

19



Octrooiencentrum
Nederland

11 1032132

12 C OCTROOI²⁰

21 Aanvraag om octrooi: 1032132

51 Int.Cl.:
C07K16/28 (2006.01) A61K39/395 (2006.01)
A61P37/00 (2006.01)

22 Ingediend: 07.07.2006

30 Voorrang:
08.07.2005 US 60/69745373 Octrooihouder(s):
Pfizer Limited te Sandwich, Groot-Brittannië
(GB).41 Ingeschreven:
09.01.2007 I.E. 2007/0372 Uitvinder(s):
Nicholas Pullen te Sandwich (GB).47 Dagtekening:
09.10.200774 Gemachtigde:
Ir. A. van Westenbrugge c.s. te 2502 LS
Den Haag.45 Uitgegeven:
03.12.2007 I.E. 2007/12

54 Nieuwe MAdCAM-antilichamen.

57 De uitvinding verschaft nieuwe, verbeterde anti-MAdCAM-antilichamen. Toepassingen van deze antilichamen in de geneeskunde zijn ook omvat, in het bijzonder voor de behandeling van inflammatoire condities. Deze inflammatoire condities betreffen in een aspect van de uitvinding inflammatory bowel diseases zoals de ziekte van Crohn en ulceratieve colitis. Voorts verschaft de uitvinding een farmaceutische samenstelling en een werkwijze voor het behandelen van inflammatoire ziekte in een patiënt.

NL C 1032132

De inhoud van dit octrooi komt overeen met de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Octrooiencentrum Nederland is het Bureau voor de Industriële Eigendom, een agentschap van het ministerie van Economische Zaken

Titel: Nieuwe MAdCAM-antilichamen

De uitvinding heeft betrekking op een verbeterd humaan antilichaam specifiek voor Mucosaal addressin celadhesiemolecuul (MAdCAM).

Mucosaal addressin celadhesiemolecuul (MAdCAM) is een lid van de immunoglobulinesuperfamilie van celadhesiereceptoren. Het is één van de adhesiemoleculen betrokken in de werving van lymfocyten naar weefsels indien nodig, door middel van interactie met een integrinemolecuul op de oppervlakte van de lymfocyten.

Het is aangetoond dat antilichamen die binding van MAdCAM aan zijn integrinebindingspartner, $\alpha_4\beta_7$, inhiberen, bijvoorbeeld anti-MAdCAM-antilichamen (b.v. MECA-367; US 5,403,919, US 5,538,724) of anti- $\alpha_4\beta_7$ - antilichamen (b.v. Act-1; US 6,551,593 of gehumaniseerd Act-1, ook MLN02 genoemd, beschreven in WO 01/78779), leukocytextravasatie in ontstoken ingewanden kunnen inhiberen, en kunnen daarom voordelig zijn in de behandeling van inflammatoire bowel disease.

Anti-MAdCAM-antilichamen zoals MECA-367, echter, zijn niet therapeutisch bruikbaar in humane patiënten; MECA-367 bindt muis MAdCAM, en toont niet veel affiniteit voor het humane MAdCAM-molecuul. Daarbij, een ratantilichaam zijnde, zal het leiden tot een immuunrespons in humane patiënten en daarom niet geschikt zijn voor therapeutisch gebruik. Muis monoklonale antilichamen, gericht tegen humaan MAdCAM zijn beschreven (WO 96/24673), maar deze zijn waarschijnlijk ook immunogeen in mensen. Recentelijk, zijn therapeutisch bruikbare, geheel humane anti-humane MAdCAM-antilichamen met uitstekende specificiteit en affiniteit voor humaan en primair MAdCAM ontwikkeld en beschreven in WO2005/067620.

Het is bekend dat zelfs geheel humane antilichamen nog steeds tot een immuunrepons in sommige patiënten kunnen leiden, welke waarschijnlijk veroorzaakt wordt door sequenties in de variabele regio van het antilichaam. De antilichamen van de onderhavige uitvinding zijn modificaties van de humane anti-MAdCAM-lichamen beschreven in WO2005/067620, welke waarschijnlijk zelfs minder geneigd zullen zijn tot enige immunogeniciteitsproblemen in humane patiënten.

10

Aspecten van de uitvinding

Eén aspect van de uitvinding is een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, omvattende de variabele regio van de zware keten van 6.22.2-mod_V (SEQ ID NO:2).

15

Een ander aspect van de uitvinding is een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, omvattende de variabele regio van de lichte keten van 6.34.2-mod_SSQ, 6.34.2-mod_QT of 6.34.2-mod_SSQ,QT (SEQ ID NOs: 8, 10,12).

20

Een ander aspect van de uitvinding is een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, omvattende de variabele regio van de lichte keten van 6.67.1-mod_Y, 6.67.1-mod_TAP, of 6.67.1-mod_Y, TAP (SEQ ID NOs: 16, 18, 20).

25

Een ander aspect van de uitvinding is een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, omvattende de variabele regio van de zware keten van 6.77.1-mod_ΔS (SEQ ID NO: 22).

30

Een ander aspect van de uitvinding is een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, omvattende de variabele regio van de lichte keten van 7.16.6_V, 7.16.6_S of 7.16.6_VS (SEQ ID NOs: 30, 32, 34).

- 5 Een ander aspect van de uitvinding is een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, omvattende de variabele regio van de zware keten van 7.16.6_L (SEQ ID NO: 28).

10 Een ander aspect van de uitvinding is een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, omvattende de variabele regio de lichte keten van 7.16.6_V, 7.16.6_S of 7.16.6_VS (SEQ ID NOs: 30, 32, 34) en de variabele regio van de zware keten van 7.16.6_L (SEQ ID NO: 28).

15 Een ander aspect van de uitvinding is een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, omvattende de variabele regio van de zware keten van 9.8.2_ARGAYH,D (SEQ ID NO: 36).

20 Een ander aspect van de uitvinding is een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, omvattende de variabele regio van de lichte keten van 9.8.2-mod (SEQ ID NO: 38).

Een ander aspect van de uitvinding is een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, waarin het antilichaam wordt geselecteerd uit de groep bestaande uit:

- 25 (a) een antilichaam omvattende de variabele regio's gecodeerd door de nucleïnezuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 3;
- (b) een antilichaam omvattende de variabele regio's gecodeerd door de nucleïnezuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 5 en SEQ ID NOs: 7, 9 of 11;
- (c) een antilichaam omvattende de variabele regio's gecodeerd door de nucleïnezuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 13 en SEQ ID NOs: 15, 17 of
- 30 19;

- (d) een antilichaam omvattende de variabele regio's gecodeerd door de nucleïnezuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 21 en SEQ ID NO: 23;
- (e) een antilichaam omvattende de variabele regio's gecodeerd door de nucleïnezuursequenties uiteengezet in SEQ ID NOs: 25 of 27 en SEQ ID NOs: 29, 31 of 33; of
- (f) een antilichaam omvattende de variabele regio's gecodeerd door de nucleïnezuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 35 en SEQ ID NO: 37.

Een ander aspect van de uitvinding is een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, waarin het antilichaam geselecteerd wordt uit de groep bestaande uit:

- (a) een antilichaam omvattende de variabele regio's van de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 2 en SEQ ID NO: 4, zonder de signaalsequenties;
- (b) een antilichaam omvattende de variabele regio's van de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 6 en SEQ ID NOs: 8, 10 of 12, zonder de signaalsequenties;
- (c) een antilichaam omvattende de variabele regio's van de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 14 en SEQ ID NOs: 16, 18 of 20, zonder de signaalsequenties;
- (d) een antilichaam omvattende de variabele regio's van de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 22 en SEQ ID NO: 24, zonder de signaalsequenties;
- (e) een antilichaam omvattende de variabele regio's van de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NOs: 26 of 28 en SEQ ID NOs: 30, 32 of 34, zonder de signaalsequenties; of
- (f) een antilichaam omvattende de variabele regio's van de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 36 en SEQ ID NO: 38, zonder de signaalsequenties.

30

Een ander aspect van de uitvinding is een monoklonaal antilichaam of antigeenbindend gedeelte daarvan, waarin genoemd antilichaam omvat:

- (a) een zware keten van aminozuursequentie SEQ ID NO: 2 en de lichte keten aminozuursequentie SEQ ID NO: 4, zonder de signaalsequenties.
- (b) een zware keten van aminozuursequentie van SEQ ID NO: 6 en de lichte keten aminozuursequentie SEQ ID NOs: 8, 10 of 12, zonder de signaalsequenties.
- (c) een zware keten van aminozuursequentie van SEQ ID NO: 14 en de lichte keten aminozuursequentie SEQ ID NOs: 16, 18 of 20, zonder de signaalsequenties.
- (d) een zware keten van aminozuursequentie SEQ ID NO: 22 en de lichte keten aminozuursequentie SEQ ID NO: 24, zonder de signaalsequenties;
- (e) een zware keten van aminozuursequentie SEQ ID NOs: 26 of 28 14 en de lichte keten aminozuursequentie SEQ ID NOs: 30, 32 of 34, zonder de signaalsequenties.
- (f) een zware keten van aminozuursequentie van SEQ ID NO: 36 en de lichte keten aminozuursequentie SEQ ID NO: 38, zonder de signaalsequenties.

Een ander aspect van de uitvinding is een humaan monoklonaal antilichaam van de uitvinding, waarin het zware keten C-terminale lysine is gekliefd.

20

Een ander aspect van de uitvinding is een humaan monoklonaal antilichaam van de uitvinding, welke een IgG₂-isotype is. Een verder aspect van de uitvinding is een humaan monoklonaal antilichaam van de uitvinding, welke een IgG₄-type is. Een verder aspect van de uitvinding is een humaan monoklonaal antilichaam van de uitvinding welke een κ lichte keten omvat. Een verder aspect van de uitvinding is een humaan monoklonaal antilichaam van de uitvinding welke een λ lichte keten omvat. Een geprefereerd aspect van de uitvinding is een humaan monoklonaal antilichaam van de uitvinding welke een IgG₂-isotype is met κ lichte keten.

30

Een ander aspect van de uitvinding is een vector omvattende één van de sequenties van de variabele regio's van SEQ ID NOs: 1, 7, 9, 11, 15, 17, 19,

21, 27, 29, 31, 33, 35 of 37 of één van de sequenties coderende voor de variabele regio's van SEQ ID NOs: 2, 8, 10, 12, 16, 18, 20, 22, 28, 30, 32, 34, 36 of 38. Een verder aspect van de uitvinding is een gastheercel omvattende één van de sequenties van de variabele regio's van SEQ ID NOs: 1, 7, 9, 11, 15, 17, 19, 21,
 5 27, 29, 31, 33, 35 of 37, of één van de sequenties coderende voor de variabele regio's van SEQ ID NOs: 2, 8, 10, 12, 16, 18, 20, 22, 28, 30, 32, 34, 36 of 38. De gastheercel kan een bacterie zijn zoals E. Coli, een gist zoals Saccharomyces cerevisiae of Pichia pastoris, een plantencel, een insectencel of een zoogdiercel. Meer geprefereerd, is de gastheercel een zoogdiercel. Meest geprefereerd is de
 10 gastheercel een CHO-cel of NS0-cel.

Een ander aspect van de uitvinding is een werkwijze voor het produceren van het antilichaam van de uitvinding, omvattende kweken van een gastheercel omvattende een van de sequenties van de variabele regio's van SEQ
 15 ID NOs: 1, 7, 9, 11, 15, 17, 19, 21, 27, 29, 31, 33, 35 of 37 of een van de sequenties coderende voor de variabele regio's van SEQ ID NOs: 2, 8, 10, 12, 16, 18, 20, 22, 28, 30, 32, 34, 36 of 38, onder condities waarin het antilichaam tot expressie wordt gebracht en het terugwinnen van het antilichaam uit de gastheercel of zijn kweek supernatant.

20

Een ander aspect van de uitvinding is een transgeen dier of een transgene plant, omvattende één van de sequenties van de variabele regio's van SEQ ID NOs: 1, 7, 9, 11, 15, 17, 19, 21, 27, 29, 31, 33, 35 of 37, of een van de sequenties coderende voor de variabele regio's van SEQ ID NOs: 2, 8, 10, 12,
 25 16, 18, 20, 22, 28, 30, 32, 34, 36 of 38.

Eén aspect van de uitvinding is de toepassing van de antilichamen van de uitvinding of een antigeenbindend gedeelte daarvan voor toepassing als een medicament. Een ander aspect van de uitvinding is de toepassing van de anti-

lichamen van de uitvinding of een antigeenbindend gedeelte daarvan voor de vervaardiging van een medicament voor de behandeling van condities die MAdCAM-gemedieerde adhesie van leukocyten met zich meebrengen. Een ander aspect van de uitvinding is de toepassing van de antilichamen van de uitvinding of een antigeenbindend gedeelte daarvan voor de behandeling van inflammatoire condities, zoals maar niet beperkt tot inflammatoire ziekten van het gastro-intestinale kanaal omvattende inflammatory bowel disease zoals de ziekte van Crohn, ulceratieve colitis; divertikelziekte, gastritis, leverziekte, primaire sclerose, scleroserende cholangitis. Inflammatoire ziekten omvatten ook maar zijn niet beperkt tot abdominale ziekte (inclusief peritonitis, appendicitis, biliare gangziekte), acute transverse myelitis, allergische dermatitis (inclusief allergische huid, allergisch eczeem, huidatopie, atopisch eczeem, atopisch dermatitis, cutane ontsteking, inflammatoir eczeem, inflammatoire dermatitis, vlooienhuid, miliaire dermatitis, miliair eczeem, huisstofmijthuid), ankyloserende spondylitis (Reiters-syndroom), astma, luchtwegontsteking, atherosclerose, arteriosclerose, biliare atresie, blaasontsteking, borstkanker, cardiovasculaire ontsteking (inclusief vasculitis, rheumatoïde nagelvouwinfarcten, beenulcera, polymyositis, chronische vasculaire ontsteking, pericarditis, chronische obstructieve pulmonaire ziekte), pancreatitis, inclusief chronische pancreatitis, perineurale ontsteking, coeliaci, colitis (inclusief amoebe colitis, infectieve colitis, bacteriële colitis, Crohn's colitis, ischemie colitis, ulceratieve colitis, idiopathische proctocolitis, inflammatory bowel disease, pseudo-membraneuze colitis), chloroma, collageen vasculaire ziekten (rheumatoïde artritis, SLE, progressieve systemische sclerose, gemengde bindweefselziekte, diabetes mellitus), ziekte van Crohn (regionale enteritis, granulomateuze ileïtis, ileocolitis, spijsverteringssysteemontsteking), demyeliserende ziekte (inclusief myelitis, multipele sclerose, disseminerende sclerose, acute disseminerende encefalomyelitis, perivenezue demyelisatie, vitamine B12-deficiëntie, Guillain-Barre-syndroom, MS-geassocieerd retrovirus), dermatomyositis, diverticulitis,

emfyseen, exudatieve diarree, immunogecompromiteerde patiënten, gastritis, granulomateuze hepatitis, granulomateuze ontsteking, cholecystitis, insulineafhankelijke diabetes mellitus, leverontstekingsziekten (leverfibrose inclusief maar niet beperkt tot Hepatitis C-geïnduceerde leverschade, alcoholische leverziekte, non-alcoholisch steatohepatitis (NASH); primaire biliare cirrhose, hepatitis, scleroserende cholangitis), longontsteking (idiopathische pulmonaire fibrose, eosinofiele granulomen van de long, pulmonaire histiocytosis X, peribronchiolaire ontsteking, acute bronchitis), lymfogranuloomvenereum, maligne melanoom, mond/tandziekte (inclusief gingivitis, periodontale ziekte), metastatische kankers, mucositis, spierskeletsystemische ontsteking (myositis), non-alcoholische steatohepatitis (nonalcoholische vette leverziekte), oculaire & orbitale ontsteking (inclusief uveïtis, optische neuritis, perifere rheumatoïde ulceratie, perifere corneale ontsteking), osteoarthritis, osteomyelitis, faryngeale ontsteking, polyarthritis, proctitis, psoriasis, stralingsverwonding, sarcoïdosis, sikkelcelnecropatie, oppervlakkige thromboflebitis, systemische inflammatoire responssyndroom, thyroïditis, systemische lupus erythematosus, tropische spruw, graft-versus-host-ziekte, acute verbrandingsverwonding, Behçet-syndroom, Sjörgeren-syndroom, baarmoederafwijkingen zoals endometriose, dysmenorrhea of bekkenontstekingsziekte. Bij voorkeur, worden de antilichamen van de uitvinding gebruikt voor de behandeling van inflammatoire bowel disease zoals de ziekte van Crohn en ulceratieve colitis, graft-versus-host-ziekte, leverfibrose, uveïtis. Zelfs meer bij voorkeur, worden de antilichamen van de uitvinding gebruikt voor de behandeling van inflammatoire bowel disease.

25

Een ander aspect van de uitvinding is een werkwijze voor behandeling van een conditie zoals boven vermeld, omvattende toediening aan een patiënt die zo'n behandeling nodig heeft een therapeutisch effectieve hoeveelheid van een antilichaam van de uitvinding.

Een ander aspect van de uitvinding is een farmaceutische samenstelling omvattende een antilichaam van de uitvinding of een antigeenbindend gedeelte daarvan en een farmaceutisch acceptabele drager of excipiënt.

5

Gedetailleerde beschrijving van de uitvinding

Een nucleïnezuurmolecuul coderende de gehele zware keten van een anti-MAdCAM-antilichaam van de uitvinding kan worden geconstrueerd door het fuseren van een nucleïnezuurmolecuul coderende voor het gehele variabele domein van een zware keten of een antigeenbindend domein daarvan met een constant domein van een zware keten. Vergelijkbaar, kan een nucleïnezuurmolecuul coderende voor de lichte keten van een anti-MAdCAM-antilichaam worden geconstrueerd door het fuseren van een nucleïnezuurmolecuul coderende voor het variabele domein van een lichte keten of een antigeenbindend domein daarvan met een constant domein van een lichte keten. Nucleïnezuurmoleculen coderende voor de VH- en VL-regio's kunnen worden geconverteerd tot gehele-lengte antilichaamgenen door ze te voegen in expressievectoren die al voor zware keten constante en lichte keten constante regio's coderen, respectievelijk, zodat het VH-segment operatief wordt verbonden aan de zware keten constante regio (CH)-segment(en) binnen de vector en het VL-segment operatief wordt verbonden aan het lichte keten constante regio (CL)-segment binnen de vector. Alternatief, worden de nucleïnezure moleculen die coderen voor de VH- of VL-ketens geconverteerd in gehele-lengte antilichaamgenen door verbinding, bijvoorbeeld, ligering, van het nucleïnezuurmolecuul coderende voor een VH-keten aan een nucleïnezuurmolecuul coderende voor een CH-keten gebruikmakende van standaard moleculaire biologische technieken. Hetzelfde kan worden bereikt door gebruik te maken van nucleïnezuurmoleculen die coderen voor VL- en CL-ketens. De sequenties van humane zware en lichte keten

constante regiogenen zijn bekend in de kunst. Zie, bijvoorbeeld, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^{de} Ed., NIH publ. no. 91-3242 (1991). Nucleïnezuurmoleculen coderende voor de gehele-lengte zware en/of lichte ketens kunnen dan tot expressie worden gebracht uit een cel waar-
5 in ze zijn geïntroduceerd en het anti-MAdCAM-antilichaam worden geïsoleerd.

Een nucleïnezuurmolecuul coderende voor ofwel de zware keten van een anti-MAdCAM-antilichaam van de uitvinding of een antigeenbindend gedeelte daarvan, of de lichte keten van een anti-MAdCAM-antilichaam van de
10 uitvinding of een antigeenbindend gedeelte daarvan kunnen worden bereid, bijvoorbeeld, door het synthetiseren van geschikte nucleïnezuren gebruikmakende van de sequentie-informatie hierin verschaft, en ze te splicen tezamen met de gewenste constante regio's van immunoglobulinegenen. De vakman zal zich welbewust zijn van de geschikte werkwijzen.

15

De nucleïnezuurmoleculen kunnen worden toegepast om recombinant grote hoeveelheden van anti-MAdCAM-antilichamen tot expressie te brengen, zoals beneden beschreven. De nucleïnezuurmoleculen kunnen ook worden toe-
20 gepast om chimere antilichamen, enkel-ketenantilichamen, immunoadhesinen, dialichamen, gemuteerde antilichamen en antilichaamderivaten te produceren, zoals verder beneden beschreven. Als de nucleïnezuurmoleculen zijn verkregen van een niet-humaan, nontransgeen dier, kunnen de nucleïnezuurmoleculen worden toegepast voor antilichaamhumanisatie, zoals ook beneden beschreven.

25

De uitvinding verschaft vectoren omvattende de nucleïnezuurmoleculen van de uitvinding die coderen voor de zware keten van het antigeenbindende gedeelte daarvan. De uitvinding verschaft ook vectoren omvattende de nucleïnezuurmoleculen van de uitvinding die voor de lichte keten of antigeen-

bindend gedeelte daarvan coderen. De uitvinding verschaft ook vectoren omvattende nucleïnezuurmoleculen coderende voor fusieproteïnen, gemodificeerde antilichamen, antilichaamfragmenten en probes daarvan.

5 Om de antilichamen, of antilichaamgedeelten toegepast in de uitvinding, tot uitdrukking te brengen, worden DNA's coderende voor gedeeltelijk of gehele-lengte lichte en zware ketens, verkregen zoals boven beschreven, gevoegd in expressievectoren zodat de genen operatief worden verbonden aan transcriptionele en translationele controlesequenties. Expressievectoren omvatten plasmiden, retrovirussen, adenovirussen, adeno-geassocieerde virussen (AAV), plantvirussen zoals bloemkoolmozaïekvirus, tabakmozaïekvirus, cosmiden, YAC's, EBV-gederiveerde episomen, en dergelijke. Het antilichaamgen wordt geligeerd in een vector zodat transcriptionele en translationele controlesequenties binnen de vector hun bedoelde functie dienen van regulering van de transcriptie en translatie van het antilichaamgen. De expressievector en expressie controlesequenties worden gekozen om verenigbaar te zijn met de toegepaste expressie gastheercel. Het antilichaam lichte keten gen en het antilichaam zware keten gen kunnen worden gevoegd in een afzonderlijke vector. In een geprefereerde uitvoeringsvorm, worden beide genen gevoegd in dezelfde expressievector. De antilichaamgenen worden gevoegd in de expressievector door standaard werkwijzen (b.v., ligatie van complementaire restrictiegebieden op het antilichaam genfragment en vector, of stomp einde ligatie als geen restrictieplaatsen aanwezig zijn).

25 Een geschikte vector is een die codeert voor een functioneel volledige humane CH- of CL-immunoglobulinesequentie, met passende restrictiegebieden zo geconstrueerd dat een VH- of VL-sequentie gemakkelijk kan worden ingevoegd en tot expressie worden gebracht, zoals boven beschreven. In zulke vectoren, treedt splicing meestal op tussen het splice-donorgebied in de inge-

voegde J-regio en het splice acceptorgebied voorafgaande aan de humane C-regio, en ook bij de splice-regio's die voorkomen binnen de humane CH-exonen. Polyadenylatie- en transcriptieterminatie treden op bij natieve chromosomale gebieden stroomafwaarts van de coderende regio's. De recombinante expres-
 5 sievector kan ook coderen voor een signaalpeptide die uitscheiding van de antilichaamketen uit een gastheercel faciliteert.

Het antilichaam keten gen kan worden gekloneerd in de vector zodat het signaalpeptide in-frame wordt verbonden aan het aminouiteinde van het
 10 antilichaam keten gen. Het signaalpeptide kan een immunoglobuline signaalpeptide of een heteroloog signaalpeptide zijn (d.w.z., een signaalpeptide van een niet-immunoglobuline-eiwit).

In aanvulling op de antilichaam keten genen, dragen de recombinante
 15 expressievectoren van de uitvinding regulatoire sequenties die de expressie van de antilichaam keten genen in een gastheercel controleren. Het zal worden begrepen door diegenen geoefend in de kunst, dat het ontwerp van de expres-
 sievector, inclusief de selectie van regulatoire sequenties af zal kunnen hangen van zulke factoren zoals de keuze van de gastheercel om te transformeren, het
 20 niveau van expressie van het gewenste eiwit, etc. Geprefereerde regulatoire sequenties voor een zoogdier gastheercel expressie omvatten virale elementen die hoge niveaus van eiwitexpressie in zoogdiercellen geven, zoals promotors en/of enhancers verkregen van retrovirale LTR's, cytomegalovirus (CMV) (zoals de CMV-promotr/enhancer), Simian-virus 40 (SV40) (zoals de SV40-
 25 promotor/enhancer), adenovirus (b.v. de adenovirus major late promotor (Ad-MLP)), polyoma en sterke zoogdierpromotors zoals natieve immunoglobuline- en actinepromotors. Voor verdere beschrijving van virale regulatoire elementen, en sequenties daarvan, zie b.v. U.S. octrooi nrs. 5,168,062, 4,510,245 en 4,968,615, elk waarvan hierbij door referentie wordt opgenomen. Werkwijzen

voor expressie van antilichamen in planten, omvattende een beschrijving van promotors en vectors, zowel als transformatie van planten zijn bekend in de kunst. Zie, b.v. Verenigde Staten octrooi 6,517,529. Werkwijzen van expressie van polypeptiden in bacteriële cellen of fungale cellen, b.v. gistcellen, zijn ook
5 goed bekend in de kunst.

In toevoeging op de antilichaam keten genen en regulatoire sequenties, kunnen de recombinante expressievectoren toegepast in de uitvinding additionele sequenties dragen, zoals sequenties die replicatie van de vector in gastheercellen reguleren (b.v. oorsprongen van replicatie) en selecteerbaar marker-
10 kergenen. Het selecteerbare markergen faciliteert selectie van gastheercellen waarin de vector is geïntroduceerd (zie, b.v., V.S. octrooi nrs. 4,399,216, 4,634,665 en 5,179,017). Bijvoorbeeld, verleent het selecteerbare markergen typisch resistentie tegen medicijnen, zoals G418, hygromycine of methotrexaat, aan een gastheercel waarin de vector geïntroduceerd is. Geprefereerde
15 selecteerbare markergenen omvatten het dihydrofolaatreductase-(DHFR)-gen (voor toepassing in *dhfr*⁻-gastheercellen met methotrexaat-selectie/amplificatie) en het neogen (voor G418-selectie), en het glutamaatsynthetasegen.

20 Nucleïnezuurmoleculen coderende voor de zware keten of een antigeenbindend gedeelte daarvan en/of de lichte keten of een antigeenbindend gedeelte daarvan of een anti-MAdCAM-antilichaam, en vectoren die deze nucleïnezuurmoleculen omvatten, kunnen worden toegepast voor transformatie van geschikte zoogdier-, plant-, bacterie- of gistgastheercel. Transformatie kan
25 door elke bekende werkwijze voor introduceren van polynucleotiden in een gastheercel. Werkwijzen voor introductie van heterologe polynucleotiden in zoogdiercellen zijn goed bekend in de kunst en omvattende dextran-gemedieerde transfectie, calciumfosfaatprecipitatie, polybreen-gemedieerde transfectie, protoplastfusie, elektroporatie, inkapseling van de polynucleoti-

de(n) in liposomen, biolistische injectie en direct microinjectie van het DNA in nucleï. Daarbij, kunnen nucleïnezuurmoleculen worden geïntroduceerd in zoogdiercellen door virale vectoren. Werkwijzen om cellen te transformeren zijn goed bekend in de kunst. Zie, b.v., V.S. octrooi nrs. 4,399,216, 4,912,040, 5 4,740,461 en 4,9595,455 (welke octrooien hierbij hierin zijn opgenomen door verwijzing). Werkwijzen voor transformatie van plantencellen zijn goed bekend in de kunst, omvattende, b.v., Agrobacterium-gemedieerde transformatie, biolistische transformatie, directe injectie, elektroporatie en virale transformatie. Werkwijzen voor transformeren van bacteriële en gistcellen zijn ook goed be- 10 kend in de kunst.

Zoogdiercellijnen beschikbaar als gastheren voor expressie zijn goed bekend in de kunst en omvatten vele geïmmortaliseerde cellijnen beschikbaar uit de American Type Culture Collection (ATCC). Deze omvatten, onder ande- 15 re, Chinese hamsterovarium(CHO)-cellen, NS0-, SP2-cellen, HEK-293T-cellen, NIH-3T3-cellen, HeLa-cellen, baby hamster nier(BHK)-cellen, apen niercellen (COS), humane hepatocellulaire carcinoomcellen (b.v., Hep G2), A549-cellen, 3T3-cellen en een aantal andere cellijnen. Zoogdiergastheercellen omvatten humane, muizen-, ratten-, honden-, apen-, varken-, geiten-, runder-, paarden- 20 en hamstercellen. Cellijnen van specifieke voorkeur worden geselecteerd door vast te stellen welke cellijnen hoge expressieniveaus hebben. Andere cellijnen die kunnen worden toegepast zijn insectencellijnen, zoals Sf9-cellen, amfibiecellen, bacteriële cellen, plantencellen en fungale cellen. Wanneer recombinante expressiefactoren coderen voor de zware keten of antigeenbindend gedeelte 25 daarvan, worden de lichte keten en/of antigeenbindend gedeelte daarvan geïntroduceerd in zoogdiergastheercellen, worden antilichamen geproduceerd door de gastheercellen te kweken gedurende een tijdsperiode voldoende om expressie van het antilichaam in de gastheercellen toe te staan, of, meer bij voorkeur, secretie van het antilichaam in het kweekmedium in welke de gastheercellen

worden opgekweekt. Antilichamen kunnen worden verkregen uit het kweekmedium gebruikmakend van standaard eiwitzuiveringswerkwijzen. Plantengastheercellen omvatten, bijvoorbeeld, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, eendekroos, maïs, tarwe, aardappel, etc. Bacteriële gastheercellen omvatten *E. Coli*- en *Streptomyces*-soorten. Gistgastheercellen omvatten *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* en *Pichia pastoris*.

Verder, kan expressie van antilichamen toegepast in de uitvinding (of andere eenheden daarvan) van productielijnen worden verhoogd, een aantal bekende technieken toepassende. Bijvoorbeeld, is het glutaminesynthetasegenexpressiesysteem (het GS-systeem) een bekende benadering om expressie onder bepaalde condities te verhogen. Het GS-systeem wordt geheel of gedeeltelijk besproken in samenhang met Europese patent nrs. 0 216 846, 0 256 055, 0 338 841 en 0 323 997.

15

Het is waarschijnlijk dat antilichamen tot expressie gebracht door verschillende cellijnen of in transgene dieren verschillende glycosylatie van elkaar zullen hebben. Echter, alle antilichamen gecodeerd door de nucleïnezuurmoleculen hierin verschaft, of omvattende de aminozuursequenties hierin verschaft zijn deel van de huidige uitvinding, onafhankelijk van de glycosylatie van de antilichamen. Transgene niet-humane dieren en transgene planten omvattende een of meer nucleïnezuurmoleculen hierboven beschreven, kunnen worden toegepast om antilichamen toegepast in de uitvinding te produceren. Antilichamen kunnen worden geproduceerd in en verkregen uit weefsel of lichaamsvloeistoffen, zoals melk, bloed of urine, van geiten, koeien, paarden, varkens, ratten, muizen, konijnen, hamsters of andere zoogdieren. Zie, b.v. V.S. patent nrs. 5,827,690, 5,756,687, 5,750,172 en 5,741,957. Zoals hierboven beschreven, kunnen niet-humane transgene dieren die humane immunoglobuline loci omvatten worden geïmmuniseerd met MAdCAM of een gedeelte daarvan. Werk-

wijzen voor het maken van antilichamen in planten worden beschreven, b.v., in V.S. octrooien 6,046,037 en 5,959,177, hierin door referentie opgenomen.

Niet-humane transgene dieren en transgene planten worden geprodu-
5 ceerd door een of meer nucleïnezuurmoleculen toegepast in de uitvinding te
introduceren in het dier of de plant door standaard transgene technieken. Zie
Hogan, hierboven. De transgene cellen toegepast voor het maken van het
transgene dier kunnen embryonale stamcellen zijn, somatische cellen of gefer-
tiliseerde eicellen. De transgene niet-humane organismen kunnen chimeer,
10 niet-chimere heterozygoten, en niet-chimere homozygoten zijn. Zie, b.v., Hogan
e.a., *Manipulating the Mouse Embryo : A Laboratory Manual* 2de ed. Cold
Spring Harbor Press (1999); Jackson et al., *Mouse Genetics an Transgenics: A
Practical Approach*, Oxford University Press (2000); en Pinkert, *Transgenic
Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press (1999). De
15 transgene niet-humane organismen kunnen een targeted disruptie en vervan-
ging hebben die codeert voor een zware keten en/of een lichte keten van inte-
resse. De transgene dieren of planten kunnen omvatten en tot uitdrukking
brengen nucleïnezuurmoleculen die coderen voor zware en lichte ketens, die
combineren om specifiek aan MAdCAM te binden, bij voorkeur humaan MAd-
20 CAM. De transgene dieren of planten kunnen nucleïnezuurmoleculen omvat-
ten coderende voor een gemodificeerd antilichaam zoals een enkele ketenanti-
lichaam, een chimeer antilichaam of een gehumaniseerd antilichaam. De anti-
MAdCAM-antilichamen kunnen worden gemaakt in een transgeen dier. De
niet-humane dieren omvatten muizen, ratten, schapen, varkens, geiten, rund-
25 vee of paarden. Het niet-humane transgene dier brengt genoemde gecodeerde
polypeptiden tot uitdrukking in bloed, melk, urine, speeksel, tranen, slijm en
andere lichaamsvloeistoffen.

Behandeling kan toediening van een of meer inhibitoire anti-MAdCAM-monoklonale antilichamen van de uitvinding, of antigeenbindende fragmenten daarvan, alleen of met een farmaceutisch aanvaardbare drager. Inhibitoire anti-MAdCAM-antilichamen en samenstelling deze omvattende,

5 kunnen worden toegediend in combinatie met een of meer andere therapeutische, diagnostische of profylactische agentia. Zulke additionele agentia kunnen worden omvat in dezelfde samenstelling of afzonderlijk toegediend. Additionele therapeutische agentia omvatten anti-inflammatoire of immuunmodulerende agentia. Deze agentia omvatten, maar zijn niet beperkt tot, de topicale en orale

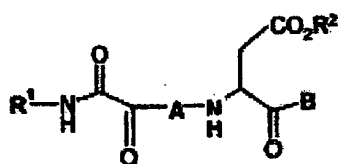
10 corticosteroiden, zoals prednisolon, methylprednisolon, NCX-1015 of budesonide; de aminocalicylaten zoals mesalazine, olsalazine, balsalazide of NCX-456; de klasse van immunomodulatoren zoals azathioprine, 6-mercaptopurine, methotrexaat, cyclosporine, FK506, IL-10 (Ilodecakin), IL-11 (Oprelevkin), IL-12, MIF/CD74-antagonisten, CD40-antagonisten, zoals TNX-100/5-D12,

15 OX40L-antagonisten, GM-CSF, pimecrolimus of rapamycine; de klasse van anti-TNF α -agentia zoals infliximab, adalimumab, CDP-870, onercept, etanercept; de klasse van anti-inflammatoire agentia, zoals PDE-4-inhibitoren (roflumilast, etc), TACE-inhibitoren (DPC-333, RDP-58, etc.) en ICE-inhibitoren (VX-740, etc.) zowel als IL-2-receptorantagonisten, zoals daclizumab, de klasse

20 van selectieve adhesiemoleculantagonisten, zoals natalizumab, MLN-02 of alicaforsen, klassen van analgetische agentia, zoals, maar niet beperkt tot, COX-2-inhibitoren, zoals rofecoxib, valdecoxib, delecocixib, P/Q-type voltagegevoelige kanaal($\alpha 2\delta$)-modulatoren, zoals gabapentin en pregabalin, NK-1-receptorantagonisten, cannabinoïdreceptormodulatoren, en delta-

25 opioïdreceptorantagonisten, zoals als antineoplastische, antitumor, anti-angiogenechemotherapeutische agentia, of antifibrotische agentia omvattende maar niet beperkt tot protease-inhibitoren, bij voorkeur caspase-inhibitoren, meer geprefereerd is de caspase0inhibitor een verbinding van formule I.

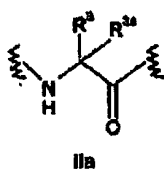
De verbinding van formule I



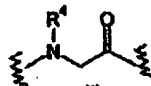
Formule I

- 5 waarin A, B, R1 en R2 zijn zoals beneden beschreven.
 waarin

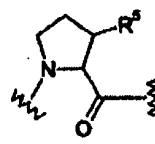
A een natuurlijk of onnatuurlijk aminozuur van formule IIa-i is:



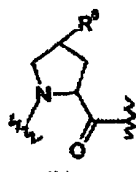
IIa



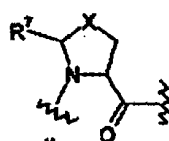
IIb



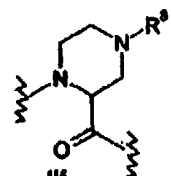
IIc



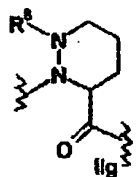
IIId



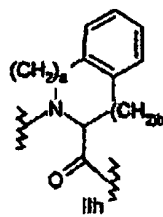
IIe



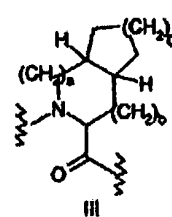
IIIf



IIg

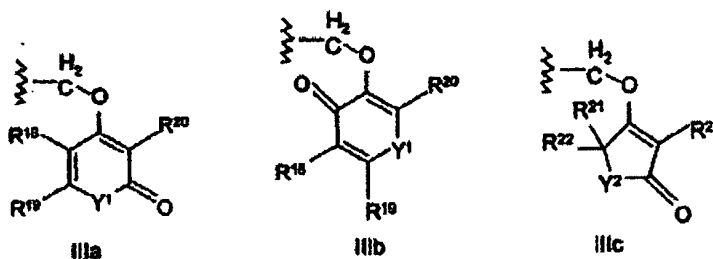


IIh



IIi

B is een waterstofatoom, een deuteriumatoom, alkyl, cycloalkyl, fenyl, gesubstitueerd fenyl, naftyl, gesubstitueerd naftyl, 2-benzo-oxazolyl, gesubstitueerd 2-oxazolyl, $(\text{CH}_2)_n$ -cycloalkyl, $(\text{CH}_2)_n$ -fenyl, $(\text{CH}_2)_n$ -(gesubstitueerd fenyl), $(\text{CH}_2)_n$ -(1- of 2-naftyl), $(\text{CH}_2)_n$ -(gesubstitueerd 1- of 2-naftyl), $(\text{CH}_2)_n$ -(heteroaryl), $(\text{CH}_2)_n$ -(gesubstitueerd heteroaryl), halomethyl, CO_2R^{12} , $\text{CONR}^{13}\text{R}^{14}$, $\text{CH}_2\text{ZR}^{15}$, $\text{CH}_2\text{OCO}(\text{aryl})$, $\text{CH}_2\text{OCO}(\text{heteroaryl})$ of $\text{CH}_2\text{OPO}(\text{R}^{16})\text{R}^{17}$, waar Z een zuurstof- of een zwavelatoom is, of B is een groep van de formule IIIa-c:



R^1 is alkyl, cycloalkyl, (cycloalkyl)alkyl, fenyl, gesubstitueerd fenyl, fenylalkyl, gesubstitueerd fenylalkyl, naftyl, gesubstitueerd naftyl, (1- of 2-naftyl)alkyl, gesubstitueerd (1- of 2-naftyl)alkyl, heteroaryl, gesubstitueerd heteroaryl, (heteroaryl)alkyl, gesubstitueerd (heteroaryl)alkyl, $\text{R}^{1a}(\text{R}^{1b})\text{N}$ of R^{1c}O , en R^2 is waterstof, lager alkyl, cycloalkyl, (cyloalkyl)alkyl, fenyl, gesubstitueerd fenyl, fenylalkyl, gesubstitueerd fenylalkyl, naftyl, gesubstitueerd naftyl, (1- of 2-naftyl)alkyl of gesubstitueerd (1- of 2-naftyl)alkyl;

en waarin:

R^{1a} en R^{1b} zijn onafhankelijk waterstof, alkyl, cycloalkyl, (cycloalkyl)alkyl, fenyl, gesubstitueerd fenyl, fenylalkyl, gesubstitueerd fenylalkyl, naftyl, gesub-

stitueerd naftyl, (1- of 2-naftyl)alkyl, gesubstitueerd (1- of 2-naftyl)alkyl, h ete-
roaryl, gesubstitueerd heteroaryl, (heteroaryl)alkyl of gesubstitueerd (heteroa-
ryl)alkyl, met het voorbehoud dat R^{1a} en R^{1b} niet beide waterstof kunnen zijn;

R^{1c} is alkyl, cycloalkyl, (cycloalkyl)alkyl, fenyl, gesubstitueerd fenyl, fenylalkyl,
5 gesubstitueerd fenylalkyl, naftyl, gesubstitueerd naftyl, (1- of 2-naftyl)alkyl,
gesubstitueerd (1- of 2-naftyl)alkyl, heteroaryl, gesubstitueerd heteroaryl, (he-
teroaryl)alkyl, of gesubstitueerd (heteroaryl)alkyl;

R^3 is C_1 - C_6 -alkyl, cycloalkyl, fenyl, gesubstitueerd fenyl, $(CH_2)_nNH_2$,
 $(CH_2)_nNHCOR^9$, $(CH_2)_nN(C=NH)NH_2$, $(CH_2)_mCO_2R_2$, $(CH_2)_mOR^{10}$, $(CH_2)_mSR^{11}$,
10 $(CH_2)_ncycloalkyl$, $(CH_2)_nfenyl$, $(CH_2)_n$ -(gesubstitueerd fenyl), $(CH_2)_n$ -(1- of 2-
naftyl) of $(CH_2)_n$ -(heteroaryl), waarin heteroaryl pyridyl, thi enyl, furyl, thiazo-
lyl, imidazolyl, pyrazolyl, isoxazolyl, pyrazinyl, pyrimidyl, triazinyl, tetrazolyl
en indonyl omvat;

R^{3a} is waterstof of methyl, of R^3 en R^{3a} zijn samengenomen $-(CH_2)_d$ - waarin d
15 een geheel getal is van 2 tot 6;

R^4 fenyl, gesubstitueerd fenyl $(CH_2)_m$ fenyl, $(CH_2)_m$ (gesubstitueerd fenyl), cy-
cloalkyl of benzogefuseerd cycloalkyl is;

R^5 waterstof, lager alkyl, cycloalkyl, fenyl, gesubstitueerd fenyl,
 $(CH_2)_ncycloalkyl$, $(CH_2)_nfenyl$, $(CH_2)_n$ (gesubstitueerd fenyl) of $(CH_2)_n$ (1- of 2-
20 naftyl) is;

R^6 waterstof, fluorine, oxo, lager alkyl, cycloalkyl, fenyl, gesubstitueerd fenyl,
naftyl, $(CH_2)_ncycloalkyl$, $(CH_2)_nfenyl$, $(CH_2)_n$ (gesubstitueerd fenyl), $(CH_2)_n$ (1- of
2-naftyl), OR^{10} , SR^{11} of $NHCOR^9$ is;

R^7 is waterstof, oxo (b.v. =O), lager alkyl, cycloalkyl, fenyl, gesubstitueerd fe-
25 nyl, naftyl, $(CH_2)_ncycloalkyl$, $(CH_2)_nfenyl$, $(CH_2)_n$ (gesubstitueerd fenyl of
 $(CH_2)_n$ (1- of 2-naftyl));

R^8 is lager alkyl, cycloalkyl, $(CH_2)_ncycloalkyl$, $(CH_2)_nfenyl$,
 $(CH_2)_n$ (gesubstitueerd fenyl), $(CH_2)_n$ (1-of 2-naftyl of COR^9 ;

- R⁹ is waterstof, lager alkyl, cycloalkyl, fenyl, gesubstitueerd fenyl, naftyl (CH₂)_ncycloalkyl, (CH₂)_nfenyl, (CH₂)_n(gesubstitueerd fenyl), (CH₂)_n(1- of 2-naftyl), OR¹², of NR¹³R¹⁴;
- R¹⁰ waterstof, lager alkyl, cycloalkyl, fenyl, gesubstitueerd fenyl, naftyl,
 5 (CH₂)_ncycloalkyl, (CH₂)_nfenyl, (CH₂)_n(gesubstitueerd fenyl) of (CH₂)_n(1- of 2-naftyl) is;
- R¹¹ lager alkyl, cycloalkyl, fenyl, gesubstitueerd fenyl, naftyl, (CH₂)_ncycloalkyl, (CH₂)_nfenyl, (CH₂)_n(gesubstitueerd fenyl) of (CH₂)_n(1- of 2-naftyl) is;
- R¹² is lager alkyl, cycloalkyl, (CH₂)_ncycloalkyl, (CH₂)_nfenyl,
 10 (CH₂)_n(gesubstitueerd fenyl) of (CH₂)_n(1- of 2-naftyl);
- R¹³ waterstof, lager alkyl, cycloalkyl, fenyl, gesubstitueerd fenyl, naftyl, gesubstitueerd naftyl, (CH₂)_ncycloalkyl, (CH₂)_nfenyl, (CH₂)_n(gesubstitueerd fenyl) of (CH₂)_n(1- of 2-naftyl) is;
- R¹⁴ is waterstof of lager alkyl; of
 15 R¹³ en R¹⁴ vormen samen genomen een vijf- tot zevenledig carbocyclische of heterocyclische ring, zoals morfoline of N-gesubstitueerd piperazine;
- R¹⁵ is fenyl, gesubstitueerd fenyl, naftyl, gesubstitueerd naftyl, heteroaryl, (CH₂)_nfenyl, (CH₂)_n(gesubstitueerd fenyl), (CH₂)_n(1- of 2-naftyl) of (CH₂)_n(heteroaryl);
- 20 R¹⁶ of R¹⁷ zijn onafhankelijk lager alkyl, cycloalkyl, fenyl, gesubstitueerd fenyl, naftyl, fenylalkyl, gesubstitueerd fenylalkyl of (cycloalkyl)alkyl;
- R¹⁸ en R¹⁹ zijn onafhankelijk waterstof, alkyl, fenyl, gesubstitueerd fenyl (CH₂)_nfenyl, (CH₂)_n(gesubstitueerd fenyl) of R¹⁸ en R¹⁹ samen genomen - (CH=CH)₂-;
- 25 R²⁰ is waterstof, alkyl, fenyl, gesubstitueerd fenyl, (CH₂)_nfenyl, (CH₂)_n(gesubstitueerd fenyl);
- R²¹, R²² en R²³ zijn onafhankelijk waterstof of alkyl;
- X is CH₂, (CH₂)₂, (CH₂)₃ of S;
- Y¹ is O of NR²³;

Y^2 is CH_2 , O, of NR^{23} ;

a is 0 of 1 en b is 1 of 2, onder voorbehoud dat wanneer a 1 is dan b 1 is;

c is 1 of 2, onder voorbehoud dat wanneer c 1 is dan a 0 is en b 1 is;

m is 1 of 2; en

5 n is 1, 2, 3 of 4;

of een farmaceutisch aanvaardbaar zout daarvan.

Zoals hierin toegepast, betekent de term "alkyl" een rechte of vertakte C_1 tot C_{10} koolstofketen, zoals methyl, ethyl, tert-butyl, isopropyl, n-octyl en dergelijke. De term "lager alkyl" betekent een rechte keten of vertakte C_1 tot
 10 C_6 koolstofketen zoals methyl, ethyl, iso-propyl, en dergelijke.

Afhankelijk van de keuze van oplosmiddel en andere condities bekend aan de vakman, kunnen deze verbindingen ook de ketale af acetale vorm aannemen, en de toepassing van deze vormen in de combinatie van de uitvinding
 15 is omvat in de uitvinding.

Deze verbindingen kunnen worden bereid zoals beschreven in WO 00/01666 of in US 6,544,951, hierin door referentie in hun geheel opgenomen. Geprefereerde subsgroepen zijn deze zoals opgenoemd in US 6,544,051.

20

Geprefereerd zijn verbindingen geselecteerd uit:

(3S)-3-[N-(N'-(2-fluor-4-iodofenyl)oxamyl)valinyl]amino-5-(2', 3', 5', 6'-tetrafluorfenoxy)-4-oxopantanoëenzuur;

(3S)- 3-[N-(N'-(2-chloorfenyl)oxamy)valinyl]amino-5-(2', 3', 5', 6'-tetrafluorfenoxy)-4-oxopentanoëenzuur;

(3S)-3-[N-(N'-(2-broomfenyl)oxamy)valinyl]amino-5(2', 3', 5', 6'-tetrafluorfenoxy)-4-oxopentanoëenzuur;

(3S)-3-[N-(N'-(2-fluorfenyl)oxamy)valinyl]amino-5-(2', 3', 5', 6'-tetrafluorfenoxy)-4-oxopentanoëenzuur;

- (3S)-3-[N-(N'-(2-trifluormethylfenyl)oxamyl)valinyl]amino-5-(2',3',5',6'-tetrafluorfenoxo)-4-oxopentanoëenzuur;
- (3S)-3-[N-(N'-(1-anthryl)oxamyl)valinyl]amino-5-(2',3',5',6'-tetrafluorfenoxo)-4-oxopentanoëenzuur;
- 5 (3S)-3-[N-N'-(2-tert-butylfenyl)oxamyl]alaninyl]amino-5-(2',3',5',6'-tetrafluorfenoxo)-4-oxopentanoëenzuur;
- (3S)-3-[N-(N'-(2-trifluormethylfenyl)oxamyl)alaninyl]amino-5-(2',3',5',6'-tetrafluorfenoxo)-4-oxopentanoëenzuur;
- (3S)-3-[N-(N'-(2,6-difluorfenyl)oxamyl)alaninyl]amino-5-(2',3',5',6'-tetrafluorfenoxo)-4-oxopentanoëenzuur;
- 10 (3S)-3-[N-N'-(1-naftyl)oxamyl]alaninyl]amino-5-(3',3',5',6'-tetrafluorfenoxo)-4-oxopentanoëenzuur;
- (3S)-3-[N-(N'-(4-methoxyfenyl)oxamyl)alaninyl]amino-5-(2',3',5',6'-tetrafluorfenoxo)-4-oxopentanoëenzuur;
- 15 (3S)-3-[N-(N'-(2-trifluormethylfenyl)oxamyl)valinyl]amino-4-oxobutanoëenzuur;
- (3S)-3-[N-(N'-(2-tert-butylmethylfenyl)oxamyl)valinyl]amino-4-oxobutanoëenzuur;
- (3S)-3-[N-(N'-(2-benzylfenyl)oxamyl)valinyl]amino-4-oxobutanoëenzuur;
- 20 (3S)-3-[N-(N'-(2-fenylfenyl)oxamyl)valinyl]amino-4-oxobutanoëenzuur.

Meest geprefereerd, is de verbinding (3S)-3-[N-N'-(2-tert-butylfenyl)oxamyl]alaninyl]amino-5-(2',3',5',6'-tetrafluorfenoxo)-4-oxopentanoëenzuur.

25

Zoals hierin toegepast, betekent "farmaceutisch acceptabele drager" alle oplosmiddelen, dispersiemedia, coatings, antibacteriële en antifungale agentia, isotone en absorptieverhogende of -vertragende agentia, en dergelijke die fysiologisch compatibel zijn. Enige voorbeelden van farmaceutisch accepta-

bele dragers zijn water, zoutoplossing, fosfaatgebufferde zoutoplossing, acetaatbuffer met natriumchloride, dextrose, glycerol, polyethyleenglycol, ethanol en dergelijke, zowel als combinaties daarvan. In vele gevallen, zal het geprefereerd zijn isotone agentia in de samenstelling op te nemen, bijvoorbeeld, suikers, polyalcoholen zoals mannitol, sorbitol, of natriumchloride. Additionele voorbeelden van farmaceutisch acceptabele stoffen zijn surfactantia, bevochtigingsmiddelen of kleine hoeveelheden van hulpstoffen zoals bevochtigings- of emulgerende agentia, conserveermiddelen of buffers, welke het plantleven of effectiviteit van het antilichaam verhogen.

10

De samenstellingen toegepast in deze uitvinding kunnen in een verscheidenheid aan vormen zijn, bijvoorbeeld, vloeibaar, halfvast en vaste doseringsvormen, zoals vloeibare oplossingen (b.v., injecteerbare en infuseerbare oplossingen), dispersies of suspensies, tabletten, pillen, gevriesdroogde koek, droge poeders, liposomen en zetpillen. De geprefereerde vorm hangt af van de bedoelde wijze van toediening en therapeutische applicatie. Typisch geprefereerde samenstellingen zijn in de vorm van injecteerbare of infuseerbare oplossingen, zoals samenstellingen vergelijkbaar aan deze toegepast voor passieve immunisatie van mensen. De geprefereerde wijze van toediening is parenteraal (b.v., intraveneus, subcutaan, interperitoneaal, intramusculair, intradermaal). In een voorkeursuitvoering, wordt het antilichaam toegediend door intraveneuze infusie of injectie. In een andere voorkeursuitvoering, wordt het antilichaam toegediend door intramusculaire, intradermale of subcutane injectie. Indien gewenst, kan het antilichaam worden toegediend door toepassing van een pomp, klisma, zetpil, of inwendig reservoir of iets dergelijks.

25

Therapeutische samenstellingen moeten typisch steriel zijn en stabiel onder de omstandigheden van vervaardiging en opslag. De samenstelling kan worden geformuleerd als een oplossing, gevriesdroogde cake, droog poeder, mi-

cro-emulsie, dispersie, liposoom, of andere bestelde structuur geschikt voor hoge medicijnconcentratie. Steriele injecteerbare oplossingen kunnen worden bereid door het anti-MAdCAM-antilichaam op te nemen in de benodigde hoeveelheid in een geschikt oplosmiddel met één of een combinatie van ingrediënten hierboven opgesomd, zoals benodigd, gevolgd door sterilisatie. In het geval van steriele poeders voor de bereiding van steriele injecteerbare oplossingen, zijn de geprefereerde werkwijzen van bereiding vacuümdroging en vriesdroging dat een poeder van het actieve ingrediënt opbrengt met een additioneel gewenst ingrediënt van een voorafgaand steriele oplossing daarvan. In het algemeen, worden dispersies bereid door de actieve verbinding op te nemen in een steriel vehikel dat een basisch dispersiemedium omvat en de benodigde andere ingrediënten van deze hierboven opgesomd. De gewenste eigenschappen van een oplossing kunnen worden behouden, bijvoorbeeld, door de toepassing van surfactanten en de benodigde partikelgrootte in het geval van dispersie door de toepassing van surfactanten, fosfolipiden en polymeren. Verlengde absorptie van injecteerbare samenstellingen kunnen worden bewerkstelligd door in de samenstelling een agens op te nemen dat absorptie vertraagt, bijvoorbeeld, monostearaatzouten, polymere materialen, oliën en gelatine.

De antilichamen van de onderhavige uitvinding kunnen worden toegediend door een verscheidenheid van werkwijzen bekend in de kunst, hoewel voor vele therapeutische applicaties de geprefereerde route/wijze van toediening subcutaan, intramusculair, intradermaal of intraveneuze infusie is. Zoals zal worden begrepen door de vakman, zal de route en/of de wijze van toediening variëren afhankelijk van de gewenste resultaten.

In bepaalde uitvoeringsvormen, kunnen de antilichaamsamenstellingen worden bereid met een drager die het antilichaam zal beschermen tegen snelle vrijgave, zoals een gecontroleerde vrijgaveformulering, omvattende im-

plantaten, transdermale patches, en micro-geïncapsuleerde afleversystemen. Biodegradeerbare, biocompatibele polymeren kunnen worden toegepast, zoals ethyleenvinylacetaat, polyanhydriden, polyglycolzuur, collageen, polyorthoesters, en polylactisch zuur. Vele werkwijzen voor de bereiding van zulke formuleringen zijn gepatenteerd of algemeen bekend aan deze die vaardig zijn in de kunst. Zie, b.v. Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1978)).

In bepaalde uitvoeringsvormen kan een anti-MAdCAM-antilichaam volgens de uitvinding oraal worden toegediend, bijvoorbeeld, met een inert oplosmiddel of een assimileerbare eetbare drager. De verbinding (en andere ingrediënten, indien gewenst) kan ook worden omvat in een harde of zachte schaalgelatinecapsule, opeengedrukt in tabletten, of opgenomen direct in het dieet van de patiënt. Voor orale therapeutische toediening, kunnen de anti-MAdCAM-antilichaam worden opgenomen met excipiënten en toegepast in de vorm van opneembare tabletten, bucale tabletten, tabletten, capsules, elixers, suspensies, siropen, ouwels, en dergelijke. Om een verbinding van de uitvinding toe te dienen op andere wijze dan parenterale toediening, kan het nodig zijn de verbinding te coaten met, of de verbinding samen toe te dienen met, een materiaal om zijn inactivatie te voorkomen.

De samenstellingen van de uitvinding kunnen een "therapeutisch effectieve hoeveelheid" omvatten of een "profylactisch effectieve hoeveelheid" of een antilichaam of antigeenbindend gedeelte van de uitvinding. Een "therapeutisch effectieve hoeveelheid" refereert aan een hoeveelheid effectief, aan doseringen en voor perioden van tijd noodzakelijk, om het gewenste therapeutische resultaat te bereiken. Een therapeutisch effectieve hoeveelheid van het antilichaam of antilichaamgedeelte kan variëren afhankelijk van factoren zoals de ziektestaat, leeftijd, sexe en gewicht van het individu, en de mogelijk-

heid van het antilichaam of antilichaamgedeelte om een gewenste respons in het individu op te wekken. Een therapeutisch effectieve hoeveelheid is ook een waarin toxische of schadelijke effecten van het antilichaam of antilichaamgedeelte worden gecompenseerd door de therapeutisch gunstige effecten. Een

5 "profylactisch effectieve hoeveelheid" refereert aan een hoeveelheid effectief, aan doseringen en voor perioden van tijd noodzakelijk, om het gewenste profylactische resultaat te bereiken. Typisch, omdat een profylactische dosis wordt toegepast in patiënten voorafgaand aan of in een eerder stadium van ziekte, kan de profylactisch effectieve hoeveelheid minder zijn dan de therapeutisch

10 effectieve hoeveelheid.

Doseringregimes kunnen worden aangepast om de optimaal gewenste respons te verschaffen (b.v. een therapeutische of profylactische respons). Bijvoorbeeld, een enkele bolus kan worden toegediend, verschillende gescheiden

15 doseringen kunnen worden toegediend over tijd of de dosis kan proportioneel worden gereduceerd of vermeerderd zoals aangegeven door de behoeften van de therapeutische situatie. Het is specifiek voordelig parenterale samenstellingen te formuleren in doseringseenheid vorm voor gemak van toediening en eenheid van dosering. Doseringseenheid vorm zoals hierin toegepast refereert

20 aan fysiek discrete eenheden geschikt als eenheidsdoseringen voor de zoogdierpatiënten die behandeld moeten worden; elke eenheid omvattende een pregedetermineerde hoeveelheid van actieve verbinding berekend het gewenste therapeutisch effect te veroorzaken in samenspraak met de benodigde farmaceutische drager. De specificatie voor de doseringseenheidvormen van de

25 uitvinding worden gedictieerd door en zijn direct afhankelijk van (a) de unieke eigenschappen van het anti-MAdCAM-antilichaam of gedeelte daarvan en het specifieke therapeutische of profylactische effect dat moet worden bereikt en (b) de beperkingen inherent aan de kunst van de samenstelling van zo'n antilichaam voor de behandeling van gevoeligheid in individuen.

Een toelichtend, niet limiterend bereik voor een therapeutisch of profylactisch effectieve hoeveelheid van een antilichaam of antilichaamgedeelte van de uitvinding is 0,025 tot 50 mg/kg, meer geprefereerd 0,1 tot 50 mg/kg, meer geprefereerd meer dan 0,1-25, 0,1 tot 10 of 0,1 tot 3 mg/kg. In sommige uitvoeringsvormen, omvat een formulering 5 mg/ml antilichaam in een buffer van 20 mM natriumacetaat, pH 5,5, 140 mM NaCl en 0,2 mg/ml polysorbaat 80. In andere uitvoeringsvormen, omvat een formulering 10 mg/ml antilichaam in 2,73 mg/ml van natriumacetaatrihydraat, 45 mg/ml mannitol, 0,02 mg/ml van dinatrium EDTA-dihydraat, 0,2 mg/ml polysorbaat 80, bijgesteld tot pH 5,5 met ijsazijn, bijvoorbeeld voor intraveneuze toepassing. In andere uitvoeringsvormen, omvat een formulering 50 mg/ml antilichaam, 2,73 mg/ml van natriumacetaatrihydraat, 45 mg/ml van mannitol, 0,02 mg/ml dinatrium EDTA-dihydraat, 0,4 mg/ml polysorbaat 80, bijgesteld tot pH 5,5 met ijsazijn, bijvoorbeeld voor subcutaan of intradermale toepassing. Het moet opgemerkt worden dat doseringswaarden kunnen variëren met het type en ernst van de conditie die moet worden verbeterd. Het moet verder worden begrepen dat voor een specifieke patiënt, specifieke doseringsregimes moeten worden aangepast over tijd volgens de individuele behoefte en de professionele beoordeling van de persoon toedienende of superviserende de toediening van de samenstellingen, en dat doseringsbereiken zoals hierin uiteengezet alleen voorbeelden zijn en niet zijn bedoeld de omvang of praktijk van de geclaimde samenstelling te beperken.

In een voorkeursuitvoering, wordt het antilichaam toegediend in een formulering als een steriele waterige oplossing met een pH die varieert van ongeveer 5,0 tot ongeveer 6,5 en omvattende van ongeveer 1 mg/ml tot ongeveer 200 mg/ml van antilichaam, van ongeveer 1 mM tot ongeveer 100 mM van histidinebuffer, van ongeveer 0,01 mg/ml tot ongeveer 10 mg/ml van polysor-

baat 80, van ongeveer 100 mM tot ongeveer 400 mM van trehalose en van ongeveer 0,01 mM tot ongeveer 1,0 mM van dinatrium EDTA-dihydraat.

Een ander aspect van de onderhavige uitvinding verschaft kits omvat-
5 tende een anti-MAdCAM-antilichaam of antilichaamgedeelte van de uitvin-
ding of een samenstelling omvattende zo'n antilichaam. Een kit kan omvatten,
in toevoeging op het antilichaam of samenstelling, diagnostische of therapeuti-
sche agentia. Een kit kan ook instructies omvatten voor toepassing in een dia-
gnostische of therapeutische werkwijze. In een voorkeursuitvoering, omvat de
10 kit het antilichaam of een compositie het omvattende en een diagnostisch
agens dat kan worden toegepast in een werkwijze beneden beschreven. In een
andere voorkeursuitvoering, omvat de kit het antilichaam of een samenstelling
het omvattende en een of meer therapeutische agentia die kunnen worden toe-
gepast in een werkwijze beneden beschreven.

15

De nucleïnezuurmoleculen van de onderhavige uitvinding kunnen wor-
den toegediend aan een patiënt die het nodig heeft via gentherapie. De thera-
pie kan ofwel in vivo of *ex vivo* zijn. In een voorkeursuitvoering, worden de nu-
cleïnezuurmoleculen coderende voor zowel een zware keten als een lichte keten
20 toegediend aan een patiënt. In een meer geprefereerde uitvoeringsvorm, wor-
den de nucleïnezuurmoleculen toegediend zodat ze stabiel geïntegreerd worden
in chromosomen van B-cellen omdat deze cellen gespecialiseerd zijn voor het
produceren van antilichamen. In een voorkeursuitvoering, worden precursor-
B-cellen getransfekteerd of geïnfecteerd *ex vivo* en gere-transplanteerd in een
25 patiënt die het nodig heeft. In een andere uitvoeringsvorm, worden precursor-
B-cellen of andere cellen geïnfecteerd in vivo toepassende een recombinant vi-
rus bekend het celtypen van interesse te infecteren. Typische vectoren toegepast
voor gentherapie omvatten liposomen, plasmiden en virale vectoren. Voorbeel-
den van virale vectoren zijn retrovirussen, adenovirussen en adeno-

geassocieerde virussen. Na infectie ofwel *in vivo* ofwel *ex vivo*, kunnen niveaus van antilichaamexpressie worden gecontroleerd door een monster te nemen van de behandelde patiënt en toepassende een immunoassay bekend in de kunst of hierin beschreven.

5

In een voorkeursuitvoering, omvat de genterapiewerkwijze de stappen van toediening van geïsoleerd nucleïnezuurmolecuul coderende voor de zware keten of een antigeenbindend gedeelte daarvan van een anti-MAdCAM-antilichaam en het tot expressie brengen van het nucleïnezuurmolecuul. In
 10 een andere uitvoeringsvorm, omvat de genterapiewerkwijze de stappen van toediening van een geïsoleerd nucleïnezuurmolecuul coderende voor de lichte keten of een antigeenbindend gedeelte daarvan van een anti-MAdCAM-antilichaam en het tot expressie brengen van het nucleïnezuurmolecuul. In een meer geprefereerde werkwijze, omvat de genterapiewerkwijze de stappen
 15 van toediening van een geïsoleerd nucleïnezuurmolecuul coderende voor de zware keten of een antigeenbindend gedeelte daarvan en een geïsoleerd nucleïnezuur coderende voor de lichte keten of het antigeenbindend gedeelte daarvan van een anti-MAdCAM-antilichaam van de uitvinding en het tot expressie brengen van de nucleïnezuurmoleculen. De genterapiewerkwijze kan ook de
 20 stap omvatten van toediening van een ander anti-inflammatoir of een immunomodulerend agens.

Een ander aspect van de uitvinding is een werkwijze van diagnose van een conditie waar het antilichaam van de uitvinding bruikbaar zal zijn als een
 25 medicament, door te testen of abnormale binding van een antilichaam van de uitvinding optreedt in de patiënt. Dit kan worden gedaan door toepassing van verschillende in beeld breng technieken goed bekend aan een vakman, zoals x-ray-analyse, gamma scintigrafie, magnetische resonantie-imaging (MRI), positron emissietomografie of computertomografie (CT), en andere.

Een of meer inhibitoire anti-MAdCAM-antilichamen van de uitvinding kunnen worden toegepast als een vaccin of als adjuvantia aan een vaccin, en dit is een ander aspect van de uitvinding. In het bijzonder, omdat MAdCAM tot expressie wordt gebracht in lymfoïde weefsel, kunnen vaccin antigenen voordelig worden gericht op lymfoïd weefsel door het antigeen te conjugeren aan een anti-MAdCAM-antilichaam van de uitvinding.

Tenzij anderszins hierin gedefinieerd, zullen wetenschappelijke en technische termen toegepast in samenhang met de onderhavige uitvinding de betekenissen hebben die algemeen begrepen worden door de vakmensen. Verder, tenzij ander vereist door context, zullen enkelvoudige termen meervouden omvatten en meervoudige termen zullen het enkelvoud omvatten. In het algemeen, zijn benamingen toegepast in samenhang met en technieken van, cel- en weefselkweek, moleculaire biologie, immunologie, microbiologie, genetica, eiweit- en nucleïnezuurchemie en hybridisatie zoals hierin beschreven goed bekend en algemeen toegepast in de kunst. De werkwijzen en technieken van de onderhavige uitvinding worden algemeen uitgevoerd volgens conventionele werkwijzen goed bekend in de kunst en zoals beschreven in verscheidene algemene en meer specifieke referenties die worden geciteerd en beschreven door de onderhavige beschrijving tenzij anderszins aangegeven. Zie, bijv, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^{de} ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Pring Harbor, N.Y.(1989) en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992) en Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), welke hierin zijn opgenomen door referentie. Enzymatische reacties en zuiveringstechnieken worden uitgevoerd volgens specificaties van de producent, zoals over het algemeen bereikt in de kunst of zoals hierin beschreven. Standaardtechnieken worden toegepast voor

chemische syntheses, chemische analyses, farmaceutische bereiding, formulering en aflevering, en behandeling van patiënten.

De term "polypeptide" omvat natieve of artificiële eiwitten, eiwitfragmenten en polypeptideanalogen van een eiwitsequentie. Een polypeptide kan monomeer of polymeer zijn.

De term "geïsoleerd eiwit" of "geïsoleerd polypeptide" is een eiwit of polypeptide dat door werking van zijn oorsprong of bron van afkomst (1) niet geassocieerd is met natuurlijk geassocieerde componenten die het in zijn natieve staat vergezellen, (2) is vrij van andere eiwitten van hetzelfde soort (3) wordt tot expressie gebracht door een cel van een verschillend soort, of (4) komt niet voor in de natuur. Dus, een polypeptide dat chemisch bereid wordt of wordt bereid in een cellulair systeem verschillend van de cel waarvan het natuurlijk afkomt zal worden "geïsoleerd" van zijn natuurlijk geassocieerde componenten. Een eiwit kan ook worden verkregen substantieel vrij van natuurlijk geassocieerde componenten door isolatie, eiwit zuiveringstechnieken toe-passende zoals goed bekend in de kunst.

Een eiwit of polypeptide is "substantieel zuiver", "substantieel homogeen" of "substantieel gezuiverd" wanneer ten minste ongeveer 60 tot 75% van een monster een enkel soort van polypeptide vertoont. Het polypeptide of eiwit kan monomeer of multimeer zijn. Een substantieel zuiver polypeptide of eiwit zal typische ongeveer 50%, 60%, 70%, 80% of 90% W/W van een eiwitmonster omvatten, meer gebruikelijk ongeveer 95%, en zal bij voorkeur meer dan 99% zuiver zijn. Eiwitzuiverheid of homogeniciteit kan worden aangegeven door een aantal middelen goed bekend in de kunst, zoals polyacrylamide, gelelectroforese of een eiwitmonster, gevolgd door visualisatie van een enkele polypeptideband bij kleuring van de gel met een kleuring goed bekend in de kunst. Voor

bepaalde doeleinden, kunnen hogere resoluties worden verschaft door toepassing van HPLC of andere middelen goed bekend in de kunst voor zuivering.

De term "polypeptidefragment" zoals hierin toegepast refereert aan een polypeptide dat een amino-einde- en/of carboxy-einde deletie heeft, maar waar de overblijvende aminozuursequentie identiek is aan de corresponderende posities in de natuurlijk optredende sequentie. In sommige uitvoeringsvormen, zijn fragmenten ten minste 5, 6, 8 of 10 aminozuren lang. In andere uitvoeringsvormen, zijn de fragmenten ten minste 14 aminozuren lang, meer geprefereerd ten minste 20 aminozuren lang, gebruikelijk ten minste 50 aminozuren lang, zelfs meer geprefereerd ten minste 70, 80, 90, 100, 150 of 200 aminozuren lang.

De term "polypeptideanaloog" zoals hierin toegepast refereert aan een polypeptide dat een segment omvat van ten minste 25 aminozuren dat substantiële identiteit heeft aan een gedeelte van een aminozuursequentie en die ten minste een van de volgende eigenschappen heeft: (1) specifieke binding aan MAdCAM onder geschikte bindingscondities, (2) mogelijkheid $\alpha_4\beta_7$ -integrine te inhiberen en/of L-selectinebinding aan MAdCAM, of (3) mogelijkheid MAdCAM-celoppervlakte-expressie *in vitro* of *in vivo* te reduceren. Typisch, omvatten polypeptideanologen een conservatieve aminozuursubstitutie (of insertie of deletie) met betrekking tot de natuurlijk voorkomende sequentie. Analogen zijn typisch ten minste 20 aminozuren lang, bij voorkeur ten minste 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 of 200 aminozuren lang of langer, en kunnen vaak zo lang zijn als een gehele-lengte voorkomend polypeptide.

Een "immunoglobuline" is een tetrameer molecuul. In een natuurlijk voorkomend immunoglobuline, is elk tetrameer samengesteld uit twee identieke paren van polypeptideketens, elk paar hebbende één "lichte" (ongeveer 25

kDa) en één "zware" keten (ongeveer 50-70 kDa). Het aminoterminele gedeelte van elke keten omvat een variabele regio van ongeveer 100 tot 110 of meer aminozuren primair verantwoordelijk voor antigeenherkenning. Het carboxyterminale gedeelte van elke keten definieert een constante regio primair verantwoordelijk voor effectorfunctie. Humane lichte ketens zijn geklassificeerd als κ en λ lichte ketens. Zware ketens zijn geklassificeerd als μ , δ , γ , α of ϵ , en definiëren het antilichaam isotype als IgM, IgD, IgG, IgA en IgE respectievelijk. Binnen lichte en zware ketens, zijn de variabele en constante regio's verbonden door een "J"-regio van ongeveer 12 of meer aminozuren, met de zware keten ook omvattende een "D"-regio van ongeveer 10 of meer aminozuren. Zie in het algemeen, *Fundamental Immunology*, hoofdstuk 7 (Paul, W., ed. 2^{de} ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (in zijn geheel opgenomen door referentie voor alle doeleinden). De variabele regio's van elk licht/zware ketenpaar vormen de antilichaam bindingsplaats zodat een intact immunoglobuline twee bindingsplaatsen heeft.

Immunoglobulineketens vertonen dezelfde algemene structuur van relatief geconserveerde framework-regio's (FR) verbonden door drie variabele regio's, ook complementarity determining regions of CDR's genoemd. De CDR's van de twee ketens van elk paar worden op één lijn gebracht door de framework-regio's om een epitooop-specifiek bindingsgebied te vormen. Van N-terminus naar C-terminus, omvatten zowel lichte als zware ketens de domeinen FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 en FR4. De toekenning van aminozuren aan elke domein is in overeenstemming met de definities van Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 en 1991), of Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917(1987); Chothia et al., *Nature*, 342:878-883 (1989), waarvan elk hierin in zijn geheel door referentie is opgenomen.

De term "antilichaam" refereert aan een intact immunoglobuline of aan een antigeenbindend gedeelte daarvan dat concurreert met het intacte antilichaam voor specifieke binding. In sommige uitvoeringsvormen, is een antilichaam een antigeenbindend gedeelte daarvan. Antigeenbindende gedeelten

5 kunnen worden geproduceerd door recombinante DNA-technieken of door enzymatische of chemische klieving van antilichamen. Antigeenbindende gedeelten omvatten, o.a. Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dAb, en complementair determining region (CDR)-fragmenten, enkele-keten antilichamen (scFv), chimere antilichamen, diabodies en polypeptiden die ten minste een gedeelte van een immunoglobuline omvatten dat voldoende is om specifieke antigeenbinding aan het

10 polypeptide te verlenen. Een Fab-fragment is een monovalent fragment bestaande uit de VL-, VH-, CL- en CH1-domeinen; een F(ab)₂-fragment is een bivalent fragment omvattende twee Fab-fragmenten verbonden door een disulfidebrug bij de hinge-regio; een Fd-fragment bestaat uit de VH- en CH1-

15 domeinen; een Fv-fragment bestaat uit de VL- en VH-domeinen van een enkele arm van een antilichaam; en een dAb-fragment (Ward et al., Nature 341:544-546 (1989)) bestaande uit een VH-domein. De term wordt ook bedoeld gemodificeerde versies van het antilichaam te omvatten zoals vastgezette antilichamen of antilichamen geconjugeerd aan detecteerbare eenheden zoals enzymen

20 (b.v. horseradish-peroxidase, alkalinefosfatase), radio-isotopen, biotine, fluorescente labels, en andere.

Zoals hierin toegepast, is een antilichaam waaraan gerefereerd wordt als, b.v., 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.2, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 of 9.8.2,

25 een monoklonaal antilichaam dat wordt geproduceerd door de hybridoma van dezelfde naam. Bijvoorbeeld, antilichaam 1.7.2 wordt geproduceerd door hybridoma 1.7.2. Een antilichaam waaraan gerefereerd wordt als 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod of 7.26.4-mod is een monoklonaal antili-

chaam waarvan de sequentie gemodificeerd is van zijn corresponderende ouder door plaatsgerichte mutagenese.

Een enkel-keten antilichaam (scFV) is een antilichaam waarin VL- en
 5 VH-regio's zijn gepaard om een monovalent molecuul te vormen via een syn-
 thetische linker die ze in staat stelt om gemaakt te worden als een enkele ei-
 witketen (Bird et al, 242:423-426 (1988) en Huston et al. Proc. Natl. Acad. Sci.
 USA, 85:5879-5883 (1988)). Diabodies zijn bivalente, bispecifieke antilichamen
 waarin VH- en VL-domeinen tot uitdrukking worden gebracht op een enkele
 10 polypeptideketen, maar gebruikmakende van een linker die te kort is om pa-
 ring tussen de twee domeinen op dezelfde keten toe te staan, daardoor de do-
 meinen dwingende te paren met complementaire domeinen van een andere
 keten en creërende twee antigeen bindingsplaatsen (zie, b.v. Holliger, P. et al.,
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) en Poljak, R.J. et al., Structu-
 15 re 2:1121-1123 (1994)). Een of meer CDR's van een antilichaam van de uitvin-
 ding kunnen worden opgenomen in een molecuul ofwel covalent dan wel non-
 covalent om het een amino adhesine te maken dat specifiek bindt aan MAD-
 CAM. Een immuno adhesine kan de CDR('s) opnemen als deel van een grotere
 polypeptideketen, kan covalent de CDR('s) binden aan een andere polypeptide-
 20 keten, of kan de CDR('s) noncovalent binden. De CDR('s) staan de immuno ad-
 hesine toe specifiek te binden aan een specifiek antigeen van interesse.

Een antilichaam kan een of meer bindingsplaatsen hebben. Als er meer
 dan een bindingsplaats is, kunnen de bindingsplaatsen identiek zijn aan el-
 25 kaar of kunnen verschillend zijn. Bijvoorbeeld, heeft een natuurlijk voorko-
 mend immunoglobuline twee identieke bindingsplaatsen, een enkele keten an-
 tilichaam of Fab-fragment heeft een bindingsplaats, terwijl een "bisspecifiek"
 of "bifunctioneel" antilichaam (diabody) twee verschillende bindingsplaatsen
 heeft.

Een "geïsoleerd antilichaam" is een antilichaam dat (1) niet is geassocieerd met natuurlijk geassocieerde componenten, omvattende andere natuurlijk geassocieerde antilichamen, die het vergezellen in zijn natieve staat, (2) is
 5 vrij van andere eiwitten van hetzelfde soort, (3) wordt tot uitdrukking gebracht door een cel van een verschillend soort, of (4) komt niet voor in de natuur. Voorbeelden van geïsoleerde antilichamen omvatten een anti-MAdCAM-antilichaam dat affiniteitsgezuiverd is MAdCAM toepassende, een anti-MAdCAM-antilichaam dat geproduceerd is door een hybridoma of andere cel-
 10 lijn *in vitro*, en een humaan anti-MAdCAM-antilichaam verkregen van een transgeen zoogdier of plant.

Zoals hierin toegepast, betekent de term "humaan antilichaam" een antilichaam waarin de variabele en constante regio sequenties humane sequenties zijn. De term omvat antilichamen met sequenties verkregen van hu-
 15 mane genen, maar welke veranderd zijn, b.v., om mogelijke immunogeniciteit te verminderen, affiniteit te verhogen, cysteïnes of glycosylatieplaatsen te elimineren die ongewenste vouwing kunnen veroorzaken, etc. De term omvat zulke antilichamen recombinant geproduceerd in niet-humane cellen welke
 20 glycosilatie niet typisch voor humane cellen kunnen verschaffen. De term omvat ook antilichamen welke zijn opgewekt in een transgene muis welke sommige of alle van de humane immunoglobuline zware en lichte keten loci omvatten.

25 In een aspect, verschaft de uitvinding een gehumaniseerd antilichaam. In sommige uitvoeringsvormen, is het gehumaniseerde antilichaam een antilichaam dat is verkregen van een niet-humaan soort, waarin bepaalde aminozuren in het framework en constante domeinen van de zware en lichte ketens gemuteerd zijn om een immuunrespons in mensen te vermijden of af te breken.

In sommige uitvoeringsvormen, kan een gehumaniseerd antilichaam worden geproduceerd door de constante domeinen van een humaan antilichaam te fuseren aan de variabele domeinen van een niet-humaan soort. Voorbeelden van hoe gehumaniseerde antilichamen te maken kunnen worden gevonden in U.S. octrooi nrs. 6,054,297, 5,886,152 en 5,877,293. In sommige uitvoeringsvormen, 5 omvat een gehumaniseerd anti-MAdCAM-antilichaam van de uitvinding de aminezuursequentie van een of meer framework-regio's van een of meer humane anti-MAdCAM-antilichaam van de uitvinding.

In een ander aspect, omvat de uitvinding toepassing van een "chimeer antilichaam". In sommige uitvoeringsvormen refereert het chimere antilichaam aan een antilichaam dat een of meer regio's van een antilichaam en een of meer regio's van een of meer andere antilichamen omvat. In een voorkeursuitvoering, worden een of meer van de CDR's verkregen van een humaan anti-MAdCAM-antilichaam van de uitvinding. In een meer geprefereerde uitvoeringsvorm, worden alle van de CDR's verkregen van een humaan anti-MAdCAM-antilichaam van de uitvinding. In een andere geprefereerde uitvoeringsvorm, zijn de CDR's van meer dan een humaan anti-MAdCAM-antilichaam van de uitvinding gemengd en gematched in een chimeer antilichaam. Bijvoorbeeld, kan een chimeer antilichaam omvatten een CDR1 20 van de lichte keten van een eerste humaan anti-MAdCAM antilichaam kan worden gecombineerd met CDR2 en CDR3 van de lichte keten van een tweede humane anti-MAdCAM antilichaam, en de CDR's van de zware keten kunnen worden verkregen van een derde anti-MAdCAM antilichaam. Verder, kunnen de framework-regio's worden verkregen van een of dezelfde anti-MAdCAM- 25 antilichamen, van een of meer verschillende antilichamen, zoals een humaan antilichaam, of van een gehumaniseerd antilichaam.

Een "neutraliserend antilichaam", een "inhiberend antilichaam" of antagonistantilichaam is een antilichaam dat de binding van $\alpha_4\beta_7$ of $\alpha_4\beta_7$ tot ex-

pressiebrengende cellen inhibeert, of een ander bekend ligand of bekende ligand tot expressiebrengende cellen, aan MAdCAM door ten minste ongeveer 20%. In een voorkeursuitvoering, reduceert het antilichaam inhibeert de binding van $\alpha_4\beta_7$ integrine of $\alpha_4\beta_7$ -tot expressiebrengende cellen aan MAdCAM met ten minste 40%, bij voorkeur met 60%, zelfs meer geprefereerd met 80%, 85%, 90%, 95% of 100%. De bindingsreductie kan worden gemeten door elk middel bekend aan de gemiddelde vakman, bijvoorbeeld, zoals gemeten in een *in vitro* competitieve bindingsassay. Een voorbeeld van meting van de reductie in binding van $\alpha_4\beta_7$ -tot expressiebrengende cel per MAdCAM is gepresenteerd in voorbeeld I.

Fragmenten of analogen van antilichamen kunnen eenvoudig worden bereid door degene van gemiddelde kunde in de kunst die de lessen van deze beschrijving volgen. Geprefereerde amino- en carboxyuiteinden van fragmenten of analogen treden op nabij grenzen van functionele domeinen. Structurele en functionele domeinen kunnen worden geïdentificeerd door vergelijking van de nucleotide- en/of aminozuursequentiedata met publieke of particuliere sequentiedatabases. Bij voorkeur, worden gecomputeriseerde vergelijkingswerkwijzen toegepast om sequentiemotieven of voorspelde eiwit confirmatiedomeinen te identificeren die optreden in ander eiwitten van bekende structuur en/of functie. Werkwijzen om eiwitsequenties te identificeren die in een bekende driedimensionele structuur vouwen zijn bekend (Bowie et al., Science, 253:164 (1991)).

De term " k_{off} " refereert aan de off rate-constante voor dissociatie van een antilichaam van het antilichaam/antigeencomplex.

De term " k_d " refereert aan de dissociatieconstante van een specifieke antilichaam-antigeeninteractie. Een antilichaam wordt gezegd een antigeen te

binden wanneer de dissociatieconstante $\leq 1 \mu\text{M}$, bij voorkeur $\leq 100 \text{ nM}$ en meest geprefereerd $\leq 10 \text{ nM}$.

De term "epitooop" omvat een eiwitdeterminant in staat specifiek aan
 5 een immunoglobuline of T-receptorcel te binden of anderszins interactie met
 een molecuul te vertonen. Epitoopdeterminanten bestaan gewoonlijk uit che-
 misch actieve oppervlaktegroeperingen van moleculen zoals aminozuren of
 koolhydraat zijketens en hebben gewoonlijk specifieke driedimensionale struc-
 10 turele eigenschappen, zowel als specifieke ladingeigenschappen. Een epitooop
 kan "lineair" of "conformationeel" zijn. In een lineair