivo* and *in*

in vivo therapeutic methods. Antibodies of the invention can be used as an antagonist to partially or fully block the specific antigen activity *in vitro*, *ex vivo* and/or *in vivo*. Moreover, at least some of the antibodies of the invention can neutralize antigen activity from other species. Accordingly, the antibodies of the invention can be used to inhibit a specific antigen activity, e.g., in a cell culture containing the antigen, in human subjects or in other mammalian subjects having the antigen with which an antibody of the invention cross-reacts (e.g. chimpanzee, baboon, marmoset, cynomolgus and rhesus, pig or mouse). In one embodiment, the antibody of the invention can be used for inhibiting antigen activities by contacting the antibody with the antigen such that antigen activity is inhibited. Preferably, the antigen is a human protein molecule.

In one embodiment, an antibody of the invention can be used in a method for inhibiting an antigen in a subject suffering from a disorder in which the antigen activity is detrimental, comprising administering to the subject an antibody of the invention such that the antigen activity in the subject is inhibited. Preferably, the antigen is a human protein molecule and the subject is a human subject. Alternatively, the subject can be a mammal expressing the antigen with which an antibody of the invention binds. Still further the subject can be a mammal into which the antigen has been introduced (e.g., by administration of the antigen or by expression of an antigen transgene). An antibody of the invention can be administered to a human subject for therapeutic purposes. Moreover, an antibody of the invention can be administered to a non-human mammal expressing an antigen with which the immunoglobulin cross-reacts (e.g., a primate, pig or mouse) for veterinary purposes or as an animal model of human disease. Regarding the latter, such animal models may be useful for evaluating the therapeutic efficacy of antibodies of the invention (e.g., testing of dosages and time courses of administration). Blocking antibodies of the invention that are therapeutically useful include, for example but are not limited to, anti-HER2, anti-VEGF, anti-IgE, anti-CD11, anti-interferon and anti-tissue factor antibodies. The antibodies of the invention can be used to treat, inhibit, delay progression of, prevent/delay recurrence of, ameliorate, or prevent diseases, disorders or conditions associated with abnormal expression and/or activity of one or more antigen molecules, including but not limited to malignant and benign tumors, non-leukemias and lymphoid malignancies, neuronal, glial, astrocytic, hypothalamic and other glandular, macrophagal, epithelial, stromal and blastocoelic disorders, and inflammatory, angiogenic and immunologic disorders.

In one aspect, a blocking antibody of the invention is specific to a ligand antigen, and inhibits the antigen activity by blocking or interfering with the ligand-receptor interaction involving the ligand antigen, thereby inhibiting the corresponding signal pathway and other molecular or cellular events. The invention also features receptor-specific antibodies which do not necessarily prevent ligand binding but interfere with receptor activation, thereby inhibiting any responses that would normally be initiated by the ligand binding. The invention also encompasses antibodies that either preferably or exclusively bind to ligand-receptor complexes. An antibody of the invention can also act as an agonist of a particular antigen receptor, thereby potentiating, enhancing or

activating either all or partial activities of the ligand-mediated receptor activation.

In certain embodiments, an immunoconjugate comprising an antibody conjugated with a cytotoxic agent is administered to the patient. In some embodiments, the immunoconjugate and/or antigen to which it is bound is/are internalized by the cell, resulting in increased therapeutic efficacy of the immunoconjugate in killing the target cell to which it binds. In one embodiment, the cytotoxic agent targets or interferes with nucleic acid in the target cell. Examples of such cytotoxic agents include any of the chemotherapeutic agents noted herein (such as a maytansinoid or a calicheamicin), a radioactive isotope, or a ribonuclease or a DNA endonuclease.

Antibodies of the invention can be used either alone or in combination with other compositions in a therapy. For instance, an antibody of the invention may be co-administered with another antibody, chemotherapeutic agent(s) (including cocktails of chemotherapeutic agents) other cytotoxic agent(s), anti-angiogenic agent(s) cytokines, and/or growth inhibitory agent(s). Where an antibody of the invention inhibits tumor growth, it may be particularly desirable to combine it with one or more other therapeutic agent(s) which also inhibits tumor growth. For instance, an antibody of the invention may be combined with an anti-VEGF antibody (e.g., AVASTIN) and/or anti-ErbB antibodies (e.g. HERCEPTIN® anti-HER2 antibody) in a treatment scheme, e.g. in treating any of the diseases described herein, including colorectal cancer, metastatic breast cancer and kidney cancer. Alternatively, or additionally, the patient may receive combined radiation therapy (e.g. external beam irradiation or therapy with a radioactive labeled agent, such as an antibody). Such combined therapies noted above include combined administration (where the two or more agents are included in the same or separate formulations), and separate administration, in which case, administration of the antibody of the invention can occur prior to, and/or following, administration of the adjunct therapy or therapies.

The antibody of the invention (and adjunct therapeutic agent) is/are administered by any suitable means, including parenteral, subcutaneous, intraperitoneal, intrapulmonary, and intranasal, and, if desired for local treatment, intralesional administration. Parenteral infusions include intramuscular, intravenous, intraarterial, intraperitoneal, or subcutaneous administration. In addition, the antibody is suitably administered by pulse infusion, particularly with declining doses of the antibody. Dosing can be by any suitable route, for example by injections, such as intravenous or subcutaneous injections, depending in part on whether the administration is brief or chronic.

The antibody composition of the invention will be formulated, dosed, and administered in a fashion consistent with good medical practice. Factors for consideration in this context include the particular disorder being treated, the particular mammal being treated, the clinical condition of the individual patient, the cause of the disorder, the site of delivery of the agent, the method of administration, the scheduling of administration, and other factors known to medical practitioners. The antibody need not be, but is optionally formulated with one or more agents currently used to prevent or treat the disorder in question. The effective amount of such other agents depends on the

amount of antibodies of the invention present in the formulation, the type of disorder or treatment, and other factors discussed above. These are generally used in the same dosages and with administration routes as used heretofore or about from 1 to 99% of the heretofore employed dosages

5 For the prevention or treatment of disease, the appropriate dosage of an antibody of the invention (when used alone or in combination with other agents such as chemotherapeutic agents) will depend on the type of disease to be treated, the type of antibody, the severity and course of the disease, whether the antibody is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the antibody, and the discretion of the attending physician. The antibody is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments. Depending on the type and severity of the disease, about 1 $\mu\text{g/kg}$ to 15 mg/kg (e.g. 0.1 mg/kg -10 mg/kg) of antibody is an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion. One typical daily dosage might range from about 1 $\mu\text{g/kg}$ to 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment is sustained until a desired suppression of disease symptoms occurs. One exemplary dosage of the antibody would be in the range from about 0.05 mg/kg to about 10 mg/kg . Thus, one or more doses of about 0.5 mg/kg , 2.0 mg/kg , 4.0 mg/kg or 10 mg/kg (or any combination thereof) may be administered to the patient. Such doses may be administered intermittently, e.g. every week or every three weeks (e.g. such that the patient receives from about two to about twenty, e.g. about six doses of the antibody). An initial higher loading dose, followed by one or more lower doses may be administered. An exemplary dosing regimen comprises administering an initial loading dose of about 4 mg/kg , followed by a weekly maintenance dose of about 2 mg/kg of the antibody. However, other dosage regimens may be useful. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays.

Articles of Manufacture

In another aspect of the invention, an article of manufacture containing materials useful for the treatment, prevention and/or diagnosis of the disorders described above is provided. The article of manufacture comprises a container and a label or package insert on or associated with the container. Suitable containers include, for example, bottles, vials, syringes, etc. The containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds a composition which is by itself or when combined with another composition effective for treating, preventing and/or diagnosing the condition and may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). At least one active agent in the composition is an antibody of the invention. The label or package insert indicates that the composition is used for treating the condition of choice, such as cancer. Moreover, the article of manufacture may comprise (a) a first container with a composition

115

contained therein, wherein the composition comprises an antibody of the invention, and (b) a second container with a composition contained therein, wherein the composition comprises a further cytotoxic agent. The article of manufacture in this embodiment of the invention may further comprise a package insert indicating that the first and second antibody compositions can be used to treat a particular condition, for example cancer. Alternatively, or additionally, the article of manufacture may further comprise a second (or third) container comprising a pharmaceutically-acceptable buffer, such as bacteriostatic water for injection (BWFI), phosphate-buffered saline, Ringer's solution and dextrose solution. It may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, and syringes

The following are examples of the methods and compositions of the invention. It is understood that various other embodiments may be practiced, given the general description provided above

EXAMPLES

The examples herein describe the generation of humanized anti-beta7 antibodies from a rat anti-mouse antibody that binds to the beta7 subunit of the alpha4beta7 integrin

Example 1. Humanization of a beta7 antagonist antibody

Materials and Methods

Residue numbers are according to Kabat (Kabat *et al.*, *Sequences of proteins of immunological interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Single letter amino acid abbreviations are used. DNA degeneracies are represented using the IUB code (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)

Direct hypervariable region grafts onto the acceptor human consensus framework – The phagemid used for this work, pVO350-2b, was a monovalent Fab-g3 display vector having 2 open reading frames under control of the phoA promoter, essentially as described in Lee *et al.*, *J Mol Biol.* (2004), 340(5) 1073-93. The first open reading frame consists of the stII signal sequence fused to the VL and CH1 domains of the acceptor light chain and the second consists of the stII signal sequence fused to the VH and CH1 domains of the acceptor heavy chain followed by a truncated form of the minor phage coat protein P3 (Lowman, H. *et al.* (1990) *Biochemistry* 30:10832)

The VL and VH domains from rat F1b504 (antibody F1b504 64 produced by hybridoma ATCC HB-293, American Type Culture Collection (ATCC), P O Box 1549, Manassas, VA 20108, USA) were aligned with the human consensus kappa I (HuKI) and human subgroup III consensus VH (HuIII) domains. To make the hypervariable region (HVR) grafts, the following frameworks were used. HuKI was used for the light chain variable domain framework (see FIGS 1A and 7)

114

For the heavy chain variable domain framework, the acceptor VH framework, a modified human subgroup III (humIII) consensus VH domain which differs from the humIII sequence at 3 positions R71A, N73T, and L78A may be used (see Carter et al., Proc Natl Acad Sci. USA 89:4285 (1992)) (see Fig. 1B). In generation of antibodies of the present invention, the 504K-RF graft was also prepared from the modified human subgroupIII consensus VH domain by making the following amino acid substitutions A71R and A78F.

Hypervariable regions from rat Fib504 (produced by hybridoma ATCC HB-293) antibody were engineered into the acceptor human subgroup III consensus VH framework to generate a direct HVR-graft (Fib504graft) (see Fig. 1B). In the VL domain the following regions from rat Fib504 were grafted to the human consensus acceptor, huKL positions 24-34 (L1), 50-56 (L2) and 89-97 (L3) (Fig. 1A). In the VH domain, positions 26-35 (H1), 49-65 (H2) and 94-102 (H3) were grafted (Fig. 1B). In addition a second HVR graft, Fib504Kgraft, was constructed that also included within the HVR, VL position 49, based on an extended definition for L2 (see MacCallum et al. *J Mol Biol.* 262, 732-745 (1996)). MacCallum et al. have analyzed antibody and antigen complex crystal structures and found position 49 of the light chain and positions 49 and 94 of the heavy chain are part of the antigen contact region thus, these positions were included in the definitions of HVR-L2, HVR-H2 and HVR-H3 for humanized anti-beta7 antibodies disclosed herein.

The direct-graft variants were generated by Kunkel mutagenesis (Kunkel et al. (1987) *supra*) using a separate oligonucleotide for each hypervariable region. Correct clones were assessed by DNA sequencing.

Soft randomization of the hypervariable regions

The process of "soft randomization" (see US Application Serial No. 60/545,840) refers a procedure for biased mutagenesis of a selected protein sequence, such as a hypervariable region of an antibody. The method maintains a bias towards the murine, rat, or other starting hypervariable region sequence, while introducing an approximately 10-50 percent mutation at each selected position. This technique increases the capacity of the library screening employed and avoids a change in the antigen epitope recognized by the antibody. According to this soft randomization technique, sequence diversity is introduced into each hypervariable region using a strategy that maintains a bias towards the murine hypervariable region sequence. This was accomplished using a poisoned oligonucleotide synthesis strategy first described by Gallop et al., *J Med. Chem.* 37 1233-1251 (1994). However, other methods for maintaining a bias towards the non-human hypervariable region residue are available, such as error prone PCR, DNA shuffling, etc.

According to the method used herein, for a given position within a hypervariable region to be mutated, the codon encoding the wild-type amino acid is poisoned with a mixture (e.g. a 70-10-10-10 mixture) of nucleotides resulting in an approximately 50 percent mutation rate at each selected hypervariable region position. To achieve this, the codon encoding the wild-type hypervariable region amino acid to be mutated is synthesized with a low level of contaminating

11X

mixture of the other three nucleotides, such as a 70-10-10-10 mixture of nucleotides. Thus, by way of example, for soft randomization of PRO (CCG), the first position synthesized is a mixture of 70% C, and 10% each of G, T and A, the second position is a mixture of 70% C, and 10% each of A, G, and T; and the third position is a mixture of 70% G, and 10% each of A, C and T. It is understood that the bias can be adjusted up or down depending upon the codon being synthesized at a given position, the number of codons that code for a particular amino acid, and the degree that oligonucleotide synthesis is poisoned by the nucleotide composition of the synthesis mixture.

Soft randomized oligonucleotides can be patterned after the murine, rat or other starting hypervariable region sequences and encompass the same regions defined by the direct hypervariable region grafts. Optionally, two positions, amino acids at the beginning of H2 and H3 in the VH domain, may be limited in their diversity: the codon RGC may be used for position 49 encoding A, G, S or T and at position 94, the codon AKG may be used encoding M or R.

Generation of phage libraries – Randomized oligonucleotide pools designed for each hypervariable region were phosphorylated separately in six 20 µl reactions containing 660 ng of oligonucleotide, 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 20 mM DTT, and 5 U polynucleotide kinase for 1 h at 37°C. The six phosphorylated oligonucleotide pools were then combined with 20 µg of Kunkel template in 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂ in a final volume of 500 µl resulting in an oligonucleotide to template ratio of 3. The mixture was annealed at 90°C for 4 min, 50°C for 5 min and then cooled on ice. Excess, unannealed oligonucleotide was removed with a QIAQUICK™ PCR purification kit (Qiagen kit 28106, Qiagen, Valencia, CA) using a modified protocol to prevent excessive denaturation of the annealed DNA. To the 500 µl of annealed mixture, 150 µl of Qiagen buffer PB was added, and the mixture was split between 2 silica columns. Following a wash of each column with 750 µl of Qiagen buffer PB and an extra spin to dry the columns, each column was eluted with 110 µl of 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8. The annealed and cleaned-up template (220 µl) was then filled in by adding 1 µl 100mM ATP, 10 µl 25mM dNTPs (25mM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 15 µl 100mM DTT, 25 µl 10X TM buffer (0.5 M Tris pH 7.5, 0.1 M MgCl₂), 2400 U T4 ligase, and 30 U T7 polymerase for 3 h at room temperature.

The filled-in product was analyzed on Tris-Acetate-EDTA/agarose gels (Sudhu *et al.*, *Methods in Enzymology* 328:333-363 (2000)). Three bands are usually visible: the bottom band is correctly filled and ligated product, the middle band is filled but unligated and the top band is strand displaced. The top band is produced by an intrinsic side activity of T7 polymerase and is difficult to avoid (Lechner *et al.*, *J. Biol. Chem.* 258:11174-11184 (1983)), however, this band transforms 30-fold less efficiently than the bottom band and usually contributes little to the library. The middle band is due to the absence of a 5' phosphate for the final ligation reaction, this band transforms efficiently and gives mainly wild type sequence.

The filled in product was then cleaned-up and electroporated into SS320 cells and propagated

in the presence of M13/KO7 helper phage as described by Sidhu *et al. Methods in Enzymology* 328 333-363 (2000). Library sizes ranged from $1 - 2 \times 10^8$ independent clones. Random clones from the initial libraries were sequenced to assess library quality.

Phage Selection – Full length human integrin $\alpha 4 \beta 7$ was expressed in 293 cells (Graham *et al. J Gen Virol.* 36:59 (1977)), purified by Fib504 affinity chromatography and used as the target for phage selection. For immobilization on MaxiSorp™ microtiter plates (Nalge Nunc, Rochester, NY), 100 μ l of human integrin $\alpha 4 \beta 7$ was coated at 5 μ g/ml in 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 and 2 mM MnCl_2 (TBSM), overnight at 4 degrees C. Wells were blocked for 1 h using TBSM containing 1 % BSA. For the first round of selection, 8 wells coated with target were used, a single target coated well was used for successive rounds of selection. Phage were harvested from the culture supernatant and suspended in TBSM containing 1 % BSA and 0.05 % TWENTY 20 (TBSMBT). After binding to the wells for 2 h, unbound phage were removed by extensive washing with TBS containing 0.05 % TWENTY 20 (TBSBT). Bound phage were eluted by incubating the wells with 100 mM HCl for 30 min. Phage were amplified using Top10 cells and M13/KO7 helper phage and grown overnight at 37 °C in ZYT, 50 μ g/ml carbenicillin. The titers of phage eluted from a target coated well were compared to titers of phage recovered from a non-target coated well to assess enrichment. After four rounds of selection were performed, random clones were selected for sequence analysis.

Fab Production and Affinity Determination – To express Fab protein for affinity measurements, a stop codon was introduced between the heavy chain and g3 in the phage display vector. Clones were transformed into *E. coli* 34B8 cells and grown in AP5 media at 30 °C (Presta, L. *et al., Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). Cells were harvested by centrifugation, suspended in 10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8 and broken open using a microfluidizer. Fab was purified with Protein G affinity chromatography.

Affinity determinations were performed by surface plasmon resonance using a BIAcore™ 3000 (Biacore, Piscataway, NJ). Humanized Fib504 Fab variants were immobilized in 10mM acetate pH 4.5 (ranging from 250 to 1500 response units (RU)) on a CM5 sensor chip and 2-fold dilutions of human integrin $\alpha 4 \beta 7$ (1.5 to 770 nM) in TBSM containing 2 % n-octylglucoside were injected. Each sample was analyzed with 5-minute association and 5 to 60-minute dissociation times. After each injection, the chip was regenerated using three 1-minute injections of 8 M urea. Binding response was corrected by subtracting the RU from a blank flow cell. A 1:1 Langmuir model of simultaneous fitting of k_{on} and k_{off} was used for kinetics analysis.

Results and Discussion

Humanization of rat Fib504 – The human acceptor framework used for humanization is based on the framework used for HERCEPTIN® and consists of the consensus human kappa I (hmKI) VL domain and a variant of the human subgroup III (humIII) consensus VH domain. This variant VH

domain has 3 changes from the human consensus R71A, N73T and L78A. The VL and VH domains of rat Fib504 were each aligned with the human kappa I and subgroup III domains, each hypervariable region (HVR) was identified and grafted into the human acceptor framework to generate a HVR graft (504 graft) that could be displayed as an Fab on phage (Figs 1A and 1B)

5 Based on the analysis of available antibody and antigen complex crystal structures MacCallum et al (MacCallum et al. *J Mol Biol* 262 732-745 (1996)) proposed HVR definitions based on variable domain residues that frequently contact antigens. Thus positions 49G and 94M of the heavy chain were included in the HVR graft of Fib504 (Fig. 1B). In addition, a second HVR graft, Fib504Kgraft, was also generated which included position 49K of the light chain, because this
10 position is also within the contact definition of HVR-L2 and can serve as an antigen contact (Fig. 1A). When either the Fib504 or Fib504K grafts were displayed on phage and tested for binding to immobilized alpha4beta7, no binding was observed.

Libraries were generated using both the Fib504 and Fib504-K HVR grafts in which each of the HVR regions were soft randomized simultaneously. Each HVR graft library was panned against
15 immobilized alpha4beta7 for 4 rounds of selection. No enrichment was observed and clones picked for DNA sequence analysis displayed only random sequence changes targeted to the 6 HVR regions.

Two additional VH framework sequences, "RL" and "RF" were investigated as acceptor frameworks and contained changes at positions 71 and 78. Position 71 was changed to an Arginine as in the human subgroup III consensus, and position 78 was changed to a Leucine as in the human
20 subgroup III consensus (acceptor framework "RL") or a Phenylalanine as in the human subgroup II consensus and the rat Fib504 VH framework (acceptor framework "RF") (Fig. 10A). When either the Fib504 or Fib504K graft in the "RL" (Fib504-RL and Fib504K-RL) or "RF" (Fib504-RF and Fib504K-RF) acceptor framework was displayed on phage and tested for binding to immobilized alpha4beta7. Specific phage binding was only observed for the Fib504K graft using the "RF"
25 framework (Fig. 10B). The modest binding of phage displaying the Fib504-RF graft relative to the other grafts lacking Y49K (light chain) and L78F (heavy chain) indicates the importance of these positions in selecting a useful acceptor framework.

Libraries were generated as before using a soft randomization strategy simultaneously at each of the 6 HVRs for the Fib504K-RL and Fib504K-RF grafts and sorted on immobilized alpha4beta7
30 for 4 rounds of selection as described above. Enrichment was only observed for the library based on the Fib504K-RF graft. Clones from round 4 of the Fib504K-RF library were selected for sequence analysis and revealed amino acid changes targeted to HVR-L1. Most clones contained the change Y32L, in addition position 31 was frequently changed to D, S, P or N (Fig. 1C). In addition to the starting graft, Fib504K-RF, 3 clones were expressed and purified as Fab protein and further
35 analyzed by Biacore as described above. Clones hu504-5, hu504-16 and hu504-32 (variants of SBQ ID NO 1 containing substitutions T31S plus Y32L (variant hu504.5), Y32L (variant hu504.16), or T31D plus Y32L (variant hu504.32), see Figure 1C), showed excellent binding to alpha4beta7.

relative to the Fib504K-RF graft and met or exceeded the affinity of the chimeric Fib504 Fab for binding to alpha4beta7. The results of the Biacore analysis are shown in Table 3, below, and indicate that selected variation in the HVRs and/or framework regions, disclosed herein, generated antagonist antibodies to alpha4beta7 having improved affinity relative to the starting antibody. The results in Table 3 indicate that humanized variant 504.32 showed the greatest increase in affinity relative to the starting rat antibody by binding 3-fold more tightly to alpha4beta7.

Table 3

Fab (BIAcore™ analysis)	Affinity to Alpha4beta7 (nM)
Fib504	11
Variant 504.5	9
Variant 504.16	23
Variant 504.32	3

The results in Table 3 also indicate that the redesign of HVR-L1 was important to the restoration of high affinity antigen binding. In particular, the mutation Y32L was most frequent among the various clones. Other changes at position 31 and numerous other substitutions throughout HVR-H1 appear to be well tolerated and may provide additional improvement. From these results it is clear that there are multiple sequence changes that can improve the affinity of Fib504 grafted onto a human framework to generate affinities that meet or exceed that of the initial rat antibody.

Thus, starting from the graft of the 6 rat Fib504 HVRs into the human acceptor scaffold, the expansion of HVR-L2 to include position 49 (Lysine), expansion of HVR-H2 to include position 49 (Glycine), and the expansion of HVR-94 to include position 94 (Methionine) as well as amino acid changes at position 32 of VHR-L1 (where L or I replace Y) and, optionally, at position 31 of the VHR-L1 (where T is replaced by D or S, for example). Useful framework amino acid changes were made at positions 71 (A71R) and 78 (L78P) in the VH domain. Such amino acid changes lead to a fully human antibody, variant hu504.32, for example, with 3-fold improved binding affinity for alpha4beta7 integrin. Furthermore, selected humanized antibodies described herein have been determined to have at least comparable biological activity as the parent rat Fib504 antibody (see Example 3 herein).

Example 2. Additional humanized Fib504 HVR variants

The HVR amino acid sequences of humanized variant Fib504.32 were further modified to generate additional variants capable of antagonizing the activity of beta7 integrin subunit and/or integrins containing the beta7 subunit.

Generating a broad amino acid scan library – A library to scan selected HVR positions for

other amino acid residues capable of generating beta7-binding variants of variant hu504-32 was generated using 3 oligonucleotides. 504-L1, designed to soft randomize a portion of HVR-L1 with a bias towards the hu504-32 HVR-L1 sequence (i.e. the sequence ASSESVDLLH (SEQ ID NO:47, for relative positions A2-A11) was soft randomized as described above), and HVR-L3 504-N96 and HVR-H3 504-M94 which introduce NNS at positions HVR-L3 position 96 in the light chain and HVR-H3 position 94 in the heavy chain, thus allowing all 20 amino acids at these positions. With these three oligonucleotides, the broad amino acid scan library was generated as described above using a template containing three stop codons in the light chain (positions 31 and 32 in HVR-L1 and position 96 in HVR-L3) and 1 stop codon in the heavy chain (position 94 in HVR-H3).

Broad amino acid scan of hu504-32 – To more fully explore the preferred sequences allowed in HVR-L1 and to enhance the stability of 504-32, we designed a phage library that a) soft randomized HVR-L1 of 504-32 in the region where changes were observed (i.e. ASSESVDLLH (SEQ ID NO:47, for relative positions A2-A11) during humanization (Figure 1C), and b) allowed all possible amino acids at N96 in HVR-L3 and M94 in HVR-H3. Following 4 rounds of selection against immobilized full-length human integrin alpha4beta7 as described above, 96 random clones were selected for sequence analysis. The frequency at which amino acids were found at each position in the broad amino acid scan library suggest that the HVR-L1 sequence present in hu504-32 and the methionine at position 94 in the heavy chain are optimum for high affinity binding (Figure 12). The most preferred amino acids obtained by the selections starting from variant 504-32 (Fig. 12) are shown in yellow. In contrast, although asparagine is present at position 96 in the light chain of hu504-32, the high frequency of leucine observed at this position in the broad amino acid scan suggests the mutation N96L could further improve the affinity of humanized F1b504 variants for alpha4beta7 and also eliminate any potential deamidation problems at this position. The information in Figure 12 also suggests that a number of replacement amino acids are likely to be tolerated at most positions without a substantial loss in affinity. For example, to eliminate oxidation of M94 in HVR-H3, glutamine or arginine could likely be substituted.

Generating the limited amino acid scan libraries – Six libraries for a limited amino acid scan utilized six different Kunkel templates, each containing one stop codon located within one of the six HVRs. Each library was generated using a single oligonucleotide encoding a single HVR and utilizing the codons listed in Fig. 11A ("codon" column) to alter amino acid residues for subsequent testing for binding to beta7 or alpha4beta7. The same procedures are used to alter amino acid residues of anti-beta7 antibodies and test them for binding to alpha4beta7 integrins.

Limited amino acid scan of hu504-32 – The limited amino acid scan of hu504-16 was designed to make hu504-16 even more like the human light and heavy chain consensus sequence and in the process identify the minimal sequence elements of rat F1b504 that are required for binding. Six libraries were generated and targeted at each HVR at positions that differed between the hu504-16 and human consensus kappa I light or subgroup III heavy chains (Figure 1A and 1B);

122

either the rat or human amino acid was allowed at these positions in the library (Figure 11A). In order to accommodate coding for both amino acids during the oligonucleotide synthesis and mutagenesis, additional amino acids were also introduced in some cases (see encoded amino acids, Figure 11A). The limited amino acid scan libraries were selected against immobilized full-length human integrin $\alpha 4 \beta 7$ as described above and approximately 32 random clones were
5 sequenced from each library after round 3. The frequency of each amino acid found at each position is shown in Figure 11B and 11C.

Like the broad amino acid scan, the limited amino acid scan also provides information about what changes are tolerated at many positions in humanized Fib504. Unlike the broad amino acid
10 scan, however, the diversity allowed at each position randomized in the limited amino acid scan was restricted to a couple of amino acids. Thus the lack of any observed substitution at a given position does not indicate that a particular residue can not be changed nor does the high frequency of any particular amino acid at a given position necessarily indicate that it is the best solution for high affinity.

At some positions (positions 27, 29, 30, 53, 54 of the light chain and 50, 54, 58, 60, 61 and 65 of the heavy chain) the human consensus amino acid is selected quite frequently suggesting a back mutation to the human consensus would not dramatically alter binding to human $\alpha 4 \beta 7$. In fact, at position 54 of the light chain (in HVR-L2), the human consensus amino acid is selected more frequently than the amino acid from rat Fib504 indicating that this change made to 504-32 provides
15 a useful $\beta 7$ binding antibody.

Further, as a result of the library design, amino acids that are not derived from either the human consensus or rat Fib504 are selected more frequently at some positions and provide potential substitutions to improve the affinity of humanized Fib504 variants. These include, without limitation, D30A and I55V in the light chain and Y50R in the heavy chain. The results from these 2
20 libraries indicate that many HVR positions tolerate other amino acid substitutions and still retain comparable biological activity.

Summaries of observed amino acid changes are shown in Figures 13 and 15. Figure 15 summarizes the various amino acids useful at each of the positions in the CDRs of the antibody variants of the invention at positions numbered according to Kabat numbering or a relative
30 numbering system. Each of the additional antibodies encompassed by the variants depicted in Figures 13 and 15 is an embodiment of the invention.

Example 3. Cell Adhesion Assays

The ability of some of the humanized Fib504 variants of the invention to bind ligands expressed on a cell surface was tested by cell adhesion assays. Binding to $\alpha 4 \beta 7$ and another $\beta 7$ integrin, $\alpha 5 \beta 7$ were tested by the ability of the humanized variants to disrupt binding of
35

127

123

the integrin to its natural receptor. Binding of the humanized Fib504 variants to beta7 subunit alone expressed on a cell surface was similarly tested. The procedures and the results are described below

IgG production – Humanized Fib 504 IgG variants were expressed transiently in 293 cells (Graham et al. (1977) supra) using a separate vector for the light and heavy chains. The vectors were constructed by subcloning the light or heavy variable domains into suitable expression vectors for each of the light and heavy chains. Supernatant from 1 L CHO cell culture of a humanized Fib504 variant was filtered through a 0.45 µm filter and applied to a new 1 mL HiTrap Protein A HP column (Amersham/Pharmacia) equilibrated in Buffer A (10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl). Samples were applied at 0.8 mL/min, overnight, 4 degrees C. Each column was then washed and equilibrated with 30 mL Buffer A. Elution of antibody was accomplished by chromatography at room temperature on an FPLC (Amersham/Pharmacia) using a linear gradient of 14 min at 1 mL/min from 0 to 100% Buffer B (100 mM Glycine, pH 3.0). Resulting 1 mL fractions were immediately neutralized by the addition of 75 µL 1 M Tris, pH 8. Eluted protein was detected by absorption at 280 nm, and peak fractions were pooled and desalted into PBS on PD10 G-25 sephadex disposable sizing columns (Amersham/Pharmacia). Protein was detected by OD280 and peak fractions were pooled. The antibody in PBS was 0.22 µm filtered and stored at 4 degrees C. Amino acid analysis was used to quantify the concentrations of these purified antibodies, and values were assigned from the average of two separate determinations.

BCBCE labeling

In each of the assays presented in this Example 3, cells were labeled according to the following procedure. All cells used in the adhesion assays were labeled with 2', 7'-bis-(2-carboxylethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCBCE) at 10 µM in RPMI1640 media containing 10% FBS for RPMI8866 cells and 38C13 cells transfected with beta7 subunit (38C13 beta7 cells) and in F12 DMEM mix (50:50) containing 10% FBS for alphaEbata7-transfected 293 cells (alphaEbata7 293 cells). Cells were labeled for 30 minutes and washed two times with assay media. Cell density was adjusted to 3×10^6 cells per ml for RPMI8866 and 38C13beta7 cells and 2.2×10^6 cells per ml for alphaEbata7 293 cells.

Humanized Fib504 variants disrupt alpha4beta7 binding to MAdCAM

RPMI8866/MAdCAM-1-Ig Cell Adhesion RPMI8866 cells express alpha4beta7 on their surface (Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY). Humanized Fib504 variants (hu504 variants) were contacted with a mixture of RPMI8866 cells and MAdCAM fused to IgG coated on a solid support. Humanized Fib504 variant concentrations resulting in 50% inhibition (IC_{50}) of the binding of RPMI8866 cells to MAdCAM-1 were measured by coating Nunc Maxisorp™ 96-well plates with 2 µg/ml in PBS, 100 µl/well MAdCAM-1-Ig (Genentech, Inc., where Ig refers to fusion of MAdCAM-1 to an Fc region) overnight at 4 °C. After blocking the plates with 200 µl/well of 5 mg/ml BSA for one hour at room temperature, 50 µl of humanized Fib504 variants in assay media

(RPMI 1640 media, Hyclone®, Logan Utah, USA, supplemented with 5 mg/mL BSA) were added to each well and 150,000 BCBCF-labeled cells (BCBCF, Molecular Probes, Eugene, OR) in 50 µl of assay media were added to each well and incubated for 15 minutes at 37 °C. The wells were washed two times with 150 µl of assay media to remove unbound cells. The bound cells were solubilized with 100 µl of 0.1% SDS in 50 mM Tris/HCl pH7.5. The amount of fluorescence released from lysed cells was measured by SPECTRAMax GEMINI™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at 485 nm excitation 530 nm emission wavelengths. The fluorescence values were analyzed as a function of the concentrations of the humanized Fib504 variants added in each assay, using a four-parameter nonlinear least squares fit, to obtain the IC₅₀ values of each humanized Fib504 variant in the assay. IC₅₀ and IC₉₀ values were estimated from the four-parameter fit. Fig. 14 is an exemplary plot of the results. The IC₅₀ and IC₉₀ values for each of the variants tested are shown below in Table 4.

Table 4
Antibody binding to human MAdCAM-1

Antibody Tested Fib504 and hu504 variants	IC ₅₀ (nM) Exp 1/Exp 2*	IC ₉₀ (nM) Exp 1/Exp 2*
Rat Fib504	0.098/0.197	0.483/0.703
Variant hu504.5	0.067/0.248	0.361/0.880
Variant hu504.16	0.0768/0.206	0.244/0.551
Variant hu504.32	0.036/0.119	0.150/0.396
6B11 (non-blocking control)	>100	>100

*Exp 1/Exp 2 refers to the results of repeated assays

Humanized Fib504 variant disruption of alpha4beta7 binding to VCAM

RPMI8866/7dVCAM-1 Cell Adhesion. The RPMI8866/7dVCAM-1 assay is similar format to the RPMI8866/MAdCAM-1-Ig except that 7dVCAM-1 (ADP5, R&D Systems, Minneapolis, MN) was used at 2 µg/ml to coat plates. The results were analyzed as described above for the MAdCAM binding experiments. The IC₅₀ values for each of the variants tested are shown below in Table 5.

Table 5
Antibody binding to human VCAM

Antibody Tested Fib504 and hu504 variants	IC ₅₀ (nM) Exp 1/Exp 2*	IC ₉₀ (nM) Exp 1/Exp 2*
Rat Fib504	0.107/0.193	0.396/0.580
Variant hu504.5	0.088/0.270	0.396/0.726
Variant hu504.16	0.098/0.223	0.261/0.774
Variant hu504.32	0.059/0.110	0.183/0.337

145

6B11 (non-blocking control)	>100	>100

*Exp 1/Exp 2 refers to the results of repeated assays.

Humanized Fib504 variant disruption of alphaEbeta7 binding to human E-cadherin

5 AlphaEbeta7 293/huE-Cadherin Cell Adhesion 293 cells (Graham et al (1977) supra) were transfected with alphaE and beta7 (Genentech, Inc) The assay format is similar to the RPMI8866/MAdCAM-1-Ig assay except that the huE-Cadherin (648-EC, R&D Systems, Minneapolis, MN) was used at 2 µg/ml to coat the plates. Plates were then blocked with 5 mg/ml BSA as mentioned above and 50 µl of FIB504 variants in assay media (F-12.DMEM (50:50) supplemented with 5 mg/ml BSA) were add to each well and 110,000 BCECF labeled cells in 50 ul
10 of assay media were added to each well and incubated for 15 minutes at 37 °C. The wells were washed two times with 150 µl of assay media and the amount of fluorescence released by lysed cells was measured and analyzed as described above. Assay results from three experiments are shown in Table 6.

Table 6
Antibody binding to human E-Cadherin

15

Antibody Tested.	IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)
Fib504 and hu504 variants		
Rat Fib504	2.047/7 89/4.19	8 80/24.5/9 95
Variant hu504 5	2 132/10 18/4 77	7.99/28.7/10 19
Variant hu504.16	1 957/10.05/4.58	7 03/33.7/13.51
Variant hu504.32	1.814/6.99/3.47	8 8/24.5/11 73
HP2/1 (anti-alpha4, control)	>100/>100/>100	>100/>100/>100

Humanized Fib504 variant disruption of beta7 binding to MAdCAM

20 38C13beta7/muMAdCAM-1-Ig Cell Adhesion Assay The 38C13beta7/muMAdCAM-1-Ig assay was similar format to the RPMI8866/MAdCAM-1-Ig except that muMAdCAM-1-Ig (Genentech, Inc.) was used at 2 µg/ml to coat plates. 38C13 alpha4+ murine lymphoma cells (Crowe, D T et al., J Biol. Chem. 269 14411-14418 (1994)) were transfected with DNA encoding integrin beta7 such that alpha4beta7 was expressed on the cell surface. The ability of the antibodies
25 variants to disrupt interaction between the cell membrane associated alpha4beta7 and MAdCAM was performed as above. Assay results are shown in Table 7. Assay results are shown in Table 7 (IC50 and IC90 values for 2 experiments are shown)

Table 7

Activity of hu504 variant antibodies in 38C13-beta7 expressing cells

Binding to murine MAdCAM

Antibody Tested Fib504 and hu504 variants	IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)
Rat Fib504	0.682/0.306	2.869/1.51
Variant hu504.5	0.8587/0.466	2.322/2.61
Variant hu504 16	0.998/0.610	3.717/4.08
Variant hu504 32	0.718/0.458	4.08/1.51

5 Humanized Fib504 variant disruption of beta7 binding to murine VCAM

38C13beta7/muVCAM-1-Ig Cell Adhesion Assay The 38C13beta7/muVCAM-1-Ig assay was performed according to the murine MAdCAM-1-Ig/RPMI8866 cell binding assay above, except that muVCAM-1-Ig (Genentech, Inc.) was used at 2 µg/ml to coat plates. Results of the assay are shown in Table 8 (IC₅₀ and IC₉₀ values for 2 experiments are shown)

Table 8

Activity of hu504 variant antibodies in 38C13-beta7 expressing cells

Binding to murine VCAM-1-Ig

Antibody Tested Fib504 and hu504 variants	IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)
Rat Fib504	0.845/0.447	2.903/2.30
Variant hu504.5	0.763/0.407	3.074/2.30
Variant hu504.16	0.835/0.584	2.857/1.84
Variant hu504.32	0.562/0.330	2.004/1.84

15 The results of the humanized Fib504 variant binding studies demonstrate that the humanized antibody of the invention binds its target beta7 integrin subunit as well as the alpha4beta7 and alphaEbeta7 integrin with about the affinity of the starting rat antibody and, in some embodiments, with greater affinity. Thus, a humanized anti-beta7 antibody according to the invention has uses in anti-beta7 integrin therapies, particularly human therapies.

Relative activity of hu504.32 variants of the invention

20 Different amino acid variants of the hu504.32 antibody were tested in human and mouse cell adhesion assay for their ability to inhibit beta7-containing receptor binding to its ligand according to the cell adhesion assay methods disclosed herein. The RPMI8866/MAdCAM-1-Fc assay was performed as described herein above. The alphaEbeta7-293/hu E-cadherin assay was modified by the use of human E-cadherin-Fc as the ligand (human E-cadherin-Fc, 648-EC, R&D Systems, 25 Minneapolis, MN). The relative ability of hu504.32 variants to inhibit interaction of human

fibronectin (huFN40) with human alpha4beta7 receptor on RPMI8866 cells was also examined. The RPMI8866/hu Fibronectin (huFN40) assay used for these studies was similar in format to the RPMI8866/MAdCAM-1-Ig assay disclosed herein except that human fibronectin alpha-chymotryptic fragment 40 kDa (F1903, Chemicon International, Temecula, CA) was used at 2 μ g/ml to coat plates

The ability of the hu504.32 variants to inhibit interaction of murine beta7-containing receptors with murine MAdCAM-1 or murine VCAM-1 was examined. Murine MAdCAM-1-Fc and murine VCAM-1-Fc were inhibited from interacting with murine lymphoma alpha4+ cells expressing murine beta7 (38C13beta7 cells) by the hu504.32 variants. The murine MAdCAM-1-Fc and VCAM-1-Fc cell adhesion assays were performed similarly to those described herein above for human MAdCAM and VCAM. Where ligands were fused to Fc regions, the Fc receptors on the cells were blocked with 0.5 μ g anti-CD16/32 antibody (anti-Fc gamma III/II receptor antibody, catalog No. 553142, BD Biosciences, San Jose, CA) per 1 million cells for 5 minutes at room temperature. 150,000 labeled cells in 50 μ l of assay medium were added to each well and incubated for 13 minutes at 37 $^{\circ}$ C. The wells were washed and the amount of fluorescence released from lysed cells was measured as disclosed herein above. The control antibody for the human cell adhesion assays was the mouse monoclonal antibody to human serum albumin, 6B11 (Catalog No. ab10244, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA). The control antibody for the murine cell adhesion assays was the rat anti-mouse integrin beta7 antibody, M293 (BD Biosciences, San Jose, CA), which does not compete with ligand or with Fib504 for binding to integrin beta7.

The results of triplicate assays for the human and murine cell adhesion assays are provided in Tables 9 and 10, respectively.

Table 9
Activity of hu504.32 Variant Antibodies in Human Cell Adhesion Assays

Antibody Variant	IC50 Ave $\pm$ SD			
	RPMI8866/ huMAdCAM-1- Fc	RPMI8866/ hu7dVCAM-1	α B β 7-293/ huE-Cadherin- Fc	RPMI8866/ huFN40
hu504.32	0.088 $\pm$ 0.035	0.101 $\pm$ 0.021	3.970 $\pm$ 1.664	0.100 $\pm$ 0.046
hu504.32M94Q	0.090 $\pm$ 0.045	0.111 $\pm$ 0.035	4.130 $\pm$ 1.212	0.124 $\pm$ 0.056
hu504.32M94R	0.075 $\pm$ 0.034	0.089 $\pm$ 0.009	3.963 $\pm$ 1.776	0.119 $\pm$ 0.056
Control (6B11)	>100	>100	>100	>100

Table 10
Activity of hu504.32 Variant Antibodies in Murine Cell Adhesion Assays

Antibody Variant	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
hu504.32M94R	0.391 ± 0.112	0.228 ± 0.081
Control (M293)	>100	>100

5 The hu504.32 antibody has a methionine at position 94 of the heavy chain CDR3. The variants M94Q (or hu504.32Q) and M94R (or hu504.32R) have glutamine or arginine, respectively, at position 94 of the hu504.32 antibody variant. The hu504.32M, Q, and R antibodies substantially reduced integrin beta7 receptor-ligand interaction in each of the assays and are, thus, potent inhibitors of beta7-mediated cell adhesion.

Antibody hu504.32R Activity *In Vivo*

10 The hu504.32R antibody variant was tested *in vivo* for its ability to reduce integrin beta7 receptor-ligand interaction and reduce lymphocyte recruitment to inflamed colon in an *in vivo* murine inflammatory bowel disease model. BALB/c mice and CB17 SCID mice were obtained from Charles River Laboratories International, Inc (Wilmington, MA, USA). CD4⁺CD45Rb⁺ high T cell reconstituted SCID colitis mice were prepared by isolating CD4⁺CD45Rb⁺ high T cells from donor BALB/c mice and transferring 3x10⁵ cells in 100 µl PBS intravenously. Control SCID mice did not receive CD4⁺CD45Rb⁺ high T cells. Reconstituted CD4⁺ mice meeting the treatment group enrollment criteria of 10% weight loss from baseline or 15% from peak weight at week 4 were considered to have induced inflammatory bowel disease and were selected for treatment.

20 On the day of treatment with test antibodies, donor BALB/c mice mesenteric lymph node (MLN) cells were harvested and radiolabelled with Cr⁵¹. Treatment involved prior administration of anti-GP120 antibody, hu504.32 anti-beta7 antibody, hu504.32R anti-beta7 antibody, or no antibody (control) intravenously, 200 µg/100 µl PBS. Thirty minutes after antibody administration, Cr⁵¹-labelled MLN cells were injected, 4x10⁶ cells/100 µl. One hour post-injection of labelled cells, mice were euthanized and spleen, colon, and peyer's patch were collected, weighed, and total Cr⁵¹ radioactivity per organ was determined. Figure 16 is a bar graph of the results of these tests showing the relative ability of the antibodies to block homing of radiolabelled T cells to the colon of mice experiencing inflammatory bowel disease. Homing of T cells to inflamed colon was inhibited by hu504.32 and hu504.32R anti-beta7 antibodies relative to negative control, anti-GP120 antibody. Distribution to spleen was similar for all of the antibodies. Thus, the hu504.32 and hu504.32R anti-

12/1

129

beta7 antibodies effectively inhibit homing of T cells to inflamed colon *in vivo*

Antibody glycation does not affect the ability of hu504.32R variant to block MAdCAM-1 binding to alpha4beta7 receptor

Glycation, the non-enzymatic glycosylation of proteins, can affect antibody-ligand interactions (see, for example, Kennedy, D.M. et al., Clin Exp Immunol. 98(2):245-51 (1994))

5 Glycation of lysine at position 49 of the 504.32R Glycation of the lysine at light chain position 49 of the hu504.32R variant (HVR-L2 relative position B1) was observed but had no significant affect on the ability of the antibody variant to block the binding of MAdCAM-1 to alpha4beta7 receptor-expressing RPMI8866 cells. Determination of glycation and glycation levels was performed using

10 standard electrospray ionization-mass spectroscopy (ESI-MS) and by boronate affinity chromatography Boronate affinity HPLC methods useful to test for glycation are found at, for example, Quan C.P. et al. Analytical Chemistry 71(20):4445-4454 (1999) and Li Y.C. et al., J Chromatography A, 909 137-145 (2001) The cell adhesion assay was performed according to the RPMI8866/MAdCAM-1-Fc cell adhesion assay disclosed herein

15 In alternative embodiments of the invention, glycation at position 49 is reduced or eliminated where position 49 comprises an amino acid other than lysine. The polypeptide or antibody of the invention encompasses as an amino acid at position 49 (HVR-L2 relative position B1) any of amino acids A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y, where each letter refers to a amino acid according to the standard single-letter amino acid designation Alternatively,

20 the amino acid at position 49 of the light chain of a 504.32R variant (or other 504 variant) is selected from the group consisting of R, N, V, A, F, Q, H, P, I, or L. An amino acid useful at position 49 is selected, for example, by displaying (preparing a phage library of) the hu504.32R Fab on phage (variant) and substituting separately, at the codon for position 49, a codon for each of the 20 naturally occurring amino acids. Phage expressing the hu504.32R variants altered at position 49 are

25 tested for binding to integrin beta7 and/or to a receptor comprising integrin beta7, such as alpha4beta7 or alphaEbeta7 receptors Those variants which bind to beta7 integrin or the alpha4beta7 or alphaEbeta7 receptors are further screened for the ability to inhibit integrin beta7 receptor-ligand binding and *in vivo* efficacy as described herein Alternative, naturally or non-naturally occurring amino acids may be substituted at position 49 by standard mutagenesis

30 techniques and tested in the cell adhesion and *in vivo* assays described herein. Alternatively, the amino acid at position 49 of the light chain is an amino acid other than lysine (K), and amino acids at any other HVR or framework position or positions in the light chain and/or heavy chain is altered to select for a variant anti-beta7 binding polypeptide or antibody that exhibits binding affinity *in vitro* and *in vivo* biological activity, pharmacokinetics, drug clearance and immunogenicity useful

35 for reduction of inflammation by reducing the biological activity of integrin beta7 Mutagenesis and selection of such a polypeptide or antibody variant is performed as disclosed herein and according to other standard techniques Such a variant anti-beta7 binding polypeptide or antibody exhibits

130

integrin β 7 binding affinity within 10,000-fold, 1000-fold, alternatively within 100-fold, alternatively within 10-fold, alternatively within 5-fold, alternatively within 2-fold of the binding affinity exhibited by the any of the humanized Fc γ 504 variants disclosed herein

5 The foregoing written specification is considered to be sufficient to enable one skilled in the art to practice the invention. The present invention is not to be limited in scope by the construct deposited, since the deposited embodiment is intended as a single illustration of certain aspects of the invention and any constructs that are functionally equivalent are within the scope of this invention. The deposit of material herein does not constitute an admission that the written
10 description herein contained is inadequate to enable the practice of any aspect of the invention, including the best mode thereof nor is it to be construed as limiting the scope of the claims to the specific illustrations that it represents. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims

131

WHAT IS CLAIMED IS

- 1 An anti-beta7 binding polypeptide or antibody comprising:
- 5 (a) at least one HVR sequence selected from the group consisting of:
- (i) HVR-L1 comprising sequence A1-A11, wherein A1-A11 is
RASESVDTYLH (SEQ ID NO 1)
- 10 (ii) HVR-L2 comprising sequence B1-B8, wherein B1-B8 is KYASQSI (SEQ
ID NO.2)
- (iii) HVR-L3 comprising sequence C1-C10, wherein C1-C10 is QQGNSLLPNT
(SEQ ID NO 3)
- 15 (iv) HVR-H1 comprising sequence D1-D10, wherein D1-D10 is
GPFTTNNYWG (SEQ ID NO 4)
- (v) HVR-H2 comprising sequence E1-E17, wherein E1-E17 is
GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO 5), and
- 20 (vi) HVR-H3 comprising sequence F1-F11, wherein F1-F11 is MTGSSGYFDF
(SEQ ID NO 6)
- 2 The polypeptide or antibody of claim 1 comprising at least one variant HVR, wherein the
25 variant HVR comprises modification of at least one residue of any of the sequences depicted in SEQ
ID NO 1, 2, 3, 4, 5 or 6
- 3 The polypeptide or antibody of claim 2, wherein A8 in a variant HVR-L1 is S, D or T and
A9 is L.
- 30 4 The polypeptide or antibody of claim 2, wherein HVR-L1 comprises SEQ ID NO 1 or 7 or 8
or 9, HVR-L2 comprises SEQ ID NO 2 or 67 or 68, HVR-L3 comprises SEQ ID NO 3, HVR-H1
comprises SEQ ID NO 4, HVR-H2 comprises SEQ ID NO 5 and HVR-H3 comprises SEQ ID NO 6
or 66 for relative positions F2-F11 or comprises SEQ ID NO 63 or 64 or 65 for relative positions
35 F1-F11
- 5 The polypeptide or antibody of claim 2, wherein the polypeptide or antibody comprises one,

132

two, three, four, five or six hypervariable regions (HVRs) selected from the group consisting of HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein

- (i) HVR-L1 comprises amino acid sequence A1-A11, wherein A1-A11 is RASESVDTYLH (SEQ ID NO 1), RASESVDSLH (SEQ ID NO 7), RASESVDTLH (SEQ ID NO 8), or RASESVDDLH (SEQ ID NO 9) or a variant of SEQ ID NOs 1, 7, 8 or 9 wherein amino acid A2 is selected from the group consisting of A, G, S, T, and V and/or amino acid A3 is selected from the group consisting of S, G, I, K, N, P, Q, R, and T, and/or A4 is selected from the group consisting of R, V, Q, A, D, G, H, I, K, L, N, and R, and/or amino acid A5 is selected from the group consisting of S, Y, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, and V, and/or amino acid A6 is selected from the group consisting of V, R, I, A, G, K, L, M, and Q, and/or amino acid A7 is selected from the group consisting of D, V, S, A, R, G, H, I, K, L, N, P, S, and T, and/or amino acid A8 is selected from the group consisting of D, G, N, E, T, P, and S, and/or amino acid A9 is selected from the group consisting of L, Y, I, and M, and/or amino acid A10 is selected from the group consisting of L, A, I, M, and V and/or amino acid A11 is selected from the group consisting of H, Y, F, and S,
- (ii) HVR-L2 comprises amino acid sequence B1-B8, wherein B1-B8 is KYASQSI (SEQ ID NO 2), RYASQSI (SEQ ID NO 67, or XYASQSI (SEQ ID NO 68, where X represents any amino acid) or a variant of SEQ ID NOs 2, 67 or 68 wherein amino acid B1 is selected from the group consisting of K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y and X (where X represents any amino acid), and/or amino acid B4 is selected from the group consisting of S and D, and/or amino acid B5 is selected from the group consisting of Q and S, and/or amino acid B6 is selected from the group consisting of S, D, L, and R, and/or amino acid B7 is selected from the group consisting of I, V, E, and K,
- (iii) HVR-L3 comprises amino acid sequence C1-C9 wherein C1-C9 is QQGNLPT (SEQ ID NO.3) or a variant of SEQ ID NO 3 wherein amino acid C8 is selected from the group consisting of N, V, W, Y, R, S, T, A, F, H, I, L, M, and Y,
- (iv) HVR-H1 comprises amino acid sequence D1-D10 wherein D1-D10 is GFFITNNYWG (SEQ ID NO.4),
- (v) HVR-H2 comprises amino acid sequence E1-E17 wherein E1-E17 is GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO 5) or a variant of SEQ ID NO-5 wherein

amino acid E2 is selected from the group consisting of Y, F, V, and D, and/or amino acid E6 is selected from the group consisting of S and G, and/or amino acid E10 is selected from the group consisting of S and Y, and/or amino acid E12 is selected from the group consisting of N, T, A, and D, and/or amino acid E13 is selected from the group consisting of P, H, D, and A, and/or amino acid E15 is selected from the group consisting of L and V, and/or amino acid E17 is selected from the group consisting of S and G; and

(vi) HVR-H3 comprises amino acid sequence F2-F11 wherein F2-F11 is MTGSSGYFDF (SEQ ID NO 6) or RTGSSGYFDF (SEQ ID NO 66), or comprises amino acid sequence F1-F11, wherein F1-F11 is AMTGSSGYFDF (SEQ ID NO 63), ARTGSSGYFDF (SEQ ID NO 64), or AQTGSSGYFDF (SEQ ID NO 65), or a variant of SEQ ID NOs 6, 63, 64, 65, or 66 wherein amino acid F2 is R, M, A, E, G, Q, S, and/or amino acid F11 is selected from the group consisting of F and Y

6. The polypeptide or antibody of claim 2, wherein the antibody is humanized

7. The polypeptide or antibody of claim 2, wherein at least a portion of the framework sequence is a human consensus framework sequence

8. The polypeptide or antibody of claim 2, wherein said modification is substitution, insertion or deletion.

9. The polypeptide or antibody of claim 2, wherein a HVR-L1 variant comprises 1-10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10) substitutions in any combination of the following positions: A2 (A, G, S, T, or V), A3 (S, G, I, K, N, P, Q, R, or T), A4 (E, A, D, G, H, I, K, L, N, Q, R, or V), A5 (S, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, V, or Y), A6 (V, A, G, I, K, L, M, Q, or R), A7 (D, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, T, or V), A8 (S, D, E, G, P, T or N), A9 (L, Y, I, or M), A10 (L, A, I, M, or V), and A11 (H, F, S, or Y)

10. The polypeptide or antibody of claim 2, wherein a HVR-L2 variant comprises 1-4 (1, 2, 3, or 4) substitutions in any combination of the following positions: B1 (K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y, T, H, S, E, C, D, G, or M), B5 (Q or S), B6 (S, R or L), and B7 (I, T, E, K, or V)

11. The polypeptide or antibody of claim 2, wherein a HVR-L3 variant comprises at least one

174

substitution at position C3 (W, Y, R, S, A, F, H, I, L, M, N, T, or V).

- 5 12. The polypeptide or antibody of claim 2, wherein a HVR-H2 variant comprises 1-7 (1, 2, 3, 4, 5, 6, or 7) substitutions in any combination of the following positions: E2 (Y, V, D, or F), E6 (S or G), E10 (S or Y), E12 (N, A, D, or T), E13 (P, D, A, or H), E15 (L or V), E17 (S or G)
- 10 13. The polypeptide or antibody of claim 2, wherein a HVR-H3 variant comprises at 1 or 2 substitutions in any combination of the following positions: F2 (R, M, A, E, G, Q, R, or S), and F11 (F or Y)
14. The polypeptide or antibody of claim 2 comprising an HVR-L1 having the sequence of SEQ ID NO 7
- 15 15. The polypeptide or antibody of claim 2 comprising an HVR-L1 having the sequence of SEQ ID NO 8
- 20 16. The polypeptide or antibody of claim 2 comprising an HVR-L1 having the sequence of SEQ ID NO 9
17. The polypeptide or antibody of claim 2, further comprising at least one modification at a framework position, wherein the at least one modification is at heavy chain position 71 or 73 or 78
- 25 18. The polypeptide or antibody of claim 17, wherein the amino acid at position 71 is R or A, and the amino acid at position 73 is N or T, and the amino acid at position 78 is F or A or L.
- 30 19. The polypeptide or antibody of claim 17, comprising a heavy chain human subgroup III heavy chain consensus framework sequence comprising a substitution at position 71, 73 and/or 78
20. The antibody of claim 19, wherein the substitution is R71A, N73T, L78A or L78F
21. The polypeptide or antibody of claim 2 comprising an HVR-L3 having the sequence of SEQ ID NO 3
- 35 22. The polypeptide or antibody of claim 2, wherein A8 in a variant HVR-L1 is S

- 12/135
- 23 The polypeptide or antibody of claim 2, wherein A8 in a variant HVR-L1 is D
- 24 The polypeptide or antibody of claim 2, wherein A9 in a variant HVR-L1 is L.
- 5 25 The polypeptide or antibody of claim 2, wherein a framework sequence between sequence HVR-H2 positions E1-E1 and HVR-H3 positions F1-F11 is HFR3-1-HFR3-31 and wherein HFR3-6 is A or R, HFR3-8 is N or T, and HFR3-13 is L or A or F
- 10 26 A humanized anti-beta7 antibody, or beta7 binding fragment thereof, wherein monovalent affinity of the antibody or binding fragment to human beta7 is substantially the same as or greater than monovalent affinity of an antibody comprising light chain and heavy chain variable sequences as depicted in Fig. 1A (SEQ ID NO 10) and/or Fig. 1B (SEQ ID NO-11), or Fig. 9A (SEQ ID NO 12) and/or Fig. 9B (SEQ ID NO 13)
- 15 27 The antibody or binding fragment thereof of claim 26, wherein the affinity is at least 2-fold, at least 5-fold, at least 10-fold, at least 50-fold, at least 100-fold, at least 500-fold, at least 1000-fold, at least 5000-fold, or at least 10,000-fold greater than an antibody comprising light chain and heavy chain sequences depicted in Fig. 1A (SEQ ID NO 10) and Fig. 1B (SEQ ID NO 11), or Fig. 9A (SEQ ID NO 12) and Fig. 9B (SEQ ID NO 13)
- 20 28. The antibody or binding fragment of claim 27, wherein monovalent affinity of the antibody to human beta7 is at least 3-fold greater than monovalent affinity of an antibody comprising light chain and heavy chain sequences depicted in Fig. 1A (SEQ ID NO 10) and Fig. 1B (SEQ ID NO 11), or Fig. 9A (SEQ ID NO-12) and Fig. 9B (SEQ ID NO 13)
- 25 29 The antibody or binding fragment of claim 26 or 27 wherein the antibody comprising light chain and heavy chain sequences depicted in Fig. 1A (SEQ ID NO 10) and Fig. 1B (SEQ ID NO 11), or Fig. 9A (SEQ ID NO 12) and Fig. 9B (SEQ ID NO 13) is produced by hybridoma cell line deposited under American Type Culture Collection Accession Number
- 30 ATCC with designation HB-293
- 30 30 The antibody or binding fragment of claim 26, wherein the binding affinity is expressed as a Kd value.
- 35 31 The antibody or binding fragment of claim 26, wherein the binding affinity is measured by Biacore™ or radioimmunoassay

136

- 32 The polypeptide or antibody of claim 1 comprising human κ subgroup 1 light chain
consensus framework sequence
- 33 The polypeptide or antibody of claim 1 comprising heavy chain human subgroup III heavy
chain consensus framework sequence.
34. The antibody or binding fragment of claim 26, wherein the polypeptide or antibody
comprises one, two, three, four, five or six hypervariable regions (HVRs) selected from the group
consisting of HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, and HVR-H3, wherein
- (i) HVR-L1 comprises amino acid sequence A1-A11, wherein A1-A11 is
RASESVDITYLH (SEQ ID NO 1), RASESVDSLH (SEQ ID NO 7),
RASESVDTLH (SEQ ID NO 8), or RASESVDLLH (SEQ ID NO 9) or a
variant of SEQ ID NOs 1, 7, 8 or 9 wherein amino acid A2 is selected from the
group consisting of A, G, S, T, and V and/or amino acid A3 is selected from the
group consisting of S, G, I, K, N, P, Q, R, and T, and/or A4 is selected from the
group consisting of E, V, Q, A, D, G, H, I, K, L, N, and R, and/or amino acid A5 is
selected from the group consisting of S, Y, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, and V,
and/or amino acid A6 is selected from the group consisting of V, R, I, A, G, K, L,
M, and Q, and/or amino acid A7 is selected from the group consisting of D, V, S, A,
R, G, H, I, K, L, N, P, S, and T, and/or amino acid A8 is selected from the group
consisting of D, G, N, R, T, P and S, and/or amino acid A9 is selected from the
group consisting of L, Y, I and M, and/or amino acid A10 is selected from the group
consisting of L, A, I, M, and V and/or amino acid A11 is selected from the group
consisting of H, Y, F, and S,
- (ii) HVR-L2 comprises amino acid sequence B1-B8, wherein B1-B8 is KYASQGIS
(SEQ ID NO 2) RYASQGIS (SEQ ID NO 67, or KYASQGIS (SEQ ID NO 68,
where X represents any amino acid) or a variant of SEQ ID NOs 2, 67 or 68
wherein amino acid B1 is selected from the group consisting of K, R, N, V, A, F, Q,
H, P, I, L, Y and X (where X represents any amino acid), and/or amino acid B4 is
selected from the group consisting of S and D, and/or amino acid B5 is selected
from the group consisting of Q and S, and/or amino acid B6 is selected from the
group consisting of S, D, L, and R, and/or amino acid B7 is selected from the group
consisting of I, V, E, and K,
- (iii) HVR-L3 comprises amino acid sequence C1-C9, wherein C1-C9 is QQGNSLPNT
(SEQ ID NO:3) or a variant of SEQ ID NO:3 wherein amino acid C8 is selected

13x

from the group consisting of N, V, W, Y, R, S, T, A, F, H, I, L, M, and Y

(iv) HVR-H1 comprises amino acid sequence D1-D10 wherein D1-D10 is
GFFFTNNYWG (SEQ ID NO.4),

(v) HVR-H2 comprises amino acid sequence E1-E17 wherein E1-E17 is
GYISYSGSTSYNPSLK (SEQ ID NO.5) or a variant of SEQ ID NO.5 wherein
amino acid E2 is selected from the group consisting of Y, F, V and D and/or amino
acid E6 is selected from the group consisting of S and G, and/or amino acid E10 is
selected from the group consisting of S and Y, and/or amino acid E12 is selected
from the group consisting of N, T, A and D, and/or amino acid E13 is selected from
the group consisting of P, H, D, and A, and/or amino acid E15 is selected from the
group consisting of L and V, and/or amino acid E17 is selected from the group
consisting of S and G; and

(vi) HVR-H3 comprises amino acid sequence F2-F11 wherein F2-F11 is
MTGSSGYFDF (SEQ ID NO.6) or RTGSSGYFDF (SEQ ID NO.66), or comprises amino
acid sequence F1-F11, wherein F1-F11 is AMTGSSGYFDF (SEQ ID NO.63),
ARTGSSGYFDF (SEQ ID NO.64), or AQTGSSGYFDF (SEQ ID NO.65), or a variant of
SEQ ID NOs 6, 63, 64, 65, or 66 wherein amino acid F2 is R, M, A, E, G, Q, S, and/or
amino acid F11 is selected from the group consisting of F and Y

The antibody or binding fragment of claim 34, wherein heavy chain framework position 71
comprises amino acid R or A, and/or heavy chain framework position 73 comprises T or N
and/or heavy chain framework position 78 comprises F or A or L, sequence comprises at
heavy chain framework position 71

36. A method of inhibiting the interaction of a human beta7 integrin subunit with a second
integrin subunit and/or a ligand by contacting the antibody of claim 2 with the beta7
integrin.

37. The method of claim 36, wherein the second integrin subunit is alpha4 integrin subunit, and
wherein the ligand is MAdCAM, VCAM or fibronectin

38. The method of claim 37, wherein the alpha4 integrin subunit is from human

39. The method of claim 38, wherein the ligand is from human.

138

- 40 The method of claim 36, wherein the second integrin subunit is alphaE integrin subunit, and wherein the ligand is E-cadherin.
- 5 41 The method of claim 40, wherein the alphaE integrin subunit is from human
- 42 The method of claim 41, wherein the ligand is from human.
- 10 43 The method of claim 36, wherein the inhibiting reduces or alleviates symptoms of a disorder selected from the group consisting of inflammation, asthma, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, diabetes, inflammation resulting of organ transplantation, graft versus host disorder and inflammation associated with allograft disorders
- 15 44. A method of modulating beta7 integrin-mediated cellular adhesion and/or recruitment in a mammal experiencing a disorder by administering to the mammal an effective amount of a composition comprising the polypeptide or antibody of claim 2 and a pharmaceutical carrier
- 20 45 The method of claim 44, wherein the disorder is selected from the group consisting of inflammation, asthma, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, diabetes, inflammation resulting of organ transplantation, graft versus host disorder, and inflammation associated with allograft disorders
- 25 46 The method of claim 44, wherein the mammal is a human
- 47 The method of claim 44, further comprising administering a second biopharmaceutical agent or chemotherapeutic agent.
- 30 48 The method of claim 44, wherein the modulating inhibits interaction of beta7 integrin with alpha4 integrin, alphaE integrin, MAdCam, VCAM, E-cadherin, and/or fibronectin.
- 49 A composition comprising an anti-beta7 binding polypeptide, antibody, or binding fragment thereof according to any one of claims 1, 2, 5, 26 or 34, and a pharmaceutical carrier
- 35 50 An article of manufacture comprising a composition comprising an anti-beta7 binding polypeptide, antibody, or binding fragment thereof according to any one of claims 1, 2, 5, 26 or 34, and a pharmaceutical carrier, and a label indicating that the composition is for use in a

179

WO 2006/026759

PCT/US2005/031401

method of treating a disorder, wherein the disorder is selected from the group consisting of inflammation, asthma, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, diabetes, inflammation resulting of organ transplantation, graft versus host disorder, and inflammation associated with allograft disorders

[illegible]

Kat5b 30 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75
1482
huc1 Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S L E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I
P5004 Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S L E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I
504K graft Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S L E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I

70 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108
 hnf1 S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q N S L P W T F G Q G T K V E I K R (SEQ ID NO:25)
 FBNR4 S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q N S L P W T F G Q G T K V E I K R (SEQ ID NO:10)
 604K.org S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q N S L P W T F G Q G T K V E I K R (SEQ ID NO:25)

Pos. 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
Isolate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Isolate	EV	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	
Flu804	EV	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	
804K graft	EV	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	

hnm III 8 L R A E D T A V Y Y C A R G F D Y W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO. 24)

FBH44 8 L R A E D T A V Y Y C A R G F D Y W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO. 11)

BMK cont 8 L R A E D T A V Y Y C A R G F D Y W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO. 2)

1/22

PCT/US2005/031401

747

FIG 1C

Humanized Variants of Fib504

HVR-L1 and L2 substitutions,
Fib504-K RF framework

BIACore
Affinity
Assay (nM)

504K-RF residues	L1	L2	
<u>Variant</u>			
68	R A S E S V D T L H	K Y A S Q S I S	
74	R A S E S V D L H	K Y A S Q S I S	
504-32	R A S E S V D L H	K Y A S Q S I S	35
51	R A S E S V D L H	K Y A S Q S I S	
59	R A S E S V D L H	K Y A S Q S I S	
504-5	R A S E S V D L H	K Y A S Q S I S	9
60	R A S E S V D L H	K Y A S Q S I S	
96	R A S E S V D T L H	K Y A S Q S I S	
83	R A S E S V D T L H	K Y A S Q S I S	
504-16 (8)	R A S E S V D T L H	K Y A S Q S I S	23.4
504-RF (29)	R A S E S V D T Y L H	K Y A S Q S I S	132

W/O 2006/02/759

PCT/US2006/031401

Handwritten signature

3/22

Human Consensus

FIG 2A

Light chain (kappa I)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTCRASQISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAA~~SSLES~~
GVPSRFRSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCOOYNSLEWTFGQGTKVEIKRTVA
APSVFI~~PPSDEQL~~KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSITLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO-27)

FIG 2B

Heavy chain (subgroup III)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVISGD
GGSTYYADSVKGRFTISRDNSENILYLQMNSLR~~AEDTAVYYCAMTGSSGYDE~~
WGQGILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSCDKTHITCPPCAP~~ELLGGPSVFLPPPK~~PDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREBQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO 28)

4/22

Fib504 graft

FIG 3A

Light chain

DIQMTQSPSSLSASVQDRVITTCRASESVDTYLHWYQQKPGKAPKLLIYYASOSIS
GVPSRFSGSGSGIDFILTISSLPEDFATYYCOQNSLPNTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIHPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO-29)

FIG 3B

Heavy chain

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGWVRQAPGKGLFWVGYISY
SGSTSYNPSLKSRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAMTGS~~SGY~~EDFW
GQGILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHITPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTHITCPPCPAPELGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPRHEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALH
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO-30)

5/22

Fib504K graft

FIG 4A

Light chain

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTCRASESVDYTLHWYQQKPGKAPKLLIKYASOSIS
GVPSRFSGSGSGTIDFILTISLQPEDFATYYCOGNSLENTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSITLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO 31)

FIG 4B

Heavy chain

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEITNNYWGQWVRQAPGKGLEWVGYSY
SGSTSYNPSLKSRFTISADTSKNTAYLQMNSLRADTA VYYCAMTGSSGYEDFW
GQGILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSQA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNEKPSNTKVDKKVEP
KSCDKHTCPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFRSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:30)

6/22

Fib504K-RF graft

FIG. 5A

Light chain

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASESVDITLHWYQQKPGKAPKLLIKYASOSIS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCOQNSLENTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYRKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:31)

FIG 5B

Heavy chain

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGWVRQAPGKGLEWVQYISY
SGSTSYNPSLKSRFTISRDTSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCAMTGSSGYFDFW
GQOTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKITHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHREALH
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:32)

146

7/22

Humanized variant 504.32

FIG 6A

Light chain

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDDLLHWYQQKPGKAPKLLIKYASOSIS
GVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCOGNSLENTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSITLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO 33)

FIG 6B

Heavy chain

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGQWVRQAPGKGLEWVGXISY
SGSTSYNPSLKSRFTISRDTSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCAMTGSSGYEDFW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVEITFPVAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTIQTICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKHTHTCPPCPAPFLLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREBQYNSTYRVVSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTIPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVMHREALH
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO 32)

1 ZDIQMTQSP88LSASVGDRVITC[REDACTED]WYQQKPGKAPKLLIY[REDACTED]GVP8RF8G8G8GTDFTLT188LQP
1X DIQMTQSP88LSASVGDRVITC[REDACTED]WYQQKPGKAPKLLIY[REDACTED]GVP8RF8G8G8GTDFTLT188LQP
2 DIVMTQSPFLSLFVTPGEPASISG[REDACTED]WYLQKPGQSPQLLIY[REDACTED]GVPDRF8G8G8GTDFTLK18RVEA
3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC[REDACTED]WYQQKPGQAPRLLIY[REDACTED]GIPDRF8G8G8GTDFTLT18RLEP
4 DIVMTQSPD8LAVSLGERATING[REDACTED]WYQQKPGQPPKLLIY[REDACTED]GVPDRF8G8G8GTDFTLT188LQA

FIG 7A

WO 2006/026759

8/22

PCT/US2005/031401

14X

EDFATYYC[REDACTED]FGQGTKVEIK SEQ ID NO 14
EDFATYYC[REDACTED]FGQGTKVEIK SEQ ID NO 15
EDVGYYC[REDACTED]FGQGTKVEIK SEQ ID NO 16
EDFAVYYC[REDACTED]FGQGTKVEIK SEQ ID NO 17
EDVAVYYC[REDACTED]FGQGTKVEIK SEQ ID NO 18

FIG 7B

WO 2006/026759

9/22

PCT/US2005/031401

FF

148

I
A QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
B QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS
C QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS
D QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS

II
A QVQLQESGPGLVKPSQTLSELTCTVSGGSVS
B QVQLQESGPGLVKPSQTLSELTCTVS
C QVQLQESGPGLVKPSQTLSELTCTVS
D QVQLQESGPGLVKPSQTLSELTCTVS

III
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS

Acceptor
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS

Second Acceptor
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS

FIG 8A

WO 2006/025799

10/22

PCT/US2005/031401

149

RVTI TADTSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 19
RVTI TADTSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 20
RVTI TADTSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 21
RVTI TADTSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 22

RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 48
RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 49
RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 50
RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 51

RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 52
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 53
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 54
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 55

RFTIS [REDACTED] SKNT [REDACTED] YLQMNSLRAEDTAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 56
RFTIS [REDACTED] SKNT [REDACTED] YLQMNSLRAEDTAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 57
RFTIS [REDACTED] SKNT [REDACTED] YLQMNSLRAEDTAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 58

RFTIS [REDACTED] SKNT [REDACTED] YLQMNSLRAEDTAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 59
RFTIS [REDACTED] SKNT [REDACTED] YLQMNSLRAEDTAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 60
RFTIS [REDACTED] SKNT [REDACTED] YLQMNSLRAEDTAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 61
RFTIS [REDACTED] SKNT [REDACTED] YLQMNSLRAEDTAVYYCAR [REDACTED] WQGGTLVTVSS SEQ ID NO. 62

FIG 88

W/O 2006/026739

11/22

PCT/US2005/031401

Handwritten mark resembling a stylized 'F' or 'P' with a diagonal line.

150

151

12/22

Rat anti-mouse Fib504 variable domains

FIG 9A

Variable Light chain

DVVMTQSPATLSVTPGERISLSCRASESVDTYLHWYQQKPNESPRLLIKYASOSIS
GIPSRPSGSGSGTDFTLSINGVELEDLSIYYCOQGNLENTFGAGTKLELKRADAA
PTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVLDSTVDQD
SKDSTYS (SEQ ID NO-12)

FIG 9B

Variable Heavy chain

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGFEITNNYWGWIWKFPGNKMEWMGYISYS
GSTSYNPSLKSRIITRDTSKNQFFQLNSVTTEDTATYYCAMTGSSGYEDFWGP
GTMVTVSSAETTAPSVYFLAPGTALKSNSMVTLGCLV (SEQ ID NO 13)

13/22

FIG 10A

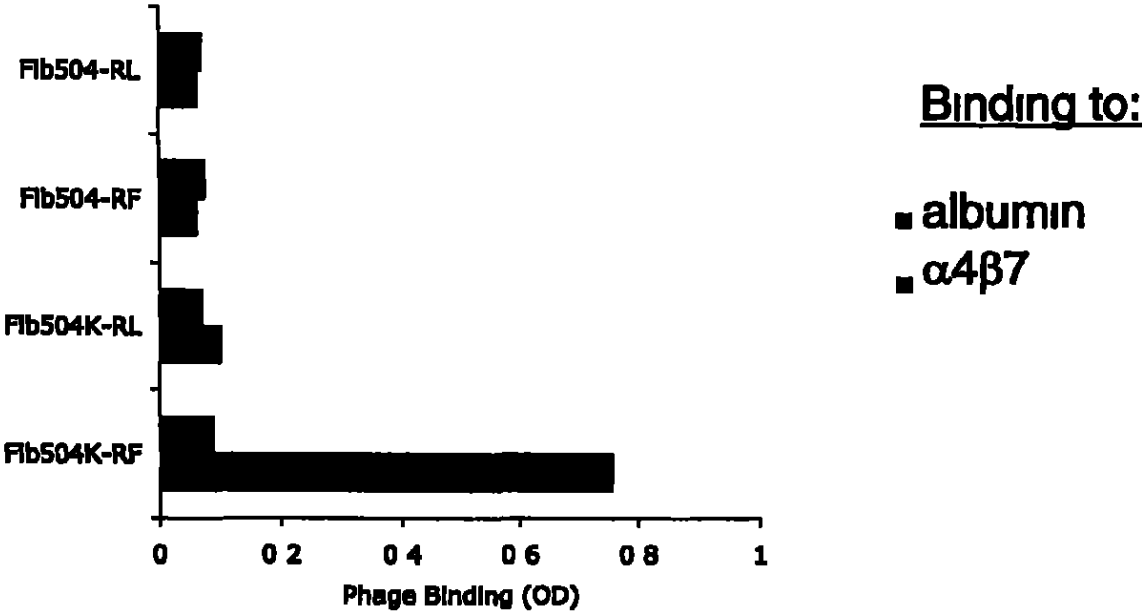
Comparison of VH Framework Sequences

	Framework Region H3							
	71	72	73	74	75	76	77	78
hu subgroup I	A	D	T	S	T	S	T	A
hu subgroup II	V	D	T	S	K	N	Q	
hu subgroup III	R	D	N	S	K	N	T	
Herceptin	A	D	T	S	K	N	T	A
Fib504	R	D	T	S	K	N	Q	
Fib504-RL	R	D	T	S	K	N	T	
Fib504-RF	R	D	T	S	K	N	T	

153

153

Figure 10B



754

004.10		Human	codon	amino acids	amino acids			
		amino acids	amino acids	amino acids				
HVR-H1								
			WTC	FTIS	F			
			WTC	IF	I			
			ASC	TS	T			
			ANC	NS	N			
			WAC	NY	N			
HVR-H2			WNT	YADS	Y			
			WBE	WHAL	W			
			REC	GS	G			
			REC	GS	G			
			WNT	YVDF	Y	V	D	F
			WNT	YGCD	Y			
HVR-H3			REC	SG	S	G		
			TNT	SY	S	Y		
			RNC	NADT	N	A	D	T
			SNT	PRAN	P	D	A	N
			STG	LV	L	V		
HVR-H4			REC	SG	S	G		
			ANC	NR	N			
			REC	TGAS	T			
HVR-H5								
			TWC	FY	F	Y		

WO 2006/026759

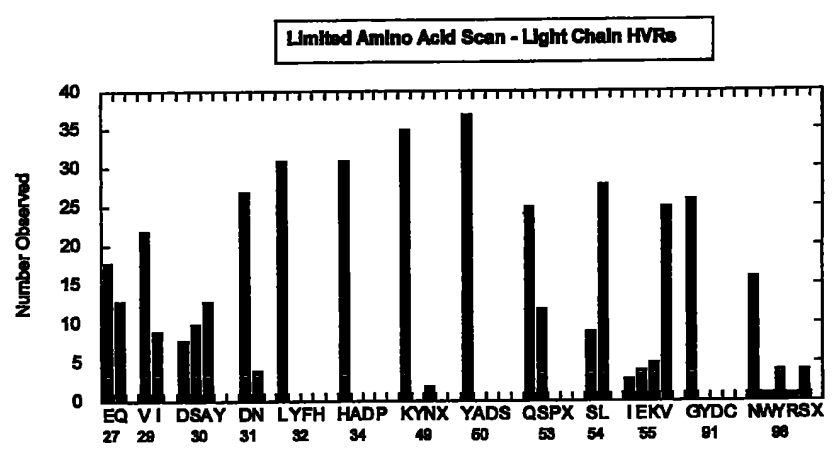
15/22

PCT/US2005/031401



WO 2006/026759

FIG 11B



16/22

PCT/US2006/031401

FF

18/22

FIG 12

amino acid position	amino acid number of times observed															
	A	G	S	I	Y											
A25		2	11	7	9											
S26	G 4	I 2	K 3	N 8	P 1	Q 1	R 7		I 6							
E27	A 6	D 8		G 2	H 1	I 1	K 4	L 1	N 2	Q 5	R 1	Y 2				
S28	A 1	D 1	G 7	H 1	I 1	K 1	N 9	P 3	R 7		I 4	Y 1	Y 1			
V29	A 11	G 6	I 3	K 1	L 9	M 6	Q 1	R 1								
D30	A 3		E 9	G 3	H 3	I 1	K 1	L 1	N 6	P 1	S 1	I 2	Y 3			
D31		E 13	G 2	N 1												
L32	I 1		M 4													
L33	A 1	I 5		M 1	Y 22											
H34	E 1		Y 4	S 1												
N96	A 2	E 6	H 1	I 3		M 3	N 2	R 2	S 2	I 4	Y 2	W 16	Y 3			
M94	A 1	E 3	G 1		Q 10	R 24	S 8									

HVR-L1

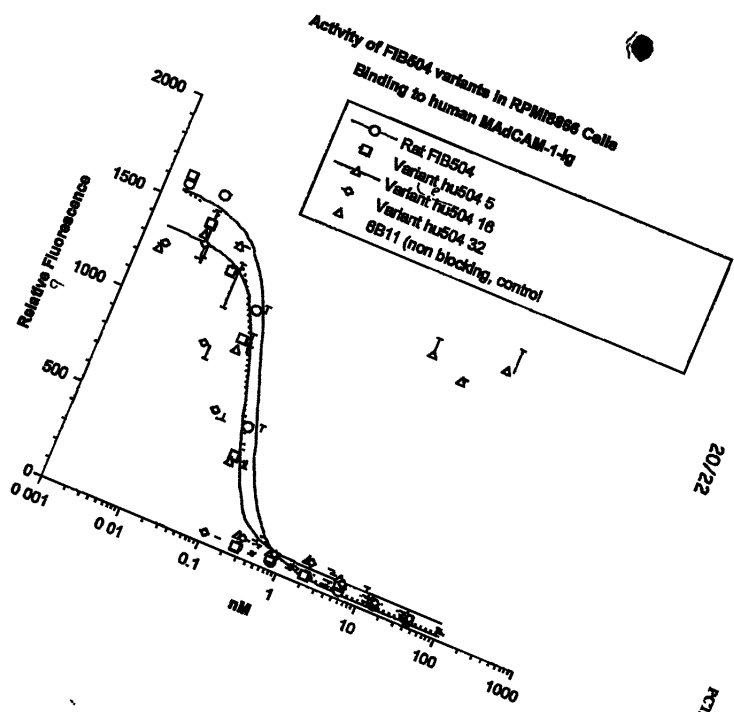
HVR-L2

HVR-H3

NOTE. The most frequently observed amino acid is shaded.

[illegible]

FIG. 14



157

20/22

112

Figure 16

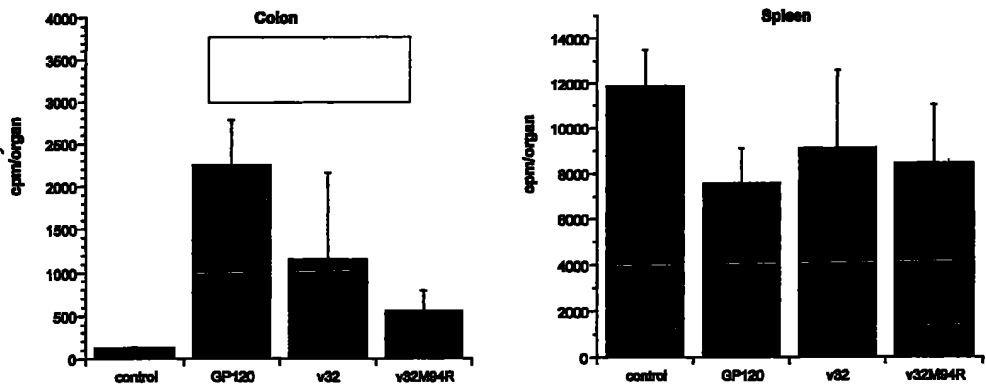
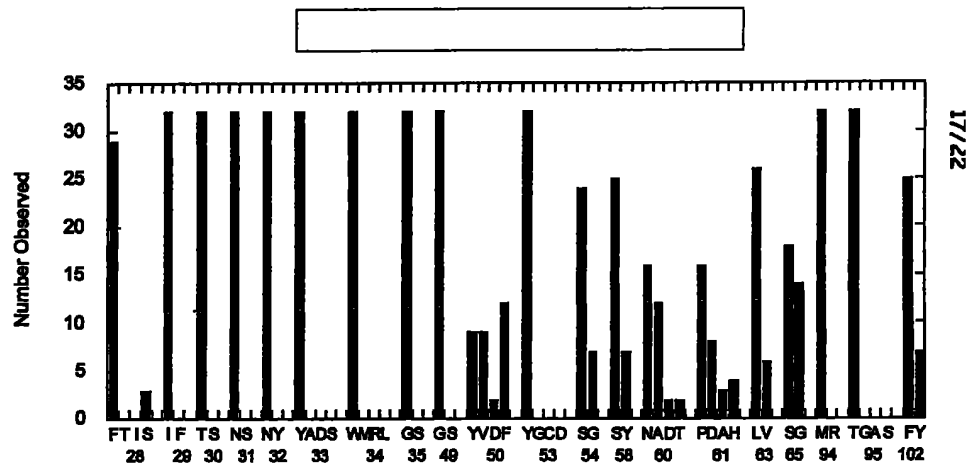


FIG. 11C

Limited Amino Acid Scan – Heavy Chain HVRs



102

P2159R1 PCT Sequence Listing
Sequence Listing

<110> GENENTECH, INC
<120> HUMANIZED ANTI-BETA7 ANTAGONISTS AND USES THEREFOR
<130> P2159R1 PCT
<140> PCT/US2005/031401
<141> 2005-09-02
<150> US 60/607,377
<151> 2004-09-03
<160> 68
<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sequence is synthesized
<400> 1
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr Leu His
5 10
<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sequence is synthesized
<400> 2
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
5
<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sequence is synthesized
<400> 3
Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Asn Thr
5
<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sequence is synthesized
<400> 4
Gly Phe Phe Ile Thr Asn Asn Tyr Trp Gly
5 10
<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial sequence

107 163

P2159R1 PCT Sequence Listing

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 5
Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
1 5 10 15
Lys Ser

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 6
Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
5 10

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 7
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Leu Leu His
5 10

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 8
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Leu Leu His
5 10

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 9
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asp Leu Leu His
5 10

<210> 10
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 10

104 164

P2159R1 PCT Sequence Listing

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

<210> 11
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 11
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Phe Phe Ile Thr
20 25 30
Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Met
35 40 45
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
50 55 60
Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys
65 70 75
Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr
80 85 90
Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp
95 100 105
Phe Trp Gly Pro Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 12
<211> 174
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 12
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro
1 5 10 15

157

165

P2159R1 PCT Sequence Listing

Gly Glu Arg Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp
20 25 30
Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Glu Ser Pro Arg
35 40 45
Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile
65 70 75
Asn Gly Val Glu Leu Glu Asp Leu Ser Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Gly Asn Ser Leu Pro Asn Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
95 100 105
Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
110 115 120
Ser Met Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Thr Val Val Cys Phe
125 130 135
Val Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Asp Ile Ser Val Lys Trp Lys Ile
140 145 150
Asp Gly Ser Glu Gln Arg Asp Gly Val Leu Asp Ser Val Thr Asp
155 160 165
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
170

<210> 13
<211> 146
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 13
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Phe Phe Ile Thr
20 25 30
Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Met
35 40 45
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
50 55 60
Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys
65 70 75
Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr
80 85 90
Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp
95 100 105
Phe Trp Gly Pro Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Glu Thr
110 115 120
Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu Lys
Página 4

166

P2159R1 PCT Sequence Listing

125

130

135

Ser Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val
140 145

<210> 14
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 14
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
50 55 60
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 15
<211> 79
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 15
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
35 40 45
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
50 55 60
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys
65 70 75
Val Glu Ile Lys

<210> 16
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 16

10/1

167

P2159R1 PCT Sequence Listing

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

<210> 17
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 17
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15
Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
50 55 60
Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 18
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 18
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15
Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
50 55 60
Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

708

268

P2159R1 PCT Sequence Listing

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 19
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 19
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg
35 40 45
Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
50 55 60
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 20
<211> 81
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 20
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 21
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 21
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
Página 7

169

169

P2159R1 PCT Sequence Listing

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

<210> 22
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 22
Gln Val Gln Leu Val
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Val
20 25 30
Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45
Thr Ser Thr Ser Thr
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val
65 70 75
Thr Val Ser Ser

<210> 23
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 23
Asp Ile Gln Met Thr
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr
20 25 30
Asn Tyr Leu Ala Trp
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser
65 70 75

170

170

P2159R1 PCT Sequence Listing

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 24

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 24

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

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

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

Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110

<210> 25

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 25

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

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

171

P2159R1 PCT Sequence Listing

Gly Asn Ser Leu Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 26
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 26
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Ile Thr
20 25 30
Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
50 55 60
Pro Ser Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
65 70 75
Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
80 85 90
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp
95 100 105
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 27
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 27
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
20 25 30
Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

172

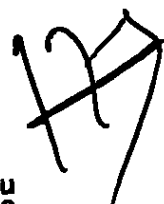
P2159R1 PCT Sequence Listing

95	100	105
Ile Lys Arg Thr Val	Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	Pro
110	115	120
Ser Asp Glu Gln Leu	Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys	Leu
125	130	135
Leu Asn Asn Phe Tyr	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys	Val
140	145	150
Asp Asn Ala Leu Gln	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr	Glu
155	160	165
Gln Asp Ser Lys Asp	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu	Thr
170	175	180
Leu Ser Lys Ala Asp	Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys	Glu
185	190	195
Val Thr His Gln Gly	Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe	Asn
200	205	210
Arg Gly Glu Cys		

<210> 28
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 28
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe
 95 100 105
 Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 110 115 120
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 125 130 135
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 140 145 150
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 155 160 165



P2159R1 PCT Sequence Listing

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 170 175 180
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 185 190 195
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 200 205 210
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 215 220 225
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 320 325 330
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 335 340 345
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 350 355 360
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 365 370 375
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 380 385 390
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 395 400 405
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 410 415 420
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 425 430 435
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 440 445

<210> 29

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

<400> 29

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

HHF 174

P2159R1 PCT Sequence Listing

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

<210> 30
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial sequence -

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 30
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Ile Thr
20 25 30
Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
50 55 60
Pro Ser Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
65 70 75
Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

175

P2159R1 PCT Sequence Listing

80	85	90
Ala Val Tyr Tyr Cys	Ala Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp	
95	100	105
Phe Trp Gly Gln Gly	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	
110	115	120
Lys Gly Pro Ser Val	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr	
125	130	135
Ser Gly Gly Thr Ala	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe	
140	145	150
Pro Glu Pro Val Thr	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	
155	160	165
Gly Val His Thr Phe	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr	
170	175	180
Ser Leu Ser Ser Val	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr	
185	190	195
Gln Thr Tyr Ile Cys	Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys	
200	205	210
Val Asp Lys Lys Val	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr	
215	220	225
Cys Pro Pro Cys Pro	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val	
230	235	240
Phe Leu Phe Pro Pro	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp	
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His	
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	
290	295	300
Arg Val Val Ser Val	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn	
305	310	315
Gly Lys Glu Tyr Lys	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala	
320	325	330
Pro Ile Glu Lys Thr	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu	
335	340	345
Pro Gln Val Tyr Thr	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys	
350	355	360
Asn Gln Val Ser Leu	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
365	370	375
Asp Ile Ala Val Glu	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	
380	385	390
Tyr Lys Thr Thr Pro	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
395	400	405
Leu Tyr Ser Lys Leu	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly	
410	415	420

176
176

P2159R1 PCT Sequence Listing

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
425 430 435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
440 445

<210> 31
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 31
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp
20 25 30
Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Gly Asn Ser Leu Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
110 115 120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
125 130 135
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
140 145 150
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
155 160 165
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
170 175 180
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185 190 195
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200 205 210
Arg Gly Glu Cys

<210> 32
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

P2159R1 PCT Sequence Listing

<400> 32

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Ile Thr
20 25 30
Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
50 55 60
Pro Ser Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
65 70 75
Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
80 85 90
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp
95 100 105
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
110 115 120
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
125 130 135
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
140 145 150
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
155 160 165
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
170 175 180
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
185 190 195
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
200 205 210
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
215 220 225
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
320 325 330
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu

Handwritten signature and number 178

P2159R1 PCT Sequence Listing

335	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys	345
350		355
365	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	375
380	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	390
395	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	405
410	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly	420
425	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His	435
440	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	445

<210> 33
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 33
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp
 20 25 30
 Asp Leu Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Gly Asn Ser Leu Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 110 115 120
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 125 130 135
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 140 145 150
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180

HA 179

P2159R1 PCT Sequence Listing

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185 190 195

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200 205 210

Arg Gly Glu Cys

<210> 34
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 34
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 35
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 35
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
5 10

<210> 36
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 36
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 37
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
5 10

<210> 38
<211> 25

120

P2159R1 PCT Sequence Listing

<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 38
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 39
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 39
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 40
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 40
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30
Ala

<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 41
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 42
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 42
Arg Phe Thr Ile Ser Xaa Asp Xaa Ser Lys Asn Thr Xaa Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

121

Ala

<210> 43
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 43
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 44
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 44
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 45
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 45
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Phe Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 46
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 46

1782

P2159R1 PCT Sequence Listing

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Phe Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 47
Ala Ser Glu Ser Val Asp Asp Leu Leu His
5 10

<210> 48
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg
35 40 45
Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
50 55 60
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 49
<211> 81
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 49
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60

183

P2159R1 PCT Sequence Listing

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

<210> 50
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 50
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75
Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 51
<211> 79
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 51
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75
Thr Val Ser Ser

<210> 52
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

174

P2159R1 PCT Sequence Listing

<400> 52
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
 35 40 45
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 50 55 60
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 65 70 75
 Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 80 85

<210> 53
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 53
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 35 40 45
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 80

<210> 54
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 54
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 35 40 45
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60

185

P2159R1 PCT Sequence Listing

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 55
<211> 79
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 55
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75
Thr Val Ser Ser

<210> 56
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 56
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
35 40 45
Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
50 55 60
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 57
<211> 81
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

12A 186

P2159R1 PCT Sequence Listing

<400> 57
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 58
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 58
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75
Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 59
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 59
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
35 40 45
Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
50 55 60
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75

124 187

P2159R1 PCT Sequence Listing

65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 60
<211> 81
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 60
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 61
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 61
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75
Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 62
<211> 79
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 62

12/18

P2159R1 PCT Sequence Listing

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

<210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 63
Ala Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
5 10

<210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 64
Ala Arg Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
5 10

<210> 65
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 65
Ala Gln Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
5 10

<210> 66
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 66
Arg Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
5 10

<210> 67
<211> 8

1289 139

P2159R1 PCT Sequence Listing

<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 67
Arg Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
5

<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 68
Xaa Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
5

1a0

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. application No.
PCT/US2005/031401

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV C07K16/28 A61K39/395 C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PICARELLA D ET AL "MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR BETA7 INTEGRIN AND MUCOSAL ADDRESSIN CELL ADHESION MOLECULE-1 (MADCAM-1) REDUCE INFLAMMATION IN THE COLON OF SCID MICE RECONSTITUTED WITH CD45RBHIGH CD4+T CELLS" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO BALTIMORE, US, vol 158, 1997, pages 2099-2106, XP001030596 ISSN 0022-1767 abstract page 2100, left-hand column, paragraph 3 figure 4 page 2105, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 4 ----- -/-	1,2,4-8, 36-50

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

Special categories of cited documents

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

☒ earlier document but published on or after the International filing date

☒ document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (see specified)

☒ document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

☒ document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

☒ later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

☒ document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

☒ document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

☒ document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search
20 June 2006

Date of mailing of the International search report
14/07/2006

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.O. 6618 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer
Irion, A

191

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor of application No
PCT/US2005/031401

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/24673 A (LEUKOSITE, INC, BRISKIN, MICHAEL, J, RINGLER, DOUGLAS, J, PICARELLA, D) 15 August 1996 (1996-08-15) page 6, line 1 - line 29 page 38, line 3 - line 17 page 40, line 24 - page 42, line 19	1,2,4-8, 36-50
Y		3,9-35
X	SUN XUEYING ET AL "beta7 Integrins contribute to skin graft rejection " TRANSPLANTATION (BALTIMORE), vol 74, no 8, 27 October 2002 (2002-10-27), pages 1202-1203, XP009067864 ISSN 0041-1337 abstract	1,2,4-8, 36-50
X	TIDSWELL M ET AL "Structure-function analysis of the integrin beta 7 subunit identification of domains involved in adhesion to MAdCAM-1" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILLIAMS & WILKINS CO, US, vol 159, no 3, 1 August 1997 (1997-08-01), pages 1497-1505, XP002200150 ISSN 0022-1767 cited in the application the whole document	1,2,4-8, 36-50
X	WO 00/40604 A (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC, BRENNER, MICHAEL, B, PARKER, CH) 13 July 2000 (2000-07-13) page 9, line 12 - line 24 page 20, line 28 - page 21, line 9 page 22, line 15 - line 26	1,2,4-8, 36-50
Y		3,9-35
Y	LEE C V ET AL "High-affinity Human Antibodies from Phage-displayed Synthetic Fab Libraries with a Single Framework Scaffold" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol 340, no 5, 23 July 2004 (2004-07-23), pages 1073-1093, XP004518119 ISSN 0022-2836 the whole document	3,9-35
Y	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US, 2004, "Methods in Molecular Biology" XP002386207 Database accession no PREV200600158659 abstract	3,9-35
	-/-	

19X 192

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l application No
PCT/US2005/031401

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY HUMANA PRESS INC, 999 RIVERVIEW DR, STE 208, TOTOWA, NJ 07512-1165 USA SERIES METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (ISSN 1064-3745(PRINT)), 2004, ISSN 1-58829-092-1(H)	
Y	WU H ET AL "STEPWISE IN VITRO AFFINITY MATURATION OF VITAXIN, AN ALPHAVBETA3-SPECIFIC HUMANIZED MAB" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol 95, no 11, 26 May 1998 (1998-05-26), pages 6037-6042, XP000918969 ISSN 0027-8424 the whole document	3,9-35
Y	RADER C ET AL "A PHAGE DISPLAY APPROACH FOR RAPID ANTIBODY HUMANIZATION DESIGNED COMBINATORIAL V GENE LIBRARIES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol 95, 21 July 1998 (1998-07-21), pages 8910-8915, XP000941357 ISSN 0027-8424 the whole document	3,9-35
Y	YANG W-P ET AL "CDR WALKING MUTAGENESIS FOR THE AFFINITY MATURATION OF A POTENT HUMAN ANTI-HIV-1 ANTIBODY INTO THE PICOMOLAR RANGE" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol 254, 1995, pages 392-403, XP000199739 ISSN 0022-2836 the whole document	3,9-35
Y	HANES J ET AL "PICOMOLAR AFFINITY ANTIBODIES FROM A FULLY SYNTHETIC NAIVE LIBRARY SELECTED AND EVOLVED BY RIBOSOME DISPLAY" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol 18, no 12, December 2000 (2000-12), pages 1287-1292, XP001121946 ISSN 1087-0156 the whole document	3,9-35

-/-

197 793

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/031401

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TORAN J L ET AL "Improvement in affinity and HIV-1 neutralization by somatic mutation in the heavy chain first complementarity-determining region of antibodies triggered by HIV-1 infection" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, DE, vol 31, no 1, January 2001 (2001-01), pages 128-137, XP002239557 ISSN 0014-2980 the whole document	3,9-35
P,X	WO 2005/080432 A (GENENTECH, INC, DENNIS, MARK S) 1 September 2005 (2005-09-01) the whole document	1-50

194

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/031401

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons.

- 1 ☒ Claims Nos. because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority namely
Although claims 36-48 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition
- 2 ☐ Claims Nos. because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically
- 3 ☐ Claims Nos. because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

- 1 ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
- 2 ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee this Authority did not invite payment of any additional fee.
- 3 ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.
- 4 ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

1097

195

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. application No
PCT/US2005/031401

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9624673	A	15-08-1996	AU	4986296 A	27-08-1996
			CA	2212702 A1	15-08-1996
			EP	0808367 A1	26-11-1997
			JP	10513365 T	22-12-1998
			NZ	303523 A	01-02-2002
WO 0040604	A	13-07-2000	AU	2390400 A	24-07-2000
WO 2005080432	A	01-09-2005	NONE		

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad
Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
9 de Marzo de 2006 (09 03 2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/026759 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes.
C07K 16/28 (2006 01) C07K 16/18 (2006 01)
A61K 39/395 (2006 01)
(21) Numero de Solicitud Internacional
PCT/IB2005/031401

(22) Fecha de Presentación Internacional
2 de Septiembre de 2005 (02 09 2005)

(25) Lenguaje de entrega Inglés

(26) Lenguaje de Publicación Inglés

(30) Datos de la Prioridad
60/607 377 3 de Septiembre de 2004 (03 09 2004) EU

(71) Solicitante (para todos los estados designados
excepto US) GENENTECH, INC. [EU/EU] 1 DNA
Way, South San Francisco CA 94080-4990 (US)

(72) Inventores, e

(73) Inventores/solicitantes (solo para US) DENNIS,
Mark, S. [EU/EU] 120 Plymouth San Carlos
California 94070 (EU) FONG, Sherman [EU/EU]
19 Basinside Way Alameda California 94502 (EU)

(74) Agentes CONLEY, Deirdre, L., MS 49 Genetech
Inc. 1 DNA Way South San Francisco CA 94080
(EU)

(81) Estados Designados (a menos que se indique lo
contrario, para todo tipo de protección nacional
disponible) 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 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) Estados Designados (a menos que se indique lo
contrario, para todo tipo de protección regional
disponible) ARIPO (BW GH GM KE LS MW MZ,
NA SD, SL SZ TZ, UG ZM ZW) Euroasiática
(AM AZ, BY KG KZ MD, RU TJ, TM) Europea
(AT BE BG CH CY CZ DE DK, EE ES FI FR
GB GR HU IE IS IT LT LU 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)

Publicado

— con el informe de búsqueda internacional

(88) Fecha de Publicación del Reporte de Búsqueda
Internacional

5 de Octubre de 2006

(15) Información sobre la Corrección
Corrección Anterior

Ver Gaceta PCT No 20/2006 del 18 de Mayo de 2006

Para códigos de dos letras y otras abreviaciones, referirse a
las "Notas de guía sobre Códigos y Abreviaturas" que
aparecen al comienzo de cada edición de la Gaceta del PCT

(54) Título ANTAGONISTAS ANTIBETA7 HUMANIZADOS Y USOS PARA ESTOS

(57) Resumen La invención suministra anticuerpos anti-beta7 terapéuticos, composiciones que comprenden y
métodos para el uso de estos anticuerpos

ANTAGONISTAS ANTI-BETA7 HUMANIZADOS Y US S 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 TECNICO

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 numerosos procesos celulares provenientes de adhesión de célula para regulación de gen (Hynes 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 alfaEbeta7 ($\alpha E \beta 7$)) 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 Respir 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 especificos, 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

DESCRIPCION 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

200

limitación, inflamación, particularmente trastornos de inflamación crónica tales como asma, alergias, BBD, diabetes, transplante 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 transplante, 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 QQGNLPT (SEQ ID NO 3)

(iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, en donde D1-D10 GFFTTNNYWG (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), RASESVDSLH (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 QQGNSLPNT (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 F1-F11, en donde F1-F11 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 VDSLH (SEQ ID NO 7), RASESVDTLH (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 KYASQSI (SEQ ID No 2), RYASQSI (SEQ ID No 67, o XYASQSI (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 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) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido D1-D10 en donde D1-D10 es GFFTNNYWG (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 -F1 1 es MTGSSGYFDF (SEQ ID No 6) o RTGSSGYFDF (SEQ ID No 66), o comprende la secuencia de aminoácido F1-F1 1, en donde F1-F1 1 es AMTGSSGYFDF (SEQ ID No 63), ARTGSSGYFDF (SEQ ID No 64), o

208

AQTGSSGYFDF (SEQ ID No 65), o una variante de la SEQ ID Nos 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

En una modalidad de la reivindicación 1 o cualquiera de los antibióticos de la invención, el 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 F1-F11 En una modalidad, HVR-L1 comprende

RASESVDSLH (SEQ ID No 7) En una modalidad, HVR-L1 comprende RASESVDTLLH (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-H1, 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-H1, 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- H1, 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 uede 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 los 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

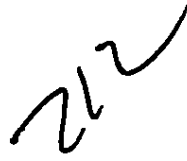
A2 (G, S, T, o V), A3 (G, I, K, N, P, Q, R, o T), A4 (A, D, G, H, I, K, L, N, Q, R, o V), A5 (A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, V, o Y), A6 (A, G, I, K, L, M, Q, o R), A7 (A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, 15 T, o V), A8 (S, D, E, G, P, o N) y A9 (L, I, o M), A10 (A, I, M, o V), y A11 (F, S, o Y)

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)

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 F1-FI 1 es HFR3-1-HFR3-31 y en donde HFR3-6 es 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 transplante de órgano, trastorno de injerto Vs Huésped e inflamación asociada con trastornos de alo injerto

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 F1-F11)

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 κI 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 κI 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 κI 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 F1 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 F1 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 comprende 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 κI 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 κI 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 κI 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, una 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, 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 F1 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 cómo 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 IA y IB) y 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 humana (tal como la anti ratón humana (HAMA) anti ratón humana) o antihumana humana

Una anticuerpo humanizado de la invención puede comprender una o más secuencias humanas y/o de región no hipervariable de consenso humano. Se espera elicitarse 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

230

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 kI 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 kI 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 acuerdo 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 fibronectina. En una modalidad, el anticuerpo antagonista beta7 de la invención irrumpie la unión del beta7 al alfaE. En una modalidad, el anticuerpo antagonista beta7 de la invención irrumpie la unión de

234

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 fibronectina, 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 fibronectina, VCAM, MAdCAM, o E-cadherina). 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 fibronectina, VCAM, y/o MAdCAM) a la integrina alfa4beta7 se irrumpe. En una modalidad, el anticuerpo antagonista beta7 de la invención se une específicamente a una secuencia en el dominio de guión de ligando del beta7 de tal forma que la unión de ligando (es decir E-cadherineina) a la integrina alfaEbeta7 es irrupida.

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 elicitaba poca 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 elicitaba y/o se espera que elicitase 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 elicitaba y/o se espera que elicitase 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 del 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 kI 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 kI 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 alfaEbета7, 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 fibronectina, VCAM, y/o

238

MAdCAM, para la integrina alfa4beta7, o la integrina E-cadherine 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 fibronectina, VCAM, MAdCAM, o E-cadherine) 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-cadherine) 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 en 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 alfaEbeta7).

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-cadherina. 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 une específicamente a una secuencia de aminoácido que tiene al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 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-I 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

224

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

245

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

241

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

247

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

248

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 anticuerpo de la invención, tratando de ésta manera efectivamente o previniendo dicho trastorno inflamatorio. En una modalidad, dicho trastorno

249

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) (c1s 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

25

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

Las figs 5A y 5B, describen la secuencia de 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

252

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 substituciones 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)

253

Las regiones sombreadas representan cadenas ligeras HVR (indicados como L1, 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

254

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

157

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

256

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

157

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 IL1EL) (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

258

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 adreína 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 inmunoglobulina. 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-cadherina", 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

259

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. Éste 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 alfa4beta7, 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 intercambiablemente 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-purpura 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 abscesos 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 remitente.

Las características clínicas de la UC son altamente variables, y la afectación puede ser insidiosa o aguda, y puede incluir diarrea, tenesmo y sangrado rectal relajante con involucramiento fulminante del colon completo, megacolon tóxico, y puede ocurrir una emergencia que amenace la vida. Las manifestaciones extraintestinales incluyen artritis, pioderma gangrenoso, uveítis, y eritema nodoso.

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

263

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,

264

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 Analysis, 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 proteínicos o no proteínicos. 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, tinción 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 Kd). 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

vbs

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 capturante (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 [¹²⁵I]- 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 BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BiaCore, Inc, Piscataway, 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 hidróclorido 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 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 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 µl/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 ratio $K_{prendido}/K_{apagado}$. 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 espectómetro, 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 BIAcore TM-2000 o un BIAcore TM-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

271

equipado con flujo de parada (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro serie 8000 SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada. El valor "Kd" o "valor Kd" 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 (Dynex) son recubiertas durante toda la noche con 5 ug/ml de un anticuerpo anti-Fab capturante (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}I]- 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 período (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 BIAcore TM-2000 o un BIAcore TM-3000 (BiaCore, Inc, Piscataway, 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 simultanea 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

243

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., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de 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 5 µg/ml (~0.2 µM) antes de 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 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

271

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 simultanea 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 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 espectrofómetro, 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

275

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 1 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

276

fuelle 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 registro de derecho de autor No TXU510087 El programa ALIGN-2 está publicamente 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 numero 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 BQ
 * 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},
```

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

7

✶

```
#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[MAXIMP], /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXIMP], /* 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 jumps */
},

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             *names[2],    /* seq names getseqs() */
char             *prog,        /* prog name for err msgs */
char             *seqs[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: prog 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

```

281

```

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),
xbcm = (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

282

```

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       ms;               /* 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 diag", 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 (endgap) {

```

```

    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

```

```

    */

```

253

```

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;
}

```

...NW

```

for (py = seqx[1] yy = 1, yy <= len1, py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1],
    if (dna)
        mis += (xbrn[*px-'A']&xbrn[*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] - ms0 >= 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);

```

284

```

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

/* update penalty for del in y seq,
 * favor new del over ongoing del
 */
if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1)
        ndelx = 1,
    } else {
        delx -= ins1
        ndelx++,
    }
} else {
    if (col1[yy-1] - (ms0+ins1) >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1)
        ndelx = 1,
    } else
        ndelx++;
}

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

```

...RW

```

nd = xx - yy + len1 - 1,
if (ms >= delx && ms >= dely[yy])
    col1[yy] = ms
else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
}

```


285

```

ij = dx[id] ijmp;
if (dx[id] jp.n[0] && (ldna || (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] && (ldna || (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] = lns0+lns1*(len1-yy),

```

```

        if (col1[yy] > smax) {
            smax = col1[yy],
            dmax = id,
        }
    }
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx),
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1],
    dmax = id,
}
tmp = col0; col0 = col1 col1 = tmp,
}
(void) free((char *)ndely),
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1),
}

/*
 *
 * 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 */

```

287

```
#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)
```

288

288

```

    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, l0, i1, siz0, siz1,
    char        outx[32]
    double      pct;
    register    n0, n1,
    register char *p0, *p1,

    /* get total matches, score
     */
    n0 = 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++,

```

289

```

        n0++,
        sz1--,
    }
    else {
        if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A'])
            nm++;
        if (n0++ == pp[0].n[i0])
            sz0 = pp[0].n[i0++];
        if (n1++ == pp[1].n[j1])
            sz1 = pp[1].n[j1++];
        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),

```

```

--getmat

```

```

if (gapx) {

```

```

    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",

```

```

        ngapx, (dna)? "has" : "residue", (ngapx == 1)? "" : "s"),

```

```

    fprintf(fx, "%s" outx);

```

200

```

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 int nm; /* matches in core -- for checking */
static int lmax; /* lengths of stripped file names */
static int ij[2]; /* jump index for a path */
static int nc[2]; /* number at start of current line */
static int ni[2]; /* current elem number -- for gapping */
static int 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_align0
{
    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,
        no[i] = 1
        siz[i] = i[i] = 0;
        ps[i] = seqs[i],
        po[i] = out[i],
    }

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

```

pr_align

--pr_align

```

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 (nl[i] == pp[i].x[i][i]) {
        /*
         * we need to merge all gaps
         * at this location
         */
        sz[i] = pp[i].n[i][i]++;
        while (ni[i] == pp[i].x[i][i])
            sz[i] += pp[i].n[i][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 starts pr_align()
 */
static
dumpblock()

```

dumpblock

293

```

{
    register    i,

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

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

294

```

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)? -1 : 1,
            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) puts(*pn, fx),
    (void) puts("\n", fx),
}

```

```

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]) dumpblock()
 */

```

static

putline(x)

```

    int    ix,
    {

```

putline

...putline

```

    int    i,

```

```

    register char    *px,

```

```

    for (px = namex[ix], i = 0, *px && *px != '\0', px++, i++)

```

```

        (void) puts(*px, fx),

```

295

295

```

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 = "x";
                nm++;
            }
            else if (ldna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)

```

stars

296

296

```

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

```

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return lca pc_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

297

247

```

/*
 * 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/homg/XXXXXX", /* 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 */

```

```

{

```

218

```

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))

```

299

2/17

```

        *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU",*(py-1)))
            natgc++;
    }
}
*py++ = '\0';
*py = '\0';
(void) fclose(fp);
dna = natgc > (len/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 jumps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax main()
 */
readjumps()                                readjumps
{
    int fd = 1,
    int sz, i0, i1,
    register i, j, xx,

```

700

```

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

for (i = n0 = n1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0, i++) {
    while (1) {
        for (j = dx[dmax].jmp; j >= 0 && dx[dmax].jpx[j] >= xx, j--)

            ...readjumps

        if (j < 0 && dx[dmax].offset && j) {
            (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].jmp = 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].jpn[j];
        xx = dx[dmax].jpx[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;

```


307

201

```

        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;
}
}

```

302 302

```

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

    char *mktemp();

    if (!f) {
        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.

307 303

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 intercambiablemente en la medida en que plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector.

"Polinucleótido", o "ácido nucleico", como se utiliza intercambiablemente aquí, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, 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 esta 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

304/304

con enlaces no cargados (por ejemplo metil fosfato, fosfotriésteres, fosfoamidados, 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 intercaladotes (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 numéricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosa, azúcares furanosa, seufheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósido abásico tales como metil ribosita Uno o más enlaces

fosfodiester 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)NR₂" ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("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 intercambiablemente 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

306'

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 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 (epítopos), 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 especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos casos,

308

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 Allergy, Asthma & 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, hapten, 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

301 309

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

240310

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-GVPSRFGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO 36) - L3-FGQGTKVIKR (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-RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO 40) - H3-WGQGTILVTVSS (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

24 311

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 VL (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

24-312

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 Kabat	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1 numeración Chothia	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
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

247 313

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

7/14 314

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 blastocóelicos, 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.

31/315

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, hemoglobinuria 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

360 316

tal como neumonías eosinófilicas, fibrosis pulmonar idiopática, y neumonitis de hipersensibilidad, enfermedades asociadas a transplante 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 fungosas, 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 esta 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 Cronh y colitis ulcerativa), síndrome de estrés respiratorio (que incluye síndrome de estrés respiratorio en adultos, ARDS), dermatitis, meningitis, encefalitis, uveitis, colitis, glomérulo nefritis, condiciones alérgicas tales como eccema y asma y otras condiciones que involucran la infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas,

317

ateroesclerosis, 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 multiple, 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 multiple, 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 antifosfolípido, neuritis alergia, enfermedad de Graves, síndrome miastenica Lambert-Eaton, bolo pemfigoide, pemfigus, poliendocrinopatias autoinmunes, enfermedad de Reiter, síndrome de hombre rígido, enfermedad de Behcet, artritis de célula gigante, nefritis de complejo inmune, nefropatia 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

24/ 318

infecciosa) mucositis (por ejemplo mucositis oral, mucositis gastrointestinal, mucositis nasal y proctitis), enterocolitis necrotizante y esofagitis

El termino "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 todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo de células", "trastorno proliferativo" y "tumor" como se tratan aquí.

El termino "cáncer" y "canceroso" se refiere o describe la condición fisiológica en los mamíferos que esta 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 canceres incluyen canceres 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

319 319

glándula salival, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulval, 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 neoplásticas como neoplásticas. Las neoplásticas se incluyen pero no están limitadas a aquellas descritas anteriormente. Los trastornos no neoplásticos 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),

320 320

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 periodos 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 periodos 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,

22 322

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 estos, 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-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®), beta-lapachona, lapachol, colchicinas, ácido betulínico, una camptotecina (que incluye topotecan análogo sintético (HYCAMTIN®), 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,

325323

mostazas de nitrógeno tales como clorambucil, clornafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocliclorato 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 enedina (ejemplo caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gammaII y caliqueamicina omegaII (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, antramycin, 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, nogalamycin, olivomicinas, peplomycin, potfiromycin, puromycin, 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

24 320

calusterona, dromostanolona propionato, epitiostanolm
mepitiostano, testolactona, antiadrenales tales como
aminoglutetimida, mitotane, trilostano, rellenos de ácido
fólico tales como ácido frolínico, aceglatona, aldofosmamida
glicósido, ácido aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina,
bestrabucilo, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina,
diasiquona, elformitina, acetato de eliptinio, y epotilona,
etoglucido, nitrato de galio, hidroxurea, lentinan, yonidainina,
maitansinoides tales como maitansina y ansamitocina, mitoguazona,
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, leucovorina,
vinorelbina (NAVELBINE®), 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 leucovorina

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 triptorelina, 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, fomestanie, fadrosol, REVISOR® verozol, FEMARA®

2/2
326

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 topoisomerasas II tales como doxorubicina epirubicina,

327
2/1

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-(hidroxilacetil)-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

32X328

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, Khazzaeli 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 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 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO 39)

FR3 que comprende FR3 que comprende RFTISX1DX2SKNTX3YLMNSLRAEDTAVYYCA (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

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),

37/331

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 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO 34),

FR2 que comprende WYQQKPGKAPKLLI (SEQ ID NO 35),

FR3 que comprende GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO 36),

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

299 334

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 fagémido 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 fagémido 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)

2/335

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)
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.

32
338

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

339

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 procariote 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 homoduplex 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 homoduplex 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. Enzymol. 153:3 (1987). Así, el ADN que va a ser multado 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 o no relacionadas, por ejemplo, proteínas de recubrimiento viral y

741 341

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 Huésped 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.

343

En general, los vectores de plásmido que contienen helición 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 (Tet) 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 AGEM 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

704 344

componentes de polipéptido, Un promotor es una secuencia regulatoria no traducida localizada corriente arriba (5') a un cistron 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 cistron 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 cistron 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

21/345

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, Ipp, 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 cistrón 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 cistrón 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 metagénesis convencional que dan como resultado en cambios del
codón que pueden alterar la secuencia de aminoácido, aunque los

207 347

cambios silentes en la secuencia de nucleótido se prefieren Las alteraciones del TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el numero o espaciamento 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 agrega 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

748-348

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 cepas 33D3 que tienen el genotipo W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) *ptr3 lac Iq lacL8 $\Delta ompT$ ($\Delta nmpc$ -*fepE*) *degP41 kan^R* (Patente U.S. No. 5,639,635). Otras cepas 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*

349

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

7-1-03 390

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 glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioglicerol y ditiotreitól.

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

751 351

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 comunmente 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

720352

procedimientos de fermentación con alimentación de tanda 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 mejorar el montaje adecuado y el plegamiento de los polipéptidos de anticuerpo secretados, los

34A 353

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 M1, 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 sepas de *E coli* deficientes en enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobre expresan una o más proteínas chaperona son utilizadas como células huésped in 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, cromatografía de exclusión, 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 inmunoafinidad 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* 131: 621-628. 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 primer 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 elusión

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 heterologa 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

24/356

mamífero, las secuencias de señales de mamífero así 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

11) 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

111) 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 auxotróficas, 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 quinasa, metalotioneína-I y -II, preferiblemente genes de metalotioneína de primate, adenosin deaminasa, ornitina 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'-fosfotransferasa (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

24
358**(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 encontrada 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 polio, virus de la viruela 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.

284 359

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 mejorada en el vector. Muchas secuencias mejoradas 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 poliovirus sobre el lado tardío del origen de

Handwritten: 760 360

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

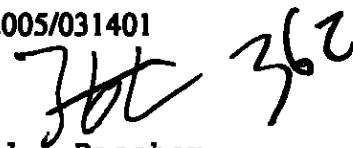
-361

1651), línea de riñón embrionario humano (293 o 298 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 lisados, 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 131: 621-623 (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

364
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 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 desnaturalizante (HPLC), espectrometría de masa, cromatografía de intercambio de ion y digestión de papaína

365

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 efectuatoras, 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 deletereas. 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 utiles 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 espaciamento/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

368

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.

370

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 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.

3x1

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 incremente 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)

- 373
- (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) hirofílica neutra Cys, Ser, Thr, Asn, Gln
- (3) Ácida Asp, Glu
- (4) Básica 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 alanina 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

37

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.

378 376

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 ,

37X

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

370378

citopenias severas y prolongadas en la mayoría de los pacientes MILOTARG™ (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

32379

Terminal C de AE) Los ligadores de conjugado útiles para unir una droga a un anticuerpo incluyen sin limitación MC (maleimidocaproyl), 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 (maleimidocaproyl-poli-etilenglicol, unido a cisteínas de anticuerpo), SPP (N-Succinimidil 4-(2-piridilditio)pentanoato), y SMCC(N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato) Estas 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-nitro-piridil)-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

2/380

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-azidobenzoyl)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoyl)-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 carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante de ejemplo para la conjugación de radionucleótido al anticuerpo. Ver WO94/11026.

24381

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

35
inmunos conjugados 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 inmunos conjugados 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 oncogén 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)

3/3/03

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 aun 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 Char1 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.

38381

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-acidobenzoylo)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoyl)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como, tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de fluor 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 hidroxil metilo, 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

385

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- pico molares. 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 se limitan nada, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetyl $-\gamma_1^I$, 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 conjugarse 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 conjugarse con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5- fluororacilo la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrito en las patentes



286 386

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 At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu Cuando el conjugado se utiliza para la detección, este puede comprender un átomo radioactivo para estudios sintigráficos, por ejemplo tc^{99m} o I¹²³, 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 $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} 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 Immunoscintigraphy" (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) propio nato (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), aldehidos (tal como glutaral aldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobesoil) hexanediamina), derivados bis-diazonium (tal como bis(p-diazoniobensoil)-etilenodeania), diisocyanatos (tal como tolueno 2,6-diisocyanato), y compuestos de fluor bis - activos (tal como 1,5- difluoro-2,4- de nitrobenceno) por ejemplo, se puede preparar una immuno toxina ricina como se describe en

388

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

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 pude preparar mediante varias rutas, que emplean reacciones de química orgánica, condiciones, y reacciones conocidas por aquellos expertos en la técnica, que incluyen (1)

28/389

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 formara así, teóricamente, dos núcleos filos thiol reactivos. Los grupos nucleofílicos adicionales se pueden introducir en anticuerpos a través de la reacción de lisinas con

3cd

2-iminotiolano (reactivo Traut) que resulta en la conversión de un 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 agentes 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

30 391

hidrazina, y grupos arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en porciones ligadoras o reactivos ligadores que incluyen (i) esteres activos tales como esteres NHS, esteres HOBt, halo formatos, y haluros de acido, (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 aun 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 de 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 proteinasias 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 oxidopropilopireno oxido/etileno, polioles polioxiethylados (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

347 393

fisiológicamente aceptables opcionales, excipientes o estabilizantes (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a 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, octadecil dimetilbenzilo, 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

304 394

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-(metilmetacrilato) 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 (payente estadounidense No 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y gama etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no

395

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 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 de 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 transgén 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, estrosomales, 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

24 x 393

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

304 399

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

U60

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, 0.1 mg/kg – 10 mg/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 100 mg/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 1 anticuerpo Sin embargo, otros regimenes de dosis pueden ser útiles El progreso de ésta terapia se monitorea fácilmente por técnicas convencionales y ensayos

405 402

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 sí 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 agujero 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 esta 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 truncada de la proteína P3 de cubierta de fago menor (Lowman, H et al (1900) *Biochemistry* 30 10832)

Los dominios VL y VH del F1b504 de rata (anticuerpo F1B504 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 modificado que difiere de la secuencia humIII en 3 posiciones se puede utilizar R71A, N73T, y L78A (ver Carter et

401 405

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

✓
406

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

401 407

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.

40/400

Generacion de librerias Fago

Grupos de oligonucleótidos aleatorizados diseñados para cada región hipervariable se fosforilan separadamente en 6 reacciones de 20 µl que contienen 660 NG de oligonucleótido, 50 mM de tris ph 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 20 mM DTT, y 5 U quinasa polinucleótido durante 1 hora a 37°C. Los 6 grupos de oligonucleótido fosforilados se combinan luego con 20 µg de plantilla kunkel en 50 mM tris ph 7.5, 10 mM, MgCl₂ en un volumen final de 500 µl 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 µl de mezcla recocida, se agrega 150 µl de amortiguador quiagen PB, u la mezcla se divide entre dos columnas de sílice. Luego de un lavado de cada columna con 750 µl de amortiguador Quiagen TE y un enjuague extra a las columnas secas, cada columna se eluye con 110 µl de 10 mM tris, 1 mM EDTA, ph 8. La plantilla limpia y recocida (220 µl) se filtra luego por adición de un µl 100 mM ATP, 10 µl 25 mM de NTPS (25 mM cada uno de DATP, dCTP, dGTP y dTTP), 15 µl 100 mM DTT, 25 µl 10X TM amortiguador (0.5 M Tris pH 7.5, 0.1 M MgCl₂), 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

✓ 469

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

410

utiliza para rodas 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 µg/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

u11

alfa4beta7 de integrina humana (15 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 V1 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.



44-47

(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 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 cambió 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 Fib504K-RF) se desplegó sobre el fago y se ensayó para unión a alfa4beta7 inmovilizado La unión del fago específico fue solamente observada para el

43

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 alfa4beta7 que tiene afinidad

u/y

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

415

aminoácido en la posición 32 del VHR-L1 (donde L o I remplace a Y), opcionalmente, en la posición 31 del VHR-L1 (donde T es reemplazado 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 ASESVDLLH (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

41b

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 ASESVDLLH (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 está presente en la posición 96 en la cadena ligera del hu504-32,

u1A

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 minimos del Fib504 de rata que son requeridos para la unión. Seis librerías fueron generadas y puestas como blanco en

CH 478

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

41^m

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 F1b504 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 F1b504 de rata son seleccionados más frecuentemente en algunas posiciones y suministran sustituciones potenciales para mejorar la afinidad de las variantes F1b504 humanizadas. Estas 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.

420

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 contruidos 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

421

Glicina, pH 3.0) Las fracciones de 1 mL resultantes fueron inmediatamente neutralizadas mediante la adición de 75 μ L 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 μ M 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

MAcAM

42/422

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% (IC₅₀) de la unión de las células RPMI8866 al MAdCAM-1 se midieron al recubrir placas de 96 pozos Nunc Maxisorp™ con 2µg/ml en PBS, 100 µl/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 µl/pozo de 5 mg/ml de BSA durante una hora a temperatura ambiente, 50 µl 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 µl 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 µl de medio de ensayo para remover las células no unidas Las células unidas se solubilizaron con 100 µl 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

425 423

los valores IC_{50} de cada variante Fib504 humanizada en el ensayo. Los valores IC_{50} e IC_{90} se estimaron del ajuste de los cuatro parámetros. La Fig 14 es una gráfica de ejemplo de los resultados. Los valores IC_{90} e IC_{50} 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 union alfa4beta7 al VCAM

Adhesion 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 IC_{50} para cada una de las variantes ensayadas se muestran adelante en la Tabla 5.

424

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*
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 alfaEbeta7 a la E-cadherina humana

Adhesión de las células alfaEbeta7 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 menciona 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

425

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

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)
Variante 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

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)
Variante 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 desarrolló como se describió aquí anteriormente. El ensayo del alfaEbeta7-293/hu E-cadherina se modificó mediante el uso del E-cadherina-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 RPMI8866 también se examinó. 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 quimiotrópico de fibronectina humana de 40

kDa (F1903, Chemicon Internacional, Temecula, CA) se utilizo en 2 μ g/ml para recubrir placas

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 μ g (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 μ l 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 fluorescencia 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 albumina 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

4/29

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 de anticuerpo	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
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

430

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 consideró 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

431

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 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ de PBS Treinta minutos después de la administración del anticuerpo, fueron inyectadas células MLN marcadas con Cr^{51} , 4×10^6 células/100 μl 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

✓ 432

en la posición de la cadena ligera 49 de la variante hu504 32R (HVR-L2 posición relativa B1) se observó 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 desarrolló 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) 4445-4454 (1999) y Li Y C et al, J Chromatography A, 909 137-145 (2001). El ensayo de adhesión de célula se desarrolló 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

J7/433

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

47/434

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 está limitada en alcance a la construcción depositada, en razón a que la modalidad depositada está 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 depósito de los materiales aquí no constituye una admisión de que la descripción escrita aquí contenida sea inadecuada para posibilitar la práctica 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 específicas 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.

437 435

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 KYASQISIS (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

436 436

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

- (1) 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

- (i) 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, IL, 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

437/438

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

(v1) 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,

~~439~~ 439

G, H, I, K, N, P, R, T, o V), A6 (V, R, I, A, G, K, ~~E~~, 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) substituciones 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) substituciones 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

~~440~~ 440

- 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

441

- 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 Kd

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

443

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

- (1) 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

elly

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,

(11) 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,

(111) 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, IL, 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 un 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 trasplante de órgano, trastorno de injerto versus huésped, inflamación asociada con trastornos de aloinjerto

~~4449~~**ANTAGONISTAS ANTI-BETA7 HUMANIZAD S Y US S PARA ESTOS****RESUMEN**

La invención suministra anticuerpos anti-beta7 terapéuticos, composiciones que las comprenden, y métodos para utilizar estos anticuerpos

457

W/O 2006/026759

2/22

PCT/US2005/031401

57

FIG. 1C

Variantes humanizadas de Fib504

Sustituciones L2 y HVR-L1,
Estructura RF Fib504-K

Ensayo de
afinidad
BiAcore (NM)

504K-RF residuos	L1	L2	
68	R A S E S V D T L H	K Y A S Q S I S	11
74	R A S E S V D T L H	K Y A S Q S I S	
504-32	R A S E S V D T L H	K Y A S Q S I S	35
51	R A S E S V D T L H	K Y A S Q S I S	
59	R A S E S V D T L H	K Y A S Q S I S	
504-5	R A S E S V D T L H	K Y A S Q S I S	9
60	R A S E S V D T L H	K Y A S Q S I S	
96	R A S E S V D T L H	K Y A S Q S I S	
83	R A S E S V D T L H	K Y A S Q S I S	
504-16 (8)	R A S E S V D T L H	K Y A S Q S I S	23.4
504-RF (29)	R A S E S V D T Y L H	K Y A S Q S I S	132

452 452

Consenso Humano

FIG 2A

Cadena Liviana (Kappa I)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTCRASQSSNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLES
GVPSRFSQSOTDFTLTSSLOPFDATYYCQYNSLPWTFOGGTEKVEIKRTVA
AFSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSSTYSLSSTLTLSKADYERHKVKYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:27)

FIG 2B

Cadena pesada (Subgrupo III)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASQETFSYAMSWVRQAPGKGLWVSYSQD
GGFTCYADESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRARDTAVYYCAMTGGSKYIDF
WQQOTLVTVSSASTEGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTEPREBQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
HWESNQOPENNYKTTTPVLDSDQSFTLYSKLTVDKSRWQQONVPSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:28)

47
453

Injerto Fib504

FIG. 3A

Cadena Liviana

DIQMTQSPSSLSASVODRVITTCRASESVDYTLHWYQQKPKAPKLLIYYASOSIS
GVPSRFSQSGSGIDFILTIISLQPEDFATYYCQOQNSLENTFGQOTKVEIKRTVAA
PSVFIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNTYFREAKVQWEVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSITLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:29)

FIG 3B

Cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTNNYWQWVRQAPQKGLEWVQYISY
SGSTSYNPSLKSRFTISADTSKNTAYLQMNSLRADTA VYYCANTGSSGYEDFW
QQOTLVTVSSASTKGPSVPELAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKEVDKKVEP
KSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRHEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNQGFENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQONVFSCSVHREALH
NHYYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:30)

452/454

Injerto Fib504K

FIG. 4A

Cadena Liviana

DIQMTQSPSSLSASVQDRVITTCRASESVDYHLHWYQQKPKAPKLLIKYASQIS
GVPSRFSQSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCOQGNLENTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVPIPPSDEBQLESQGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACBVT HQGLSPVTKSFNRQEC (SEQ ID
NO:31)

FIG. 4B

Cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTNYYWQWVRQAPGKGLEWVGYISY
SGSTSYNPSLKSRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCAMTGGSSGYEDFW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTFSWNSQA
LTSQVHTFP AVLQSSGLYSLSVYTVPSSSLQTQTYICNVNHEKPTNKVDKKEVP
KSCDKTHITCPFCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDQVEVHNATKPREBQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYECKKVSN
KALPAPIEKTISKAKOQPREPQVYTLPPSRHEMTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTIPFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVMHREALH
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:30)

455

Injerto F1b504K-RF

FIG 5A

Cadena Liviana

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASESVDTYLEHWYQQKPKAKPKLLIKYASQIS
GVPSRFSQSGSGTDFTLTISSLQPEDRATYYCDQGNLENTFGQGTKEVTKRTVAA
PSVPIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSITLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:31)

FIG. 5B

Cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASQFFITNNYWGQWVRQAPGKGLHWVGXISY
SQSTSYNPSLKSRFTISRDTSKNTFYLQMNSLRADTAVYYCAMTQSSQYFDEW
GQOTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVEITPFAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKHTHTCPPCPAPELLOQPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KPNWYVDGVEVENAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLFHQDWLNQKEYKCKVEN
KALPAPIEKINAKAQQPREPQVYILPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAYE
WESNOQFENNYKTIFFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSEWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKELSLSPGK (SEQ ID NO:32)

47 456

Variantes Humanizadas 504.32

FIG. 6A

Cadena Liviana

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASESYDDILEWYQQKPGKAPKLLIKYASQSIH
GVPSRISGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOQNSLENTFGQGTKVRIKRTVAA
PSVFIPTPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSONSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYERHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:33)

FIG. 6B

Cadena Pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGHEITINNYWQIWRQAPGKGLEWVQYISY
SGSTSYNPISLKSRTISRDTSKNTFYLQMNSLRABDTAVYYCAMTGSSGYDEW
GQGTILTVSSASTKQPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEFVTVSWNSOA
LTSQVEHFFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVHP
KSCDKHTICPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KPNWYVDQVEVHNAETKPRBBQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIERTISKAKGQPREPQVYTLPPSRHEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WEENGGQPENNYKITTPFVLDSDGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVPSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPCK (SEQ ID NO:32)

457

1 ZDIGNTQSPSSLSASVQDRVTITC[REDACTED]WYQQKPKAKPLLIV[REDACTED]GVPRFSGSGSGTDFTLTISGLP
2 DIQNTQSPSSLSASVQDRVTITC[REDACTED]WYQQKPKAKPLLIV[REDACTED]GVPRFSGSGSGTDFTLTISGLP
3 DIVMTQSPFLPLPYTPGEPASISG[REDACTED]WYLOKPGQSPQLLIY[REDACTED]GVPRFSGSGSGTDFTLTISGLP
4 EIVLTQSPGTLGLPGERATLSC[REDACTED]WYQQKPKQAPRLIY[REDACTED]GVPRFSGSGSGTDFTLTISGLP
5 DIVMTQSPDGLAVSLGERATINC[REDACTED]WYQQKPKQPPKLLIY[REDACTED]GVPRFSGSGSGTDFTLTISGLP

FIG 7A

458

EDFATYYC[REDACTED]FGQSTKVEIK SEQ ID NO 14
EDFATYYC[REDACTED]FGQSTKVEIK SEQ ID NO 15
EDVGVYYC[REDACTED]FGQSTKVEIK SEQ ID NO 16
EDFAVYYC[REDACTED]FGQSTKVEIK SEQ ID NO 17
EDVAVYYC[REDACTED]FGQSTKVEIK SEQ ID NO 18

FIG 7B

Handwritten signature

I
A QVQLVQSGAEVKEFGASVEVSCAASQYTFY
B QVQLVQSGAEVKEFGASVEVSCAAS
C QVQLVQSGAEVKEFGASVEVSCAAS
D QVQLVQSGAEVKEFGASVEVSCAAS
E
A QVQLQESGFGLVEPSQTLSTCTVSQGSVE
B QVQLQESGFGLVEPSQTLSTCTVS
C QVQLQESGFGLVEPSQTLSTCTVS
D QVQLQESGFGLVEPSQTLSTCTVS
F
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASQFTFS
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
Acceptador
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASQFNIE
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
Segundo Acceptador
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASQFNIE
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS

FIG 8A

480

RVTI TADTSTSTAYMELSLRSED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 18
RVTI TADTSTSTAYMELSLRSED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 19
RVTI TADTSTSTAYMELSLRSED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 20
RVTI TADTSTSTAYMELSLRSED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 21
RVTI SVDTSEKQFSLKLSVTAAD TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 22
RVTI SVDTSEKQFSLKLSVTAAD TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 23
RVTI SVDTSEKQFSLKLSVTAAD TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 24
RVTI SVDTSEKQFSLKLSVTAAD TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 25
RFTI SRDNSEKNTLYLQMNSLRAED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 26
RFTI SRDNSEKNTLYLQMNSLRAED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 27
RFTI SRDNSEKNTLYLQMNSLRAED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 28
RFTI SRDNSEKNTLYLQMNSLRAED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 29
RFTI SRDNSEKNTLYLQMNSLRAED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 30
RFTI SRDNSEKNTLYLQMNSLRAED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 31
RFTI SRDNSEKNTLYLQMNSLRAED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 32
RFTI SRDNSEKNTLYLQMNSLRAED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 33
RFTI SRDNSEKNTLYLQMNSLRAED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 34
RFTI SRDNSEKNTLYLQMNSLRAED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 35
RFTI SRDNSEKNTLYLQMNSLRAED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 36
RFTI SRDNSEKNTLYLQMNSLRAED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 37
RFTI SRDNSEKNTLYLQMNSLRAED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 38
RFTI SRDNSEKNTLYLQMNSLRAED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 39
RFTI SRDNSEKNTLYLQMNSLRAED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 40
RFTI SRDNSEKNTLYLQMNSLRAED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 41
RFTI SRDNSEKNTLYLQMNSLRAED TAVVYCA	WQQT LVTVE	SEQ NO. 42

Ulf

Dominios Variables Fib504 anti-ratón de Rata

FIG. 9A

Variable Cadena Liviana

DVVMITQSPATLSVTPGERISLSCEASESVDTYLHWYQQKPNESPRLLUKYASOSIS
GIPSRFQSGSGIDFTLSINGVELEDLSYYCQOQNSLENTFGAGTKLELRADAA
PTVSIFPPSIMEQLTSQGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVLDSDVDQD
SKDSTYS (SEQ ID NO.12)

FIG. 9B

Variable Cadena Pesada

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTQFTINNYWGWRKFPQNKMEWMGYISYS
QSTSYNPSLEKRISITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCAMTGSIGYEDFWGP
GTMYTVSSAETTAPSVYFLAPGTALKNSMVTLCCLV (SEQ ID NO.13)

462

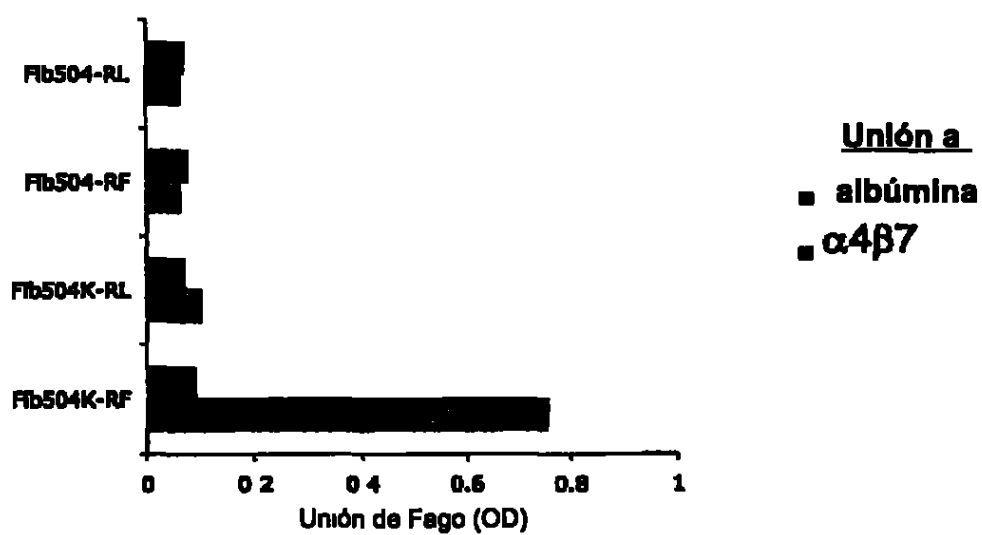
FIG. 10A

Comparación de secuencias de estructura VH

Región de Estructura H3								
	71	72	73	74	75	76	77	78
Subgrupo I hu	A	D	T	S	T	S	T	A
Subgrupo II hu	V	D	T	S	K	N	Q	SR
Subgrupo III hu	R	D	N	S	K	N	T	SL
Herceptin	A	D	T	S	K	N	T	A
Fib504	R	D	T	S	K	N	Q	SR
Fib504-RL	R	D	T	S	K	N	T	SL
Fib504-RF	R	D	T	S	K	N	T	SL

463

Figura 10B



[Handwritten signature]

FIG. 11B

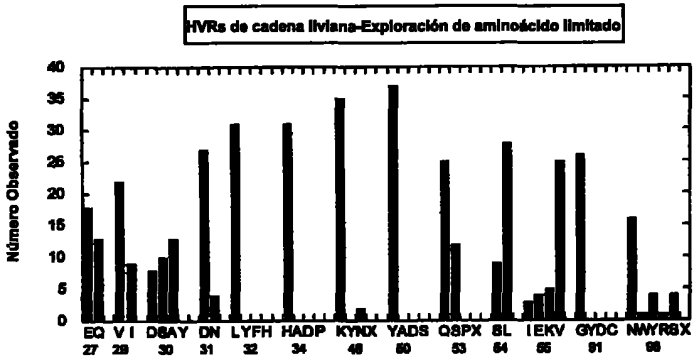


FIG. 11C

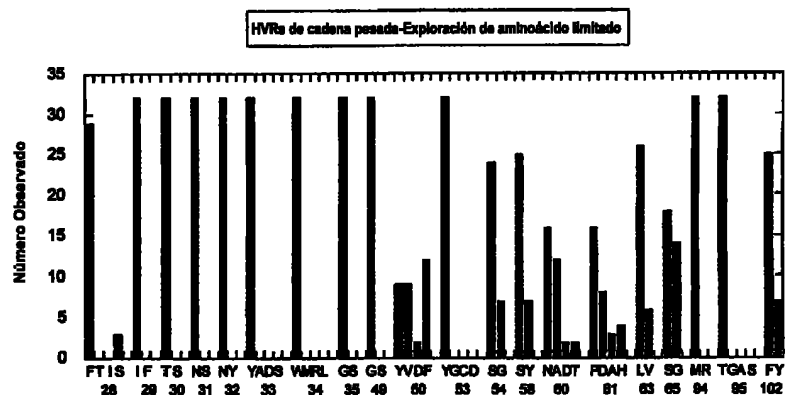


FIG. 12

aminoácido		aminoácido																													
posición		Número de veces observado																													
HVR-L1	A25		G	S	I	Y																									
			2	11	7	9																									
	S26	G	I	K	N	P	Q	R		I																					
		4	2	3	8	1	1	7		6																					
	E27	A	D		G	H	I	K	L	N	Q	R	Y																		
		6	8		2	1	1	4	1	2	5	1	2																		
	S28	A	D	G	H	I	K	N	P	R		I	Y	Y																	
		1	1	7	1	1	1	9	3	7		4	1	1																	
	V29	A	G	I	K	L	M	Q	R																						
		11	6	3	1	9	6	1	1																						
HVR-L2	D30	A		E	G	H	I	K	L	N	P	S	T	Y																	
		3		9	3	3	1	1	1	6	1	1	2	3																	
	D31		E	G	N																										
			13	2	1																										
	L32	I		M																											
HVR-H3		1		4																											
	L33	A	I		M	Y																									
		1	5		1	22																									
HVR-H5	H34	E		Y	S																										
		1		4	1																										
HVR-L3	N96	A	E	H	I		M	N	R	S	T	V	W	Y																	
		2	6	1	3		3	2	2	2	4	2	16	3																	
HVR-H3	M94	A	E	G		Q	R	S																							
		1	3	1		10	24	8																							

NOTA Se sombrea los aminoácidos más frecuentemente observados

[Handwritten signature]

WO 2006/026759

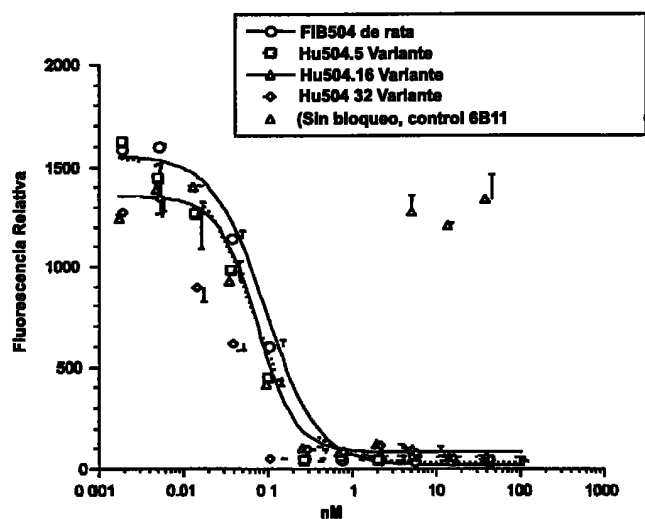
19/22

PCT/US2005/031401

Name of Invention		Priority Date		Priority Document		Priority Date		Priority Document	
COR-13		1999-01-15		US 6,000,000		1999-01-15		US 6,000,000	
COR-12		1999-01-15		US 6,000,000		1999-01-15		US 6,000,000	
COR-11		1999-01-15		US 6,000,000		1999-01-15		US 6,000,000	
COR-10		1999-01-15		US 6,000,000		1999-01-15		US 6,000,000	
COR-9		1999-01-15		US 6,000,000		1999-01-15		US 6,000,000	
COR-8		1999-01-15		US 6,000,000		1999-01-15		US 6,000,000	
COR-7		1999-01-15		US 6,000,000		1999-01-15		US 6,000,000	
COR-6		1999-01-15		US 6,000,000		1999-01-15		US 6,000,000	
COR-5		1999-01-15		US 6,000,000		1999-01-15		US 6,000,000	
COR-4		1999-01-15		US 6,000,000		1999-01-15		US 6,000,000	
COR-3		1999-01-15		US 6,000,000		1999-01-15		US 6,000,000	
COR-2		1999-01-15		US 6,000,000		1999-01-15		US 6,000,000	
COR-1		1999-01-15		US 6,000,000		1999-01-15		US 6,000,000	

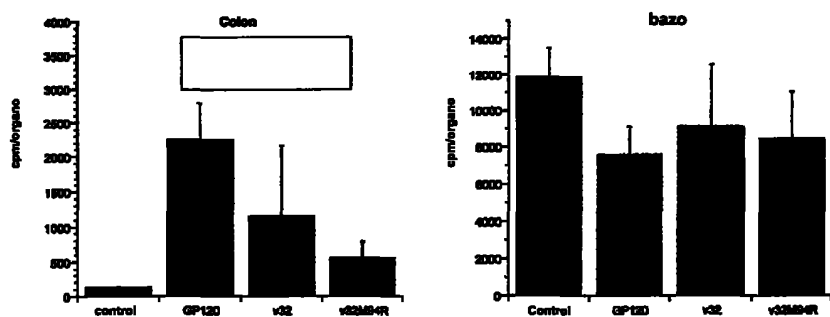
469

FIG. 14 Actividad de variantes FIB504 en células RPMI8866 que se unen al MadCAM-1-Ig



[illegible]

Figura 16



22/22

Handwritten signature

472

Lista de Secuencias PCT P2159R1
Lista de Secuencias

<110> GENENTECH, INC
<120> ANTAGONISTA ANTI-BETA7 HUMANIZADO Y USOS DE ESTOS
<130> P2159R1 PCT
<140> PCT/US2005/031401
<141> 2005-09-02
<150> US 60/607,377
<151> 2004-09-03

<160> 68

<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 1
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr Leu His
5 10

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 2
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 3
Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Asn Thr
5

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 4
Gly Phe Phe Ile Thr Asn Asn Tyr Trp Gly
5 10

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

(H) 473

Lista de Secuencias PCT P2159R1

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 5
Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
1 5 10 15

Lys Ser

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 6
Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
5 10

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 7
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Leu Leu His
5 10

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 8
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Leu Leu His
5 10

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 9
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asp Leu Leu His
5 10

<210> 10
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 10

474 474

Lista de Secuencias PCT P2159R1

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

<210> 11
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza secuencia

<400> 11
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Phe Phe Ile Thr
 20 25 30
 Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Met
 35 40 45
 Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
 50 55 60
 Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys
 65 70 75
 Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr
 80 85 90
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp
 95 100 105
 Phe Trp Gly Pro Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 12
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza secuencia

<400> 12
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro
 1 5 10 15

475

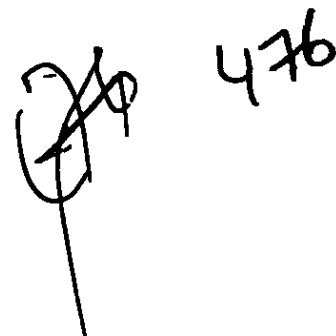
Lista de Secuencias PCT P2159R1

Gly Glu Arg Ile Ser₂₀ Leu Ser Cys Arg Ala₂₅ Ser Glu Ser Val Asp₃₀
 Thr Tyr Leu His Trp₃₅ Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Glu Ser Pro Arg₄₅
 Leu Leu Ile Lys Tyr₅₀ Ala Ser Gln Ser Ile₅₅ Ser Gly Ile Pro Ser₆₀
 Arg Phe Ser Gly Ser₆₅ Gly Ser Gly Thr Asp₇₀ Phe Thr Leu Ser Ile₇₅
 Asn Gly Val Glu Leu₈₀ Glu Asp Leu Ser Ile₈₅ Tyr Tyr Cys Gln Gln₉₀
 Gly Asn Ser Leu Pro₉₅ Asn Thr Phe Gly Ala₁₀₀ Gly Thr Lys Leu Glu₁₀₅
 Leu Lys Arg Ala Asp₁₁₀ Ala Ala Pro Thr Val₁₁₅ Ser Ile Phe Pro Pro₁₂₀
 Ser Met Glu Gln Leu₁₂₅ Thr Ser Gly Gly Ala₁₃₀ Thr Val Val Cys Phe₁₃₅
 Val Asn Asn Phe Tyr₁₄₀ Pro Arg Asp Ile Ser₁₄₅ Val Lys Trp Lys Ile₁₅₀
 Asp Gly Ser Glu Gln₁₅₅ Arg Asp Gly Val Leu₁₆₀ Asp Ser Val Thr Asp₁₆₅
 Gln Asp Ser Lys Asp₁₇₀ Ser Thr Tyr Ser

<210> 13
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza secuencia

<400> 13
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly₁₀ Leu Val Lys Pro Ser₁₅
 Gln Ser Leu Ser Leu₂₀ Thr Cys Ser Val Thr₂₅ Gly Phe Phe Ile Thr₃₀
 Asn Asn Tyr Trp Gly₃₅ Trp Ile Arg Lys Phe₄₀ Pro Gly Asn Lys Met₄₅
 Glu Trp Met Gly Tyr₅₀ Ile Ser Tyr Ser Gly₅₅ Ser Thr Ser Tyr Asn₆₀
 Pro Ser Leu Lys Ser₆₅ Arg Ile Ser Ile Thr₇₀ Arg Asp Thr Ser Lys₇₅
 Asn Gln Phe Phe Leu₈₀ Gln Leu Asn Ser Val₈₅ Thr Thr Glu Asp Thr₉₀
 Ala Thr Tyr Tyr Cys₉₅ Ala Met Thr Gly Ser₁₀₀ Ser Gly Tyr Phe Asp₁₀₅
 Phe Trp Gly Pro Gly₁₁₀ Thr Met Val Thr Val₁₁₅ Ser Ser Ala Glu Thr₁₂₀
 Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu Lys



Lista de Secuencias PCT P2159R1

125

130

135

Ser Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val
140 145

<210> 14

<211> 80

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza secuencia

<400> 14

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
50 55 60

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 15

<211> 79

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza secuencia

<400> 15

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
35 40 45

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
50 55 60

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys
65 70 75

Val Glu Ile Lys

<210> 16

<211> 80

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza secuencia

<400> 16

477 477

Lista de Secuencias PCT P2159R1

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

<210> 17
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza secuencia

<400> 17
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
 1 5 10 15
 Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 20 25 30
 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 35 40 45
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
 50 55 60
 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 Lys Val Glu Ile Lys
 80

<210> 18
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza secuencia

<400> 18
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 20 25 30
 Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 35 40 45
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 50 55 60
 Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
 65 70 75

478 478

Lista de Secuencias PCT P2159R1

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 19
<211> 87
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 19
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg
35 40 45
Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
50 55 60
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 20
<211> 81
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 20
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 21
<211> 80
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 21
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly

474 479

Lista de Secuencias PCT P2159R1

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

<210> 22

<211> 79

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza secuencia

<400> 22

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

Ala Ser Val Lys Val	Ser Cys Lys Ala Ser	Trp Val Arg Gln Ala
	20	25

Pro Gly Gln Gly Leu	Glu Trp Met Arg Val	Thr Ile Thr Ala Asp
	35	40

Thr Ser Thr Ser Thr	Ala Tyr Met Glu Leu	Ser Ser Leu Arg Ser
	50	55

Glu Asp Thr Ala Val	Tyr Tyr Cys Trp Gly	Gln Gly Thr Leu Val
	65	70

Thr Val Ser Ser

<210> 23

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza secuencia

<400> 23

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

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

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

Leu Leu Ile Tyr Ala	Ala Ser Ser Leu Glu	Ser Gly Val Pro Ser
	50	55

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

480

Lista de Secuencias PCT P2159R1

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 24

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza secuencia

<400> 24

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

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

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

Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110

<210> 25

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza secuencia

<400> 25

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

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Lista de Secuencias PCT P2159R1

Gly Asn Ser Leu Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 26
<211> 117
<212> PRT
<213> Sequencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

```

<400> 26
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1          5          10          15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Ile Thr
 20          25          30
Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35          40          45
Glu Trp Val Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
 50          55          60
Pro Ser Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 65          70          75
Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 80          85          90
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp
 95          100          105
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110          115

```

<210> 27
<211> 214
<212> PRT
<213> Sequence Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

```

<400> 27
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1          5          10          15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 20          25          30
Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35          40          45
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50          55          60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65          70          75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80          85          90
Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

```

48482

Lista de Secuencias PCT P2159R1

95	100	105
Ile Lys Arg Thr Val	Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	Pro
110	115	120
Ser Asp Glu Gln Leu	Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	
125	130	135
Leu Asn Asn Phe Tyr	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val	
140	145	150
Asp Asn Ala Leu Gln	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu	
155	160	165
Gln Asp Ser Lys Asp	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr	
170	175	180
Leu Ser Lys Ala Asp	Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu	
185	190	195
Val Thr His Gln Gly	Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn	
200	205	210
Arg Gly Glu Cys		

<210> 28
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza secuencia

<400> 28
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe
 95 100 105
 Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 110 115 120
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 125 130 135
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 140 145 150
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 155 160 165

487 483

Lista de Secuencias PCT P2159R1

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
170 175 180

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
185 190 195

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
200 205 210

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
215 220 225

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
230 235 240

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
320 325 330

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
335 340 345

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
350 355 360

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
365 370 375

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
380 385 390

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
395 400 405

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
410 415 420

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
425 430 435

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
440 445

<210> 29
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 29
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

484

Lista de Secuencias PCT P2159R1

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

<210> 30
<211> 447
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 30
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Ile Thr
20 25 30
Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
50 55 60
Pro Ser Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
65 70 75
Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

485

Lista de Secuencias PCT P2159R1

80	85	90
Ala Val Tyr Tyr Cys 95	Ala Met Thr Gly Ser 100	Ser Gly Tyr Phe Asp 105
Phe Trp Gly Gln Gly 110	Thr Leu Val Thr Val 115	Ser Ser Ala Ser Thr 120
Lys Gly Pro Ser Val 125	Phe Pro Leu Ala Pro 130	Ser Ser Lys Ser Thr 135
Ser Gly Gly Thr Ala 140	Ala Leu Gly Cys Leu 145	Val Lys Asp Tyr Phe 150
Pro Glu Pro Val Thr 155	Val Ser Trp Asn Ser 160	Gly Ala Leu Thr Ser 165
Gly Val His Thr Phe 170	Pro Ala Val Leu Gln 175	Ser Ser Gly Leu Tyr 180
Ser Leu Ser Ser Val 185	Val Thr Val Pro Ser 190	Ser Ser Leu Gly Thr 195
Gln Thr Tyr Ile Cys 200	Asn Val Asn His Lys 205	Pro Ser Asn Thr Lys 210
Val Asp Lys Lys Val 215	Glu Pro Lys Ser Cys 220	Asp Lys Thr His Thr 225
Cys Pro Pro Cys Pro 230	Ala Pro Glu Leu Leu 235	Gly Gly Pro Ser Val 240
Phe Leu Phe Pro Pro 245	Lys Pro Lys Asp Thr 250	Leu Met Ile Ser Arg 255
Thr Pro Glu Val Thr 260	Cys Val Val Val Asp 265	Val Ser His Glu Asp 270
Pro Glu Val Lys Phe 275	Asn Trp Tyr Val Asp 280	Gly Val Glu Val His 285
Asn Ala Lys Thr Lys 290	Pro Arg Glu Glu Gln 295	Tyr Asn Ser Thr Tyr 300
Arg Val Val Ser Val 305	Leu Thr Val Leu His 310	Gln Asp Trp Leu Asn 315
Gly Lys Glu Tyr Lys 320	Cys Lys Val Ser Asn 325	Lys Ala Leu Pro Ala 330
Pro Ile Glu Lys Thr 335	Ile Ser Lys Ala Lys 340	Gly Gln Pro Arg Glu 345
Pro Gln Val Tyr Thr 350	Leu Pro Pro Ser Arg 355	Glu Glu Met Thr Lys 360
Asn Gln Val Ser Leu 365	Thr Cys Leu Val Lys 370	Gly Phe Tyr Pro Ser 375
Asp Ile Ala Val Glu 380	Trp Glu Ser Asn Gly 385	Gln Pro Glu Asn Asn 390
Tyr Lys Thr Thr Pro 395	Pro Val Leu Asp Ser 400	Asp Gly Ser Phe Phe 405
Leu Tyr Ser Lys Leu 410	Thr Val Asp Lys Ser 415	Arg Trp Gln Gln Gly 420

486

Lista de Secuencias PCT P2159R1

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
425 430 435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
440 445

<210> 31
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 31
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp
20 25 30
Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Gly Asn Ser Leu Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
110 115 120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
125 130 135
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
140 145 150
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
155 160 165
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
170 175 180
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185 190 195
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200 205 210

Arg Gly Glu Cys

<210> 32
<211> 447
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

47A 487

Lista de Secuencias PCT P2159R1

<400> 32
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Ile Thr
 20 25 30
 Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
 50 55 60
 Pro Ser Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
 65 70 75
 Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 80 85 90
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp
 95 100 105
 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 110 115 120
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 125 130 135
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 140 145 150
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 155 160 165
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 170 175 180
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 185 190 195
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 200 205 210
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 215 220 225
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 320 325 330
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu

481 488

Lista de Secuencias PCT P2159R1

335	340	345
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys	350	360
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	365	375
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	380	390
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	395	405
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly	410	420
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His	425	435
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	440	445

<210> 33
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Se sintetiza secuencia
 <400> 33
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp
 20 25 30
 Asp Leu Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Gly Asn Ser Leu Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 110 115 120
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 125 130 135
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 140 145 150
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180

44489

Lista de Secuencias PCT P2159R1

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185 190 195

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200 205 210

Arg Gly Glu Cys

<210> 34
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 34
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 35
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 35
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
5 10

<210> 36
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 36
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 37
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
5 10

<210> 38
<211> 25

490

Lista de Secuencias PCT P2159R1

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza secuencia

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 39

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza secuencia

<400> 39

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 40

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza secuencia

<400> 40

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza secuencia

<400> 41

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 42

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza secuencia

<400> 42

Arg Phe Thr Ile Ser Xaa Asp Xaa Ser Lys Asn Thr Xaa Tyr Leu
1 5 10 15

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

497

Lista de Secuencias PCT P2159R1

20

25

30

Ala

<210> 43
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza secuencia

<400> 43
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

Ala

<210> 44
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza secuencia

<400> 44
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

Ala

<210> 45
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza secuencia

<400> 45
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Phe Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

Ala

<210> 46
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza secuencia

<400> 46

492

Lista de Secuencias PCT P2159R1

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Phe Tyr Leu
1 5 10 15

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

Ala

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza secuencia

<400> 47

Ala Ser Glu Ser Val Asp Asp Leu Leu His
5 10

<210> 48

<211> 87

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza secuencia

<400> 48

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

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30

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

Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
50 55 60

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 49

<211> 81

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza secuencia

<400> 49

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

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60

493 493

Lista de Secuencias PCT P2159R1

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 50
<211> 80
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 50
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75
Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 51
<211> 79
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 51
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75
Thr Val Ser Ser

<210> 52
<211> 87
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

494

Lista de Secuencias PCT P2159R1

<400> 52
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
 35 40 45
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 50 55 60
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 65 70 75
 Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 80 85

<210> 53
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza secuencia

<400> 53
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 35 40 45
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 80

<210> 54
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza secuencia

<400> 54
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 35 40 45
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60

495

Lista de Secuencias PCT P2159R1

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 55
<211> 79
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 55
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75
Thr Val Ser Ser

<210> 56
<211> 87
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 56
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
35 40 45
Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
50 55 60
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 57
<211> 81
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

496

Lista de Secuencias PCT P2159R1

<400> 57
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
 35 40 45
 Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 80

<210> 58
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza secuencia

<400> 58
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
 35 40 45
 Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 65 70 75
 Val Thr Val Ser Ser
 80

<210> 59
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza secuencia

<400> 59
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
 20 25 30
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
 35 40 45
 Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 50 55 60
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

497

Lista de Secuencias PCT P2159R1

65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 60
<211> 81
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 60
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 61
<211> 80
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 61
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75
Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 62
<211> 79
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Se sintetiza secuencia

<400> 62

497/498

Lista de Secuencias PCT P2159R1

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

<210> 63
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza secuencia

<400> 63
 Ala Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
 5 10

<210> 64
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza secuencia

<400> 64
 Ala Arg Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
 5 10

<210> 65
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza secuencia

<400> 65
 Ala Gln Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
 5 10

<210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Se sintetiza secuencia

<400> 66
 Arg Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
 5 10

<210> 67
 <211> 8

494 499

Lista de Secuencias PCT P2159R1

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza secuencia

<400> 67

Arg Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
5

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Se sintetiza secuencia

<400> 68

Xaa Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
5

300

AMENDED
PAGE

~~501~~ 501

FIGS 9A and 9B depict an amino acid sequence of the variable chains of rat anti-mouse integrin beta7 Fib504 antibody produced by the hybridoma ATCC HB-293. HVRs are underlined. Variable light chain is depicted in Fig 9A (SEQ ID NO 12) and variable heavy chain is depicted in Fig. 9B (SEQ ID NO 13).

FIG 10A depicts amino acid positions in the heavy chain of various consensus sequences (hu subgroups I-III). The consensus sequence used for development of the Herceptin® anti-HER2 antibody, rat Fib504, and hu504-RL and hu504-RF frameworks are described in the Examples herein. Fig 10B is a bar graph showing the relative binding of alpha4beta7 to hu504graft antibody and hu504Kgraft antibody as a function of "RL" or "RF" framework modifications as described in Example 1.

FIG 11A-11C. FIG 11A tabulates the HVR changes resulting from affinity-maturation performed by offering a limited range of amino acid substitutions in the hu504 16 variant. The results are from libraries with individually modified HVRs in the hu504 16 variant as described in Example 2 herein. Amino acid abbreviations in boxes are amino acids found more frequently in the beta7-binding antibodies (phage-selected antibodies). FIGS 11B and 11C are bar graphs of the results in Fig 11A indicating the number and type of amino acid substitutions in the hu504 16 variant (light chain, Fig 11B, heavy chain, Fig 11C) detectable by the mutagenesis and selection methods of Example 2.

FIG 12 tabulates the results of affinity maturation performed by offering a broad range of possible amino acid substitutions in the HVRs of hu504 32 variant as described in Example 2. The boxes indicate the amino acid that was detected most frequently in antibodies detected as beta7-binding antibodies by the mutagenesis and selection methods of Example 2.

FIGS. 13A and 13B depict HVR sequences of rat anti-mouse Fib504 (ATCC-293), and the human consensus (left columns). Examples of amino acid substitutions observed for each HVR position (not meant to be limiting) by the assays described in the Examples (amino acid substitutions observed by soft amino acid randomization, broad amino acid substitution scan, and limited amino acid substitution scan) are shown to the right, (a useful method of modifying HVRs for humanization, applicable to variants of the present invention, is found in US Application Serial No. 60/545,840, filed February 19, 2004).

FIG 14 is an exemplary graphical representation of Fib504 and variant antibody binding to MAdCAM as a function of antibody concentration as described in Example 3. IC₅₀ and IC₉₀ values for the antibodies were determined.

FIGS. 15A and 15B depict the light and heavy chain HVR amino acid sequences for the 504 32R anti-beta7 antibody with respect to position according to the Kabat numbering system and a relative numbering system (A-F) for the six HVRs of the antibody. Amino acids at positions 71, 73, and 78 of the heavy chain FR3 region are also depicted. Useful amino acid substitutions are also listed for many of the positions in the HVRs or the heavy chain FR3 region.

FIG 16 shows bar graphs of the relative ability of the 504 32M and 504 32R antibodies to block homing of radiolabelled T cells to the colon of mice experiencing inflammatory bowel disease.

502

HOJA
MODIFICADA

La figura 12 tabula los resultados de la maduración de afinidad desarrollada al ofrecer un amplio rango de posibles sustituciones de aminoácidos en los HVR de la variante Hu504 32 como se describió en el ejemplo las cajas indican el aminoácido que fue detectado más frecuentemente en los anti cuerpos detectados como anticuerpos de unión beta7 mediante la mutagenesis y los métodos de selección del ejemplo 2

Figuras 13A y 13B describen las secuencias HVR del Fib504 anti ratón (ATCC-293), y el consenso humano (columnas izquierdas) Los ejemplos de sustituciones de aminoácido observadas para cada posición HVR (no significan ser limitantes) durante los ensayos descritos en los ejemplos (sustituciones de amino ácido observadas mediante aleatorización de amino ácido suave, exploración amplia de sustitución de aminoácido, y exploración limitada de sustitución de aminoácido) son mostrados a la derecha, (un método útil para modificar los HVR para humanización, aplicable a las variantes de la presente invención, se encuentra en la solicitud US serie No 60/545, 840, presentada en Febrero 19, 2004)

La figura 14 es una representación gráfica de ejemplo de la Fib504 y el anti cuerpo variante que se une al MADCAM como una función de concentración de anti cuerpo como se describió en el ejemplo 3 Se determinaron Los valores IC_{50} e IC_{90} para los anticuerpos

Las figuras 15A y 15B describen las secuencias de aminoácido HVR de cadena ligera y pesada para el anti cuerpo anti-beta7 504 32R con

HOJA MODIFICADA

PATENT COOPERATION TREATY

JUL 19 2006

PCT GENENTECH INC.
LEGAL DEPT

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

GENENTECH, INC
Attn: Conley, Deirdre L
1 DNA Way MS49
South San Francisco, CA 94080
UNITED STATES OF AMERICANOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY OR THE DECLARATION

Calendared/EC

30 Day US IDS - P21592/US

13 Aug 06

(PCT Rule 44.1)

Due Date	Date of filing (day/month/year)
	14/07/2006
Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
P215921	
International application No	International filing date (day/month/year)
PCT/US2005/031401	02/09/2005
Applicant	
GENENTECH, INC	

- 1 ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 18:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 48)

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20 Switzerland Facsimile No (41-22) 338 82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

- 2 ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Office
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made

4 Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 18 months from the priority date but only in respect of some designated Offices a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later) otherwise the applicant must, within 30 months from the priority date perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 18 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II National Chapters and the WIPO Internet site

Name and mailing address of the International Searching Authority	Authorized officer
 European Patent Office P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016	Catriona Cleere

Form PCT/IBA/220 (January 2004)

(See notes on accompanying sheet)

304 505

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule" and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g., the applicant wants the latter to be published for the purpose of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 18 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 48.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 48.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 206(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)).

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PATENT COOPERATION TREA

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P215921	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as where applicable Item 5 below	
International application No PCT/US2005/031401	International filing date (day/month/year) 02/09/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 03/09/2004
Applicant GENENTECH, INC		

This International search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International search report consists of a total of 8 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1 Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of



the international application in the language in which it was filed



a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application see Box No. I

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant



the text has been established by this Authority to read as follows

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant



the text has been established according to Rule 38.2(b) by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant



as selected by this Authority because the applicant failed to suggest a figure



as selected by this Authority because this figure better characterizes the invention

b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

507

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/031401

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

- 1 With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the International application and necessary to the claimed invention the International search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ on paper
- ☒ in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- ☐ contained in the International application as filed
- ☐ filed together with the International application in electronic form
- ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
- 2 ☒ In addition in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed as appropriate were furnished
3. Additional comments.

307 508

PCT/US2005/031401

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV C07K16/28 A61K39/395 C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PICARELLA D ET AL "MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR BETA7 INTEGRIN AND MUCOSAL ADDRESSIN CELL ADHESION MOLECULE-1 (MADCAM-1) REDUCE INFLAMMATION IN THE COLON OF SCID MICE RECONSTITUTED WITH CD45RBHIGH CD4+T CELLS" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO BALTIMORE, US, vol 158, 1997, pages 2099-2106, XP001030596 ISSN 0022-1767 abstract page 2100, left-hand column, paragraph 3 figure 4 page 2105, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 4 ----- -/-	1,2,4-8, 36-50

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

Special categories of cited documents

- A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- E earlier document but published on or after the international filing date
- L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 June 2006

Date of mailing of the international search report

14/07/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5816 Patentien 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-3040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Irion, A

308 509

PCT/US2005/031401

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/24673 A (LEUKOSITE, INC, BRISKIN, MICHAEL, J, RINGLER, DOUGLAS, J, PICARELLA, D) 15 August 1996 (1996-08-15) page 6, line 1 - line 29 page 38, line 3 - line 17 page 40, line 24 - page 42, line 19	1,2,4-8, 36-50
Y		3,9-35
X	SUN XUEYING ET AL "beta7 Integrins contribute to skin graft rejection" TRANSPLANTATION (BALTIMORE), vol 74, no 8, 27 October 2002 (2002-10-27), pages 1202-1203, XP009067864 ISSN 0041-1337 abstract	1,2,4-8, 36-50
X	TIDSWELL M ET AL "Structure-function analysis of the integrin beta 7 subunit identification of domains involved in adhesion to MAdCAM-1" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILLIAMS & WILKINS CO, US, vol 159, no 3, 1 August 1997 (1997-08-01), pages 1497-1505, XP002200150 ISSN 0022-1767 cited in the application the whole document	1,2,4-8, 36-50
X	WO 00/40604 A (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC, BRENNER, MICHAEL, B, PARKER, CH) 13 July 2000 (2000-07-13) page 9, line 12 - line 24 page 20, line 28 - page 21, line 9 page 22, line 15 - line 26	1,2,4-8, 36-50
Y		3,9-35
Y	LEE C V ET AL "High-affinity Human Antibodies from Phage-displayed Synthetic Fab Libraries with a Single Framework Scaffold" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol 340, no 5, 23 July 2004 (2004-07-23), pages 1073-1093, XP004518119 ISSN 0022-2836 the whole document	3,9-35
Y	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US, 2004, "Methods in Molecular Biology" XP002386207 Database accession no PREV200600158659 abstract	3,9-35
	-/--	

3

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY HUMANA PRESS INC, 999 RIVERVIEW DR, STE 208, TOTOWA, NJ 07512-1165 USA SERIES METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (ISSN 1064-3745(PRINT)), 2004, ISSN 1-58829-092-1(H)	
Y	WU H ET AL "STEPWISE' IN VITRO AFFINITY MATURATION OF VITAXIN, AN ALPHAVBETA3-SPECIFIC HUMANIZED MAB" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol 95, no 11, 26 May 1998 (1998-05-26), pages 6037-6042, XP000918969 ISSN 0027-8424 the whole document	3,9-35
Y	RADER C ET AL "A PHAGE DISPLAY APPROACH FOR RAPID ANTIBODY HUMANIZATION DESIGNED COMBINATORIAL V GENE LIBRARIES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol 95, 21 July 1998 (1998-07-21), pages 8910-8915, XP000941357 ISSN 0027-8424 the whole document	3,9-35
Y	YANG W-P ET AL "CDR WALKING MUTAGENESIS FOR THE AFFINITY MATURATION OF A POTENT HUMAN ANTI-HIV-1 ANTIBODY INTO THE PICOMOLAR RANGE" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol 254, 1995, pages 392-403, XP000199739 ISSN 0022-2836 the whole document	3,9-35
Y	HANES J ET AL "PICOMOLAR AFFINITY ANTIBODIES FROM A FULLY SYNTHETIC NAIVE LIBRARY SELECTED AND EVOLVED BY RIBOSOME DISPLAY" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol 18, no 12, December 2000 (2000-12), pages 1287-1292, XP001121946 ISSN 1087-0156 the whole document	3,9-35

-/--

511

PCT/US2005/031401

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TORAN J L ET AL "Improvement in affinity and HIV-1 neutralization by somatic mutation in the heavy chain first complementarity-determining region of antibodies triggered by HIV-1 infection" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, DE, vol 31, no 1, January 2001 (2001-01), pages 128-137, XP002239557 ISSN 0014-2980 the whole document	3,9-35
P,X	WO 2005/080432 A (GENENTECH, INC, DENNIS, MARK S) 1 September 2005 (2005-09-01) the whole document	1-50

511 str

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/031401

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons

- 1 ☒ Claims Nos. because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority namely
Although claims 36-48 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition
- 2 ☐ Claims Nos. because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically
3. ☐ Claims Nos. because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows.

- 1 ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee this Authority did not invite payment of any additional fee
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.
- 4 ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

512-513

Information on patent family members

PCT/US2005/031401

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9624673	A	15-08-1996	AU 4986296 A	27-08-1996
			CA 2212702 A1	15-08-1996
			EP 0808367 A1	26-11-1997
			JP 10513365 T	22-12-1998
			NZ 303523 A	01-02-2002
WO 0040604	A	13-07-2000	AU 2390400 A	24-07-2000
WO 2005080432	A	01-09-2005	NONE	

514

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No
PCT/US2005/031401

International filing date (day/month/year)
02 09 2005

Priority date (day/month/year)
03 09 2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV C07K16/28 A61K39/395 C07K16/18

Applicant
GENENTECH, INC

1 This opinion contains indications relating to the following items

- ☒ Box No I Basis of the opinion
- ☐ Box No II Priority
- ☒ Box No III Non-establishment of opinion with regard to novelty inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No V Reasoned statement under Rule 43bis 1 (a)(i) with regard to novelty inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No VI Certain documents cited
- ☐ Box No VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No VIII Certain observations on the international application

2 FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 88 1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later

For further options, see Form PCT/ISA/220

3 For further details see notes to Form PCT/ISA/220

Name and mailing address of the ISA



European Patent Office
D-80286 Munich
Tel +49 89 2369 0 Tx 523656 epmu d
Fax +49 89 2369 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Irion, A

Telephone No. +49 89 2369-8174



515

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No
PCT/US2005/031401

Box No 1 Basis of the opinion

- 1 With regard to the language this opinion has been established on the basis of
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
- 2 With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention this opinion has been established on the basis of
- a type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b format of material
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c time of filing/furnishing
 - ☐ contained in the international application as filed
 - ☐ filed together with the international application in electronic form
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
- 3 ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished
- 4 Additional comments

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No
PCT/US2005/031401

Box No III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel to involve an inventive step (to be non obvious) or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos 2,3,5,50

because

☒ the said international application or the said claims Nos 35-48 (IA) relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos 2,3,5-50 (N IS, IA) are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

see separate sheet

☐ the claims, or said claims Nos are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing, the applicant did not, within the prescribed time limit

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter 1(a) or (b)

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings, the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing if in electronic form only do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions

☐ See Supplemental Box for further details

5/16 SH

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No
PCT/US2005/031401

**Box No V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or
industrial applicability, citations and explanations supporting such statement**

1 Statement

Novelty (N)	Yes	Claims	3,9-35
	No	Claims	1,2,4-8 36-50
Inventive step (IS)	Yes	Claims	
	No	Claims	1 50
Industrial applicability (IA)	Yes	Claims	1 35,49,50
	No	Claims	

2 Citations and explanations

see separate sheet

Box No VI Certain documents cited

1 Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and / or

2 Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No

PCT/US2005/031401

Item I

- I 1** The sequence listing pages 1-13 filed with letter of 24 04 2006 do not form part of the application (Rule 13ter 1(f) PCT)

Item III

III 1 With respect to claims 2, 3, 5-25, 36-50

The polypeptides or antibodies of claims 2, 3, 5-25, 36-50 are defined by comprising "at least one variant HVR, wherein the variant HVR comprises modification of at least one residue of any of the sequences depicted in SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, or 6". Therefore, claims 2, 3, 5-25 relate to an extremely large number of possible molecules and are unclear within the meaning of Article 6 PCT. In order to determine the scope of the claims the skilled person would have to test all known and yet unknown antibodies on their binding activity to beta7 and further identify the CDR sequences. As this screening program represents certainly an undue burden, the scope of claims 2, 3, 5-25 is not clear. In the present case, the claims so lack clarity, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search, and thus the examination, has been carried out for those parts of the claims which in view of the application as a whole appear to be clear, namely those parts relating to anti-beta7 antibodies in general and anti-beta7 antibodies comprising the CDRs as referred to SEQ ID NO 1-9, and 63-68. Same applies to claims 36-50 referring to the antibodies of the claims cited above.

III 2 With respect to claims 26-50

Claims 26-35 relate to a humanized anti-beta7 antibody which has a desired property or effect, i.e. the monovalent affinity of the antibody to human beta7 is the same as or greater than monovalent affinity of an antibody defined by the sequences as referred to SEQ ID NO 10-13. Said claims do not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not clearly defined. The claims attempt to define the subject-matter in terms of the result to be achieved, which merely amounts to a statement of the underlying problem, without providing the technical features necessary for achieving this result. In order to determine the scope of the claims the skilled person would have to test all known and yet unknown antibodies on their binding affinity to beta7. As this screening program represents certainly an undue burden, the scope of claims 26-35 is not clear. In the present case, the claims so lack clarity, that a meaningful search over the whole of the

518/519

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No

PCT/US2005/031401

claimed scope is impossible. Consequently, the search, and thus the examination, has been carried out for those parts of the claims which in view of the application as a whole appear to be clear, namely those parts relating to anti-beta7 antibodies having the requested binding affinity, i.e. the antibody variants referred to as FIB 504 5, 504 16, 504 32 (p. 114 Table 3). Same applies to claims 36-50 referring to the antibodies of the claims cited above.

III.3 With respect to claims 36-48

Claims 36-48 relate (at least in part, as far as an in vivo method is concerned) to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67 1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(I) PCT).

Item V

V 1 Reference is made to following documents

- D1 D PICARELLA ET AL. 'Monoclonal antibodies specific for beta 7 Integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) reduce inflammation in the colon of scid mice reconstituted with CD45RB^{high} CD4⁺ T cells', JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 1 March 1997 (1997-03-01), vol. 158, no. 5, pages 2099-2106
- D2 WO9624673 (LEUKOSITE, INC) 15 August 1996 (1996-08-15)
- D3 X SUN ET AL. 'beta7 Integrins contribute to skin graft rejection', TRANSPLANTATION, 27 October 2002 (2002-10-27), vol. 74, no. 8, pages 1202-1203
- D4 M TIDSWELL ET AL. 'Structure-function analysis of the integrin beta 7 subunit: identification of domains involved in adhesion to MAdCAM-1', JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 01 August 1997 (1997-08-01), vol. 159, no. 3, pages 1497-1505
- D5 WO0040604 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC) 13 July 2000 (2000-07-13)
- D6 C V LEE ET AL. 'High-affinity Human Antibodies from Phage-displayed Synthetic Fab Libraries with a Single Framework Scaffold', JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 23 July 2003 (2004-07-23), vol. 340, no. 5, pages 1073-1093
- D7 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Humana Press Inc, Totowa, USA, Ed

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No

PCT/US2005/031401

- BKC LO, ISBN 1-58829-092-1, Release date December 2003, PART III 'Antibody Expression and Optimization, Chapters 18-21 'Directed mutagenesis of antibody variable domains' (p 319), 'Antibody affinity maturation by chain shuffling' (p 327), 'Antibody affinity maturation by random mutagenesis' (p 343), Developing a minimally immunogenic humanized antibody by SDR grafting' (p 361)
- D8 H WU ET AL 'Stepwise In vitro affinity maturation of Vitaxin, an alphavbeta3-specific humanized mAb', PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, 26 May 1998 (1998-05-26), vol 95, no 11, pages 6037-6042
- D9 C RADER ET AL 'A phage display approach for rapid antibody humanization Designed combinatorial V gene libraries', PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, 21 July 1998 (1998-07-21), vol 95, no 15, pages 8910-8915
- D10 W-P YANG ET AL 'CDR walking mutagenesis of the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range', JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 1995, vol 254, no 3, pages 392-403
- D11 J HANES ET AL 'Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display', NATURE BIOTECHNOLOGY, December 2000 (2000-12-00), vol 18, no 12, pages 1287-1292
- D12 J L TORAN ET AL 'Improvement in affinity and HIV-1 neutralization by somatic mutation in the heavy chain first complementarity-determining region of antibodies triggered by HIV-1 infection', EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, January 2001 (2001-01-00), vol 31, no 1, pages 128-137
- D13 WO2005080432 (GENENTECH, INC) 01 September 2005 (2005-09-01)

V 2 Novelty (Article 33(2) PCT)

V 2 1 With respect to claim 1, 4, 5, and 36-50

The subject-matter of claims 1, 4, 5, and 36-50 refers to anti-beta7 antibodies comprising CDRs as referred to SEQ ID NO 1-6. It appears that the parent antibody FIB 504 comprises said CDRs as it is shown in Fig 1A and 1B. Therefore, the disclosure of D1-D5 describing FIB 504 and its binding characteristic as well as its effect on various diseases is considered novelty destroying for the subject-matter of claims 1, 4, 5, and 36-50. Thus, claims 1, 4, 5, and 36-50 do not meet the requirements of Article 33(2) PCT.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No

PCT/US2005/031401

V 2.2 With respect to claims 2, 6, 7, 8, 36-50

The subject-matter of claim 2 refers to HVR variants comprising modification of at least one residue of any of the sequences depicted in SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, or 6. An upper limit of the number of modified residues is not given. Therefore, all residues may be modified. Thus, each and every anti-beta7 antibody, humanized or not, falls under the subject-matter of claim 2. Therefore, claims 2, 6, 7, 8, 36-50 lack novelty over D1-D5 (D2 e.g. discloses humanized antibodies derived from FIB 504 which are used to treat inflammatory bowel diseases p. 6 | 7-29, D5 e.g. discloses humanized FIB 504 antibodies p. 9 | 15-18, p. 22 | 15-26).

V 2.3 With respect to claims 3 and 9-35

The subject-matter of claims 3 and 9-35, as far as it is clear and searched, does not appear to be disclosed in the available prior art documents. Therefore, claims 3 and 9-35 are considered novel in the sense of Article 33(2) PCT.

V 3 Inventive step (Article 33(3) PCT)

V 3.1 With respect to claims 3 and 9-35

The subject-matter of claims 3 and 9-35 differs from D2 or D5 in that the sequence of the CDRs of the anti-beta7 antibody is different. The technical problem to be solved may be regarded as providing a humanized anti-beta7 antibody with an altered affinity than the parent rat antibody (FIB 504) (the binding affinity of the antibody referred to as 504.16 is less than that of the parent antibody). Methods for affinity maturation of antibodies are known to the person skilled in the art. D6, e.g., describes a method for producing anti-mVEGF antibodies with picomolar affinities, i.e. 0.016 nM (see also D7-D12). Therefore, it would be a routine procedure for the skilled person, starting from the known antibody FIB 504, to produce a humanized antibody with an altered, or even with an higher, affinity for beta7. Thus, the subject-matter of claims 3 and 9-35 is not considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT.

Though, if the antibodies of the present application defined by the sequences of six CDRs would show a surprising effect *in vivo*, then the antibodies and the use of said antibodies for preparing a medicament would be considered inventive. However, the present application lacks comparative experimental data to support a surprising effect.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No

PCT/US2005/031401

V 4 Industrial applicability (Article 33(4) PCT)

V 4.1 With respect to claims 1-35, 49, and 50

The subject-matter of claims 1-35, 49 and 50 appear to be susceptible of Industrial application

V 4.2 With respect to claims 36-48

The subject-matter of claims 36-48 is considered (at least in part) to be a method of treatment by therapy of the human or animal body

For the assessment of the present claims 36-48 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

V 5 Further remarks

V 5.1 With respect to claims 2-50

The subject-matter of claim 2 and of all claims being dependent on claim 2 is unclear, since claim 2 refers to the variants of HVR of claim 1, but does not comprise the HVR as defined in claim 1, since said variants comprise "modification of at least one residue of any of the sequences depicted in SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, or 6. Therefore, claims 2-50 do not meet the requirements of Article 6 PCT.

V 5.2 With respect to claim 1

The subject-matter of claim 1 reads "HVR-L3 comprising sequence C1-C10, wherein C1-C10 is QQGNSLLPNT (SEQ ID NO 3). However, the sequence referred to as SEQ ID NO 3 in the sequence listing is C1-C9 QQGNSLPNT (see also claims 5 and 34 and Figure 1 where it reads QQGNSLPNT).

Item VI

VI.1 With respect to document D13

The examination report has been based on an assumed valid priority for the present

503

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No

PCT/US2005/031401

application Should the priority of the present application not be valid, the above cited document D13 would be relevant with respect to novelty and inventive step (Article 33(2) and (3) PCT) Furthermore, should the present application be entered into the regional phase, the document D13 could be relevant to the question of novelty

524

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2005/031401

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

To

CONLEY Deirdre L
MS 49
1 DNA Way
South San Francisco California 94080
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

(PCT Administrative Instructions Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 18 January 2006 (18 01 2006)	
Applicant's or agent's file reference P2159R1	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2005/031401	International filing date (day/month/year) 02 September 2005 (02 09 2005)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 03 September 2004 (03 09 2004)
Applicant GENENTECH INC et al	

- 1 By means of this Form which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR" in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17 1(a) or (b).
- 2 (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17 1(a) or (b). Where, under Rule 17 1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17 1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity upon entry into the national phase to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- 3 (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt in the right hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17 1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17 1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17 1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17 1(a) or (b) the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17 1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity upon entry into the national phase to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
03 September 2004 (03 09 2004)	80/807 377	US	18 December 2005 (18 12 2005)

The International Bureau of WIPO
14 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20 Switzerland

Authorized officer

Pirou Pascal

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Facsimile No. +41 22 338 87 20

Telephone No. +41 22 338 81 98

Form PCT/IB/304 (January 2004)

CPWR91PR

Patent Docket No. P2159R.

PATENT COOPERATION TREATY

In re Application of
GENENTECH INC et al

International Application No PCT/US2005/031401

International Filing Date: 02 September 2005

Title HUMANIZED ANTI-BETA7 ANTAGONISTS AND USES THEREFOR

RESPONSE TO INVITATION TO CORRECT DEFECTS

Via Express Mail
ATTN Rita Dozier
MS PCT
Commissioner for Patents
P O Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

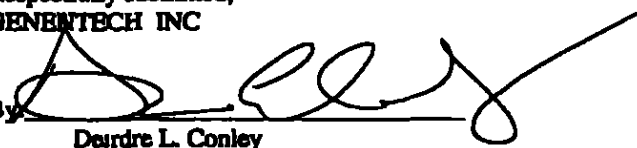
Dear Ms Dozier

In response to the Invitation to Correct Defects mailed 05 December 2005 applicant Genentech Inc. encloses 21 sheets of formal drawings. Also enclosed is a copy of Genentech's request for a one-month extension of time from 05 January 2006 to 05 February 2006 to submit formal drawings.

Also enclosed are replacement pages 28 and 29 of the specification. These pages contain the following changes to the description of the drawings to conform to the formal figures:

- (1) At line 30 on original page 28 at the sentence beginning "The boxes indicate." the word "shaded" was removed before the word "boxes" at line 26 on replacement page 28.
- (2) At line 33 on original page 28 "FIG 13 depicts" has been replaced by FIGS 13A and 13B depict at line 29 on replacement page 28.
- (3) At line 7 on original page 28 "FIG 15 depicts" has been replaced by "FIGS 15A and 15B depict" on line 6 on replacement page 29.

Respectfully submitted,
GENENTECH INC

By 

Deirdre L. Conley
Reg. No. 36,487

Dated 31 January 2006
Genentech Inc
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990
United States of America
Tel. (650) 225-2066
Fax (650) 952-9881

255
226

human VH subgroup III consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO 52)

human VH subgroup III consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs 53-55)

human VH acceptor framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO 56)

human VH acceptor framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs 57-58)

human VH acceptor 2 framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO 59)

human VH acceptor 2 framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs 60-62)

FIGS 9A and 9B depict an amino acid sequence of the variable chains of rat anti-mouse integrin beta7 Fib504 antibody produced by the hybridoma ATCC HB-293. HVRs are underlined. Variable light chain is depicted in Fig. 9A (SEQ ID NO 12) and variable heavy chain is depicted in Fig. 9B (SEQ ID NO 13).

FIG. 10A depicts amino acid positions in the heavy chain of various consensus sequences (human subgroups I-III). The consensus sequence used for development of the Herceptin® anti-HER2 antibody, rat Fib504, and hu504-RL and hu504-RF frameworks are described in the Examples herein. Fig. 10B is a bar graph showing the relative binding of alpha4beta7 to hu504graft antibody and hu504Kgraft antibody as a function of "RL" or "RF" framework modifications as described in Example 1.

FIG. 11A-11C. FIG. 11A tabulates the HVR changes resulting from affinity-maturation performed by offering a limited range of amino acid substitutions in the hu504 16 variant. The results are from libraries with individually modified HVRs in the hu504 16 variant as described in Example 2 herein. Amino acid abbreviations in boxes are amino acids found more frequently in the beta7-binding antibodies (phage-selected antibodies). FIGS. 11B and 11C are bar graphs of the results in Fig. 11A indicating the number and type of amino acid substitutions in the hu504 16 variant (light chain, Fig. 11B, heavy chain Fig. 11C) detectable by the mutagenesis and selection methods of Example 2.

FIG. 12 tabulates the results of affinity maturation performed by offering a broad range of possible amino acid substitutions in the HVRs of hu504 32 variant as described in Example 2. The shaded boxes indicate the amino acid that was detected most frequently in antibodies detected as beta7-binding antibodies by the mutagenesis and selection methods of Example 2.

FIGS. 13A and 13B depict HVR sequences of rat anti-mouse Fib504 (ATCC-293), and the human consensus (left columns). Examples of amino acid substitutions observed for each HVR position (not meant to be limiting) by the assays described in the Examples (amino acid substitutions observed by soft amino acid randomization, broad amino acid substitution scan, and limited amino acid substitution scan) are shown to the right, (a useful method of modifying HVRs for humanization, applicable to variants of the present

invention is found in US Application Serial No 60/545,840, filed February 19, 2004)

FIG 14 is an exemplary graphical representation of Fib504 and variant antibody binding to MAdCAM as a function of antibody concentration as described in Example 3 IC₅₀ and IC₉₀ values for the antibodies were determined

FIGS 15A and 15B depicts the light and heavy chain HVR amino acid sequences for the 504 32R anti-beta7 antibody with respect to position according to the Kabat numbering system and a relative numbering system (A-F) for the six HVRs of the antibody Amino acids at positions 71, 73, and 78 of the heavy chain FR3 region are also depicted Useful amino acid substitutions are also listed for many of the positions in the HVRs or the heavy chain FR3 region

FIG 16 shows bar graphs of the relative ability of the 504 32M and 504 32R antibodies to block homing of radiolabelled T cells to the colon of mice experiencing inflammatory bowel disease

MODES FOR CARRYING OUT THE INVENTION

The invention provides methods, compositions, kits and articles of manufacture for identifying and/or using inhibitors of the beta7 signaling pathway

Details of these methods, compositions, kits and articles of manufacture are provided herein

General Techniques

The practice of the present invention will employ unless otherwise indicated, conventional techniques of molecular biology (including recombinant techniques) microbiology, cell biology, biochemistry, and immunology which are within the skill of the art Such techniques are explained fully in the literature, such as, '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)

Definitions

By "beta7 subunit" or "β7 subunit" is meant the human β7 integrin subunit (Erle et al (1991) J Biol Chem 266 11009-11016) The beta7 subunit associates with alpha4 integrin subunit, such as the human α4 subunit (Kilger and Holzmann (1995) J Mol Biol 73 347-354) The alpha4beta7 integrin is expressed on a majority of mature lymphocytes, as well as a small population of thymocytes, bone marrow cells and mast cells (Kilshaw and Murrant (1991) Eur J Immunol 21 2591-2597, Gurish et al , (1992) 149 1964-1972 and Shaw, S K and Brenner, M B (1995)



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JULY 18, 2005

PTAS

DEIRDRE L CONLEY
GENENTECH, INC
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

**CORRECTED
NOTICE**

**UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT**

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF
THE U S PATENT AND TRADEMARK OFFICE A COMPLETE MICROFILM COPY IS
AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER
REFERENCED BELOW

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE THE
INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA
PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM IF YOU SHOULD
FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE YOU MAY
CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 703-308-9723
PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO U S PATENT AND TRADEMARK OFFICE,
MAIL STOP ASSIGNMENT SERVICES DIVISION, P O BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313

RECORDATION DATE 04/27/2005

REEL/FRAME 016173/0349
NUMBER OF PAGES 4

BRIEF ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS)

ASSIGNOR

FONG, SHERMAN

DOC DATE 04/22/2005

ASSIGNOR

DENNIS, MARK S

DOC DATE 04/26/2005

ASSIGNEE

GENENTECH, INC
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA

94080-4990

SERIAL NUMBER 60607377

FILING DATE 09/03/2004

PATENT NUMBER

ISSUE DATE

TITLE HUMANIZED ANTI-BETA7 ANTAGONISTS AND USES THEREFOR

528
529

016173/0349 PAGE 2

SEDLEY PYNE, PARALEGAL
ASSIGNMENT DIVISION
OFFICE OF PUBLIC RECORDS

530

Patent Docket PR2159

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of	Group Art Unit. To Be Assigned
Sherman Fong et al	Examiner To Be Assigned
Serial No 60/607,377	Confirmation No 5794
Filed September 3, 2004	Customer No 09157
For HUMANIZED FIB504 AND USES THEREFOR	EXPRESS MAIL LABEL NO EV 385 660 058 US
	DATE OF DEPOSIT JUNE 30, 2005

**REQUEST FOR CORRECTION OF NOTICE OF RECORDATION
OF ASSIGNMENT DOCUMENT**

Mail Stop Assignments
Commissioner for Patents
P O Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir

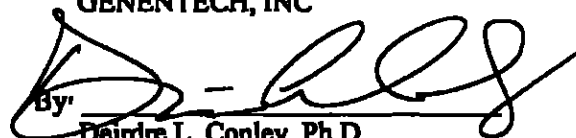
An Assignment of the above referenced patent application was transmitted via facsimile to the USPTO Assignment Division on April 27, 2005. A Notice of Recordation of Assignment Document was returned via facsimile to Applicants on June 23, 2005. Upon review of this document, Applicants discovered an error in the "Assignor" section, which is indicated in the marked up copy submitted herewith. The "Assignor" section should read "FONG, SHERMAN" (not "GONG, SHERMAN"), as indicated by the Applicants on the submitted Recordation Form Cover Sheet, a copy of which is submitted herewith. Applicants request that this error be corrected.

Applicants feel that this was not their error and therefore no fees are due. In the event any additional fees are due in connection with the filing of this document, the Commissioner is authorized to charge such fees to our Deposit Account No 07-0630.

Respectfully submitted,

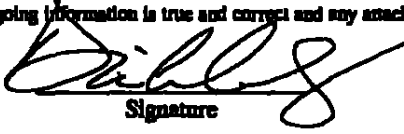
GENENTECH, INC

Date June 30, 2005

By 
Deirdre L. Conley, Ph D
Reg No 36,487
Telephone No (650) 225-2066

#183893

370 531

RECORDATION FORM COVER SHEET PATENTS ONLY		U S DEPARTMENT OF COMMERCE Patent and Trademark Office Any Dkt No: PR2139
Commissioner for Patents Please record the attached original documents or copy thereof		
1 Name of conveying party(ies) Sherman Fong Mark S Dennis Additional name(s) of conveying party(ies) attached? _ Yes ☒ No	2 Name and address of receiving party(ies) Name <u>GENENTECH, INC.</u> Internal Address Street Address <u>1 DNA Way</u> City <u>South San Francisco</u> State <u>California</u> ZIP <u>94080-4990</u> Additional name(s) & address(es) attached? _ Yes ☒ No	
3 Nature of conveyance ☒ Assignment Security Agreement Change of Name Other Execution Date <u>April 22, 2005, April 26, 2005</u>	Merger	
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) <u>60/607,377</u> B. Patent No.(s) 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 <u>1</u> 7 Total fee (37 CFR 3.41) \$ <u>40.00</u> _ Enclosed ☒ Authorized to be charged to deposit account 8 Deposit account number <u>07-0630</u>	
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. <u>Deirdre L. Conley, Ph.D.</u> Name of Person Signing Registration No 36,487  Signature <u>April 27, 2005</u> Date		
Total number of pages comprising cover sheet, attachments and document. <u>4</u> Revised (10/1/92)		

57 532

Docket No PR2159

ASSIGNMENT

WHEREAS Sherman Fong a citizen of USA residing at 19 Basinside Way, Alameda, CA 94602 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 FIB804 AND USES THEREFOR

for which a provisional application Serial No 80/607 377 (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 expenses 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

572/533

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows,

South San Francisco

Dated 4/26/05

Sherman Fong
Sherman Fong

South San Francisco

Dated _____

Mark S. Dennis

37 934

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows

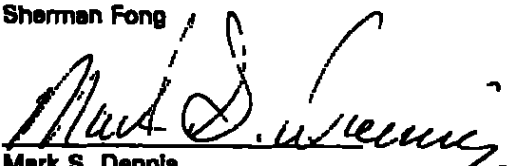
South San Francisco

Dated _____

South San Francisco

Dated 4-22-05

Sherman Fong



Mark S. Dennis

374/535

P2159R1

1/4

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.173)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	P2159R1
I	Title of Invention	HUMANIZED ANTI-BETA7 ANTAGONISTS AND USES THEREFOR
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	GENENTECH, INC
II-5	Address	1 DNA Way South San Francisco, California 94080-4990 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	1-650-225-1000
II-9	Facsimile No.	1-650-952-9881
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1 1	This person is	applicant and inventor
III 1-2	Applicant for	US only
III 1-4	Name (LAST First)	DENNIS, Mark S
III-1-5	Address	120 Plymouth San Carlos, California 94070 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1 7	State of residence	US

P2159R1

2/4

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST First)	FONG, Sherman
III-2-5	Address	19 Basinside Way Alameda, California 94502 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence	agent
	The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	
IV 1 1	Name (LAST First)	CONLEY, Deirdre L
IV 1-2	Address	MS 49 1 DNA Way South San Francisco, California 94080 United States of America
IV 1-3	Telephone No.	1-650-225-2066
IV 1-4	Facsimile No.	1-650-952-9881
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1 1	Filing date	03 September 2004 (03.09.2004)
VI-1-2	Number	60/607,377
VI-1-3	Country	US
VI-2	Priority document request	
	The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)

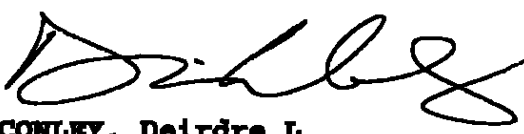
37 534

P2159R1

3/4

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VII	Declarations	Number of declarations	
VII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date to apply for and be granted a patent	-	
VII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date to claim the priority of the earlier application	-	
VII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	✓
IX-2	Description	124	-
IX-3	Claims	9	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	22	-
IX-7	TOTAL	160	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-11	Copy of general power of attorney	✓	-
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-10	Figure of the drawings which should accompany the abstract	NONE	
IX-30	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST First)	CONLEY, Deirdre L	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

23/538

P2159R1

4/4

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings.	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

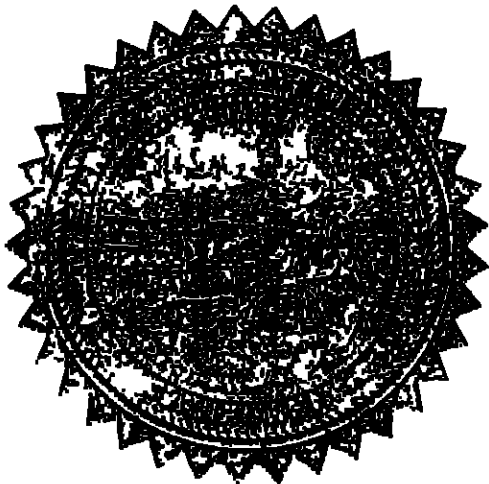
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- 1 Country *United States of America*
This public document
- 2 *has been signed by 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

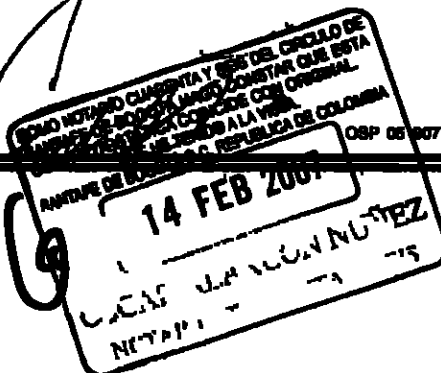
- 5 *At Sacramento, California*
- 6 *the 15th day of December 2005*
- 7 *by Deputy Secretary of State, State of California*
- 8 *No 267083*
- 9 *Seal/Stamp*

10 *Signature*



[Signature]

Secretary of State



229/540

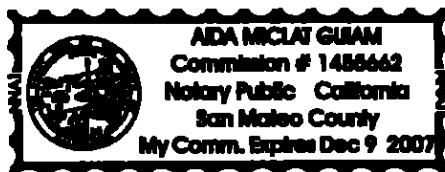
CALIF RNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of San Mateo } ss

On December 6, 2005 before me, Aida Miclat Guam
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 Miclat Guam
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 _____

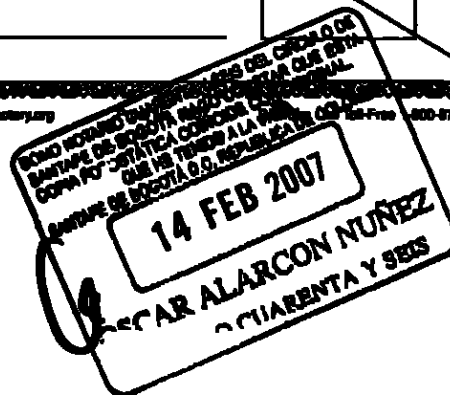
Signer(s) Other Than Named Above _____

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 _____



Brigard & Castro
BOGOTÁ COLOMBIA

547

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros)

I (We)

Genentech, Inc.

1 DNA Way

domiciliado en South San Francisco, California 94080-4990
USA

domiciliado(a) 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 enseñanzas 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 declaratorias 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

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 vegetable 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

A este efecto lo(a) 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 desistír 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.

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

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistír 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(a) en la Carrera 7 No 16-58 Piso 9 mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales

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 16-58, Piso 9 my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys

Otorgado y firmado en

South San Francisco, California

Granted and signed in USA

hoy de de 200_

this 6th day of December 2005

Firma

Signature

Nombre

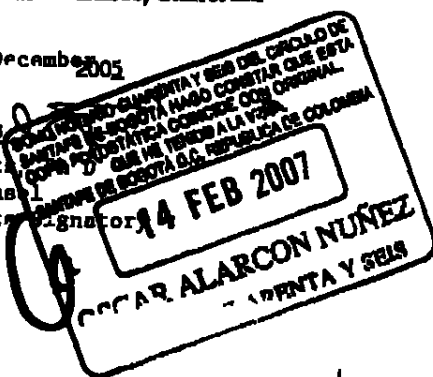
Name Timothy R Schwartz

Cargo

Title Section Patent Counsel

Authorized Corporate Signator

Genentech, Inc



371(542

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



JTC
543

**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 Pais Estados Unidos de América
Esta documento publico
- 2 ha sido firmado por AIDA MICLAT GUIAM
- 3 actuando en capacidad de Notario Publico, Estado de California
- 4 lleva el sello/timbre de AIDA MICLAT GUIAM, Notario Publico
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



24/544

RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

Estado de California)
) ss
Condado de San Mateo)

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

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

- ☐ a quien conozco personalmente
- ☒ quien demostró ante mí en base a evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre esta suscrito en el instrumento y quien reconoció ante mí 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

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

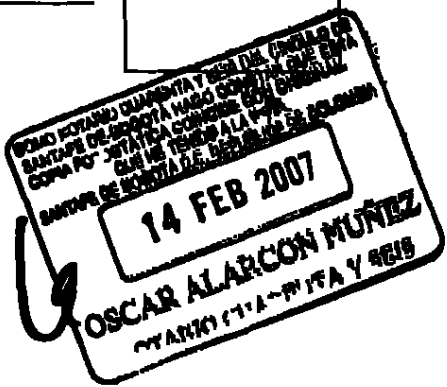
☐ Fideicomisario

☐ Guardián o conservador

☐ Otro _____

El firmante representa. _____

Huella Índice
derecho del firmante
Ponga esta del dedo aquí



246/545

AUTORIZACION

Genentech, Inc por la presente autoriza a cualquiera de Janet E Hasak, Mark T Kresnak, Jeffrey S Kubinec y Thomlty 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

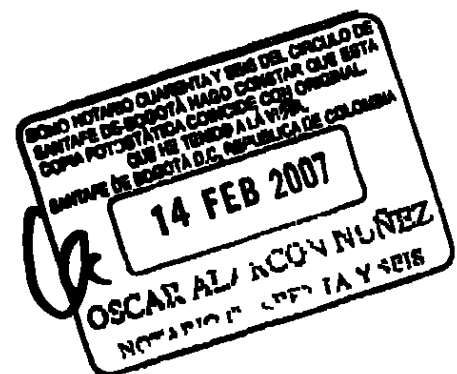
27 de Agosto de 2002

Fecha

(Firma)

Sean A Johnston

Vicepresidente, Propiedad Intelectual
Genentech, Inc



97 300
546

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

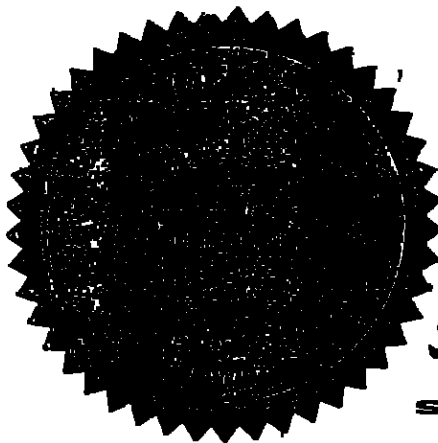
6 the twenty-fourth day of May, A D 2005

7 by Secretary of State, Delaware Department of State

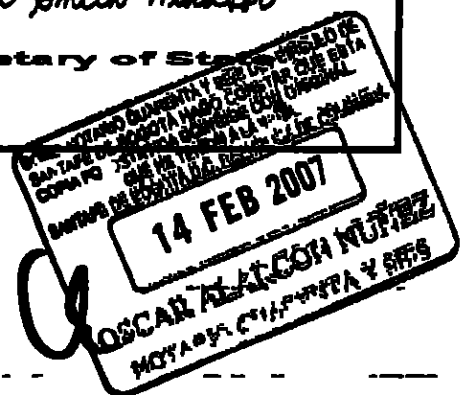
8 No 0254030

9 Seal/Stamp

10 Signature



Harriet Smith Windsor
Secretary of State



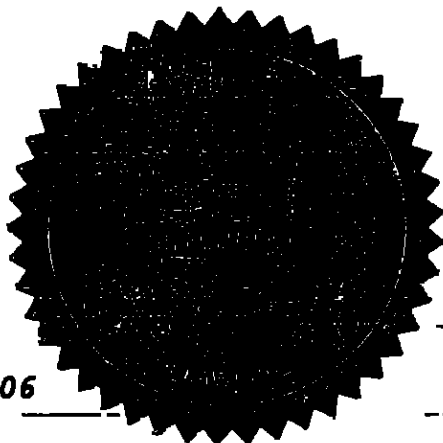
Delaware

PAGE 1

547

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
Secretary of State
AUTHENTICATION 0690088
DATE 05-24-05
14 FEB 2007
CON NUNEZ
FAM 5518

AA 548

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

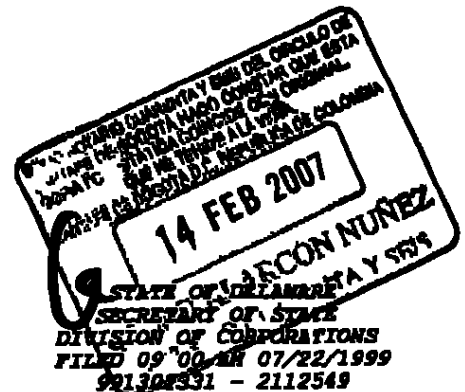
The name of the Corporation is. Genentech, Inc.

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").



347 549

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, per value \$0.02 per share ("Preferred Stock") Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, per value \$0.02 per share ("Common Stock") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

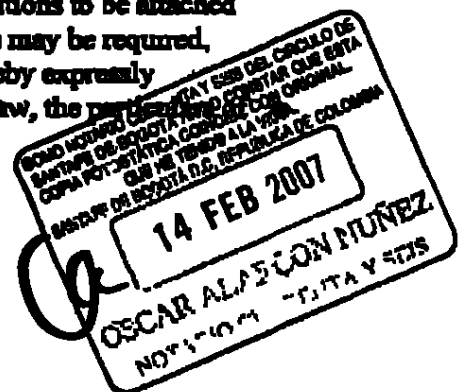
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the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



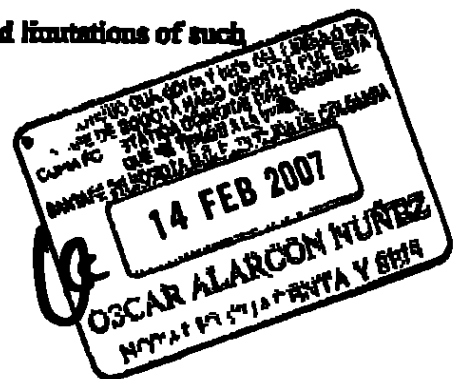
~~550~~ 550

(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;

(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;

(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.

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



551

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.

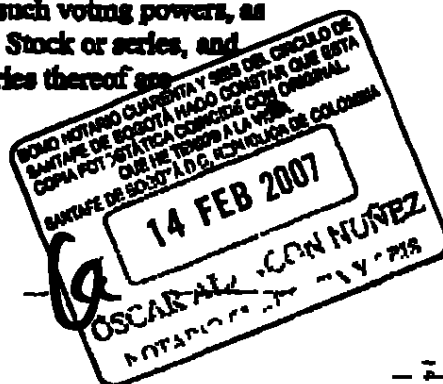
(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(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



552

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.

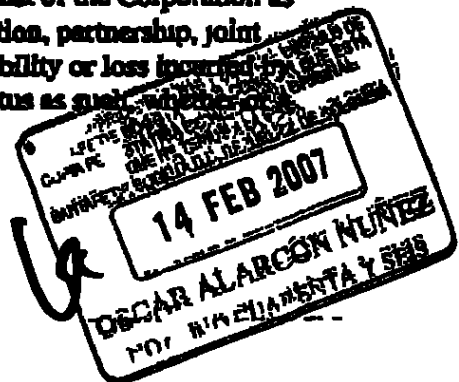
SECTION 6.02 *Ballots* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

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.



553

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.

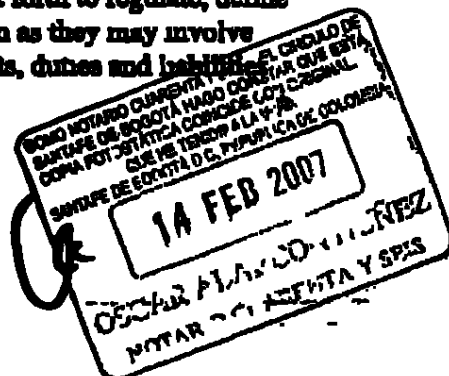
(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect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



H2 554

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.



228 555

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.

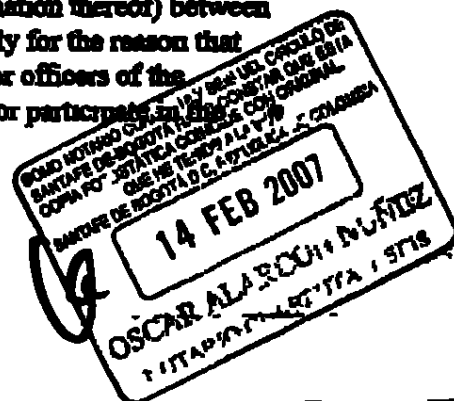
SECTION 8 05 *Definitions* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or 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



27/0 556

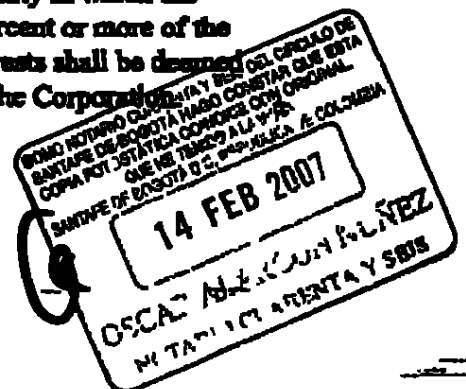
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, 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.

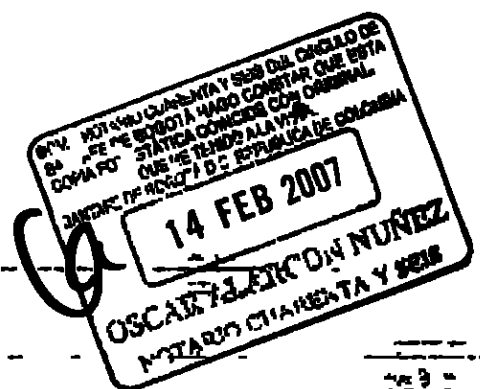
SECTION 9.05 Contracts Covered. For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more 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.



4757

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



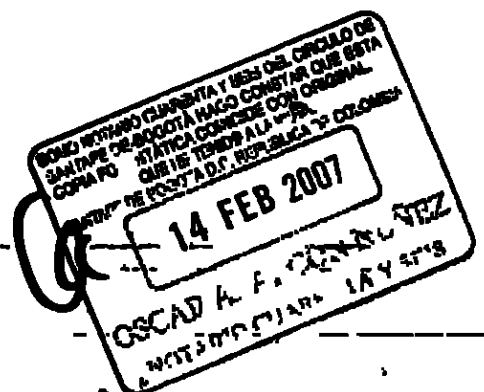
17558

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

11



APOSTILLA

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

- 1 País Estados Unidos de América**
Este documento publico
- 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



560
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 de 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, en la forma
expresamente autorizada para fijar y determinar, en la forma provista por la ley, los



561

**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 autonzada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes El numero total de acciones Corporación esta autonzada a emitir es de cuatrocientos mil de acciones Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones



76 562

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,

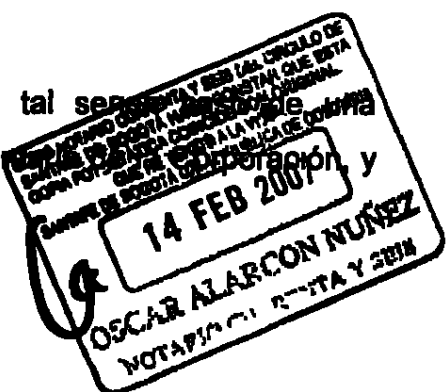
(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto,

(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 varará 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 liquidación, disolución o cierre voluntaria o involuntaria,



767 963

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

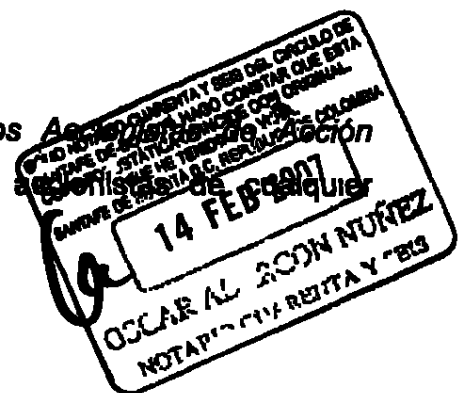
(b) Las secciones 2 02, 3 02, 3 03(a), 3 04, 3 05, 3 14 y 5 06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas

(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 *Preferencial* Durante cualquier periodo cuando los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas



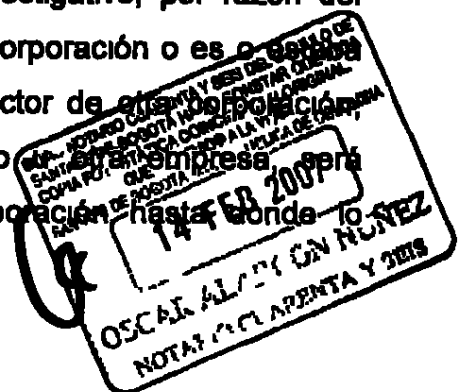
Jef

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 termino, 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 numero 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 numero 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 estuvo sirviendo por solicitud de la Corporación como un director de esta Corporación, sociedad, sociedad de negocio compartido, fideicomiso, o empresa, será indemnizado y completamente protegido por la Corporación hasta donde lo permita la Ley de Delaware.



J25 965

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 cuna cualquiera de tales procesos por adelantado de su decisión final hasta donde los autonza la Ley de Delaware El derecho a indemnización confendo 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 autonce 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 nesgo compartido, fideicomiso u otra empresa contra cualquier gasto, responsabilidad o pérdida incurmda 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 confendos en esta Sección 6 03 no serán exclusivos de ningun otro derecho el cual cualquier otra persona pueda tener o adquirnr 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 Corporación elige no ser gobernada por la Sección 203 de la Ley de Delaware



JbC

ARTICULO 8

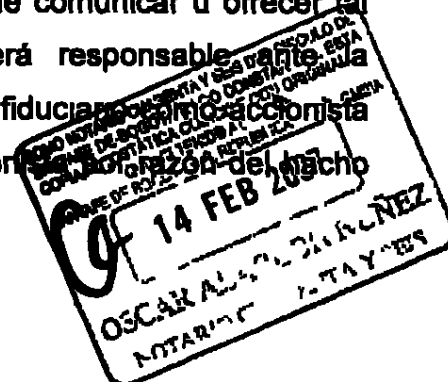
SECCION 8 01 *Relación con Roche* Anticipándose a que la Corporación cese de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc , pero que Roche (como se define en la sección 8 05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define 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 fiducianos del director, al determinar el alcance completo de tales deberes en cualquier situación particular, las condiciones de este artículos 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 a la Corporación o sus accionistas por violar ningun deber fiduciario por razón de tal transacción o la persona que controla a un accionista de Roche.



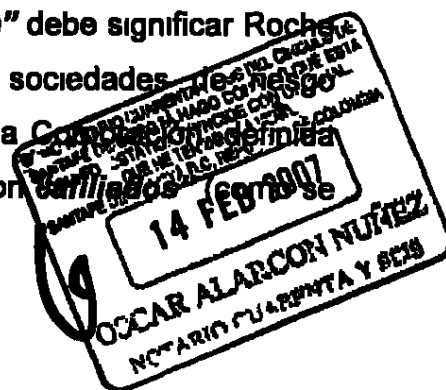
JH/S67

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 sea 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) de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8 05) que son



Hf 568

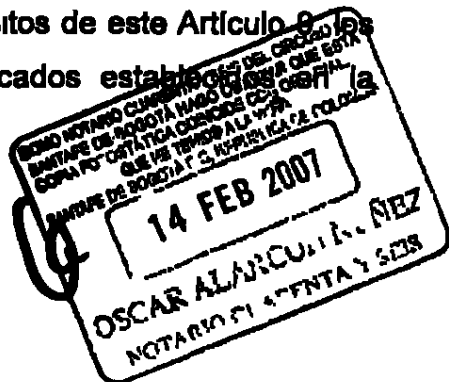
define en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó) de Roche Holdings, Inc

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 numero 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 matena, 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 Ningun 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 Cenficado 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 "*Corporacion*" y "*Roche*" tienen los significados establecidos en la Sección 8 05



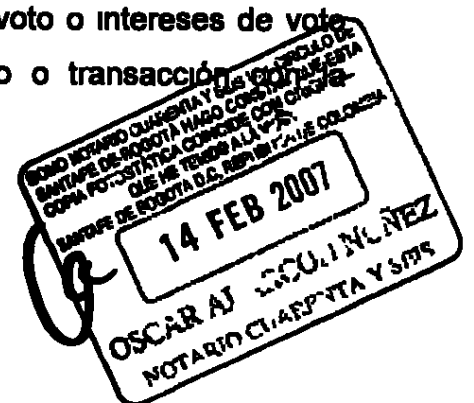
569

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 denegación 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 negocio 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 Corporación



JW

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 matena 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 unico 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



77 200
6/4
571
JH

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

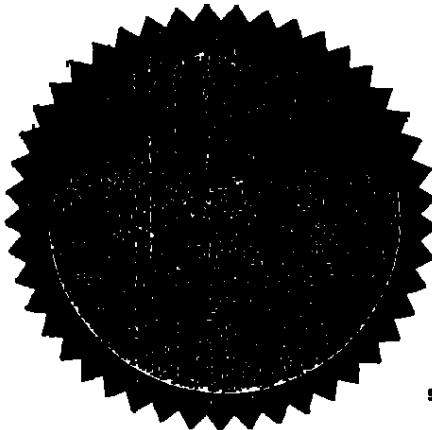
5 at Dover, Delaware

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

7 by Secretary of State, Delaware Department of State

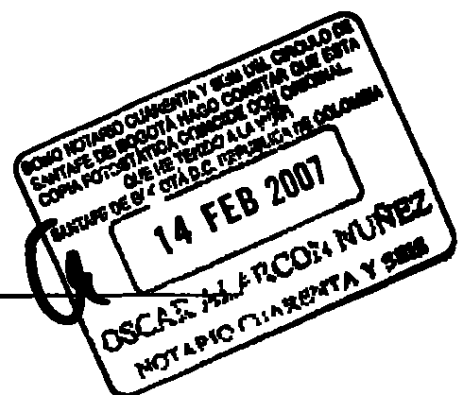
8 No 0254032

9 Seal/Stamp



10 Signature

Harriet Smith Windsor
Secretary of State



572

The First State



050426506

Harriet Smith Windsor Secretary of State
AUTHENTICATION 3900386

DATE

14 FEB 2007

14 FEB 2007
OSCAR ALARCON MUÑEZ
NOTARIO CIENTA Y SEIS

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

26747



APOSTILLA

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

- 1 País Estados Unidos de América**
Este documento publico
- 2 ha sido firmado por Harriet Smith Windsor**
- 3 actuando en capacidad de Secretana 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)

Secretana de Estado



575

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
AUTENTICACION 3900386

FECHA 05 - 24 - 05

JP 576

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

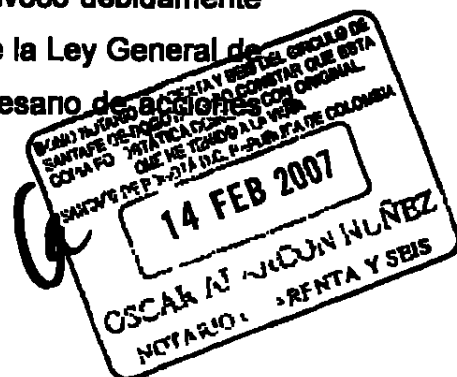
CERTIFICA POR LA PRESENTE

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 autonzada 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 Comun") 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 ordinana 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 necesano de accionistas 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



Handwritten marks and signature

Apostille

(Convention de La Hays 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

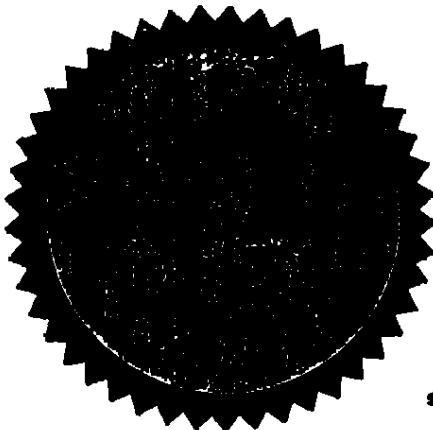
6 the twenty-fourth day of May, A D 2005

7 by Secretary of State, Delaware Department of State

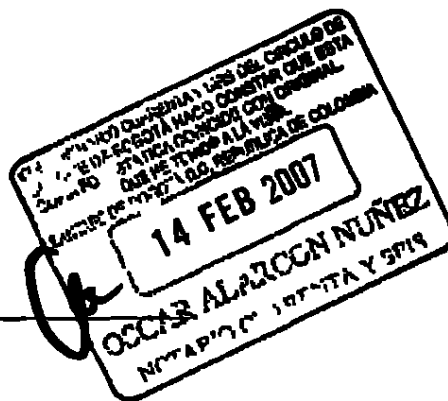
8 No 0254031

9 Seal/Stamp

10 Signature



Harriet Smith Windsor
Secretary of State



PAGE

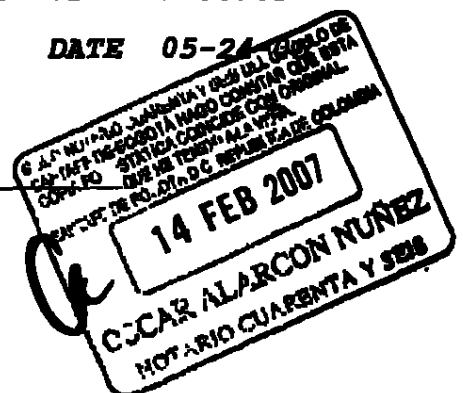
PAGE 1 *579*



050426506

Harriet Smith Windsor Secretary of State
AUTHENTICATION 3900385

DATE 05-24



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.

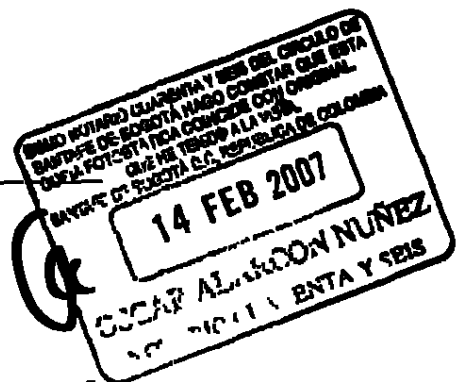
FOURTH That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

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

73841



APOSTILLA

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

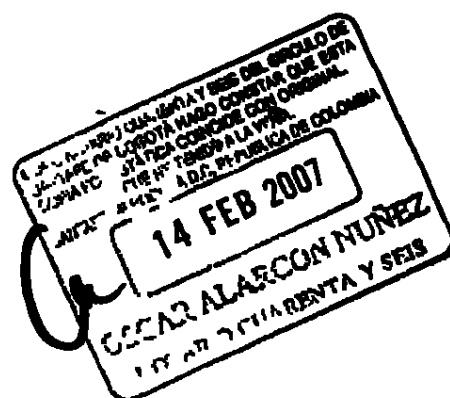
- 1 País Estados Unidos de América**
Este documento publico
- 2 ha sido firmado por Harriet Smith Windsor**
- 3 actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware**
- 4 lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado**

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



52

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

56

١٠

١٢

ESTADO LIBRE Y SOBERANO DE COLOMBIA
DEPARTAMENTO DE COCA Y CAFE
MUNICIPIO DE COCA
QUE HE TENIDO A LA PRESENCIA
DE LA COMISION DE COCA Y CAFE
DEPARTAMENTO DE COCA Y CAFE
MUNICIPIO DE COCA

14 FEB 2007

CARLOS NUNEZ

AUTENTICACION 3900384

Harriet Smith Windsor (Enma)
Windsor (Secretaria de Estado)

FECHA **05 - 24 - 05**

584

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 numero 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 accionistas requiendo por los estatutos votaron a favor de la enmienda



581

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

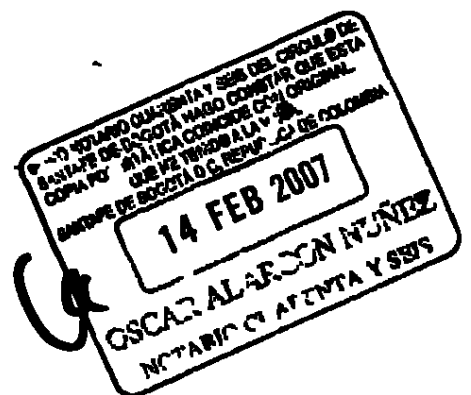
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000

GENENTECH, INC

Por (Firma)

Nombre Stephen G Juelsgaard

Título Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador 3 82 08 40
Fax 350 52 20
E-mail info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D C , Colombia

582

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
GENENTECH, INC

REFERENCIA	Radicación No	7 21258
	Solicitud internacional	PCT/US2005/031401
	Fecha inicio fase nacional	03/04/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No	4663

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que

1 La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante (Art 26-k) Decisión 486

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No 10 de 2001.

ALIX CARMEN CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 20 ABR 2007
adpall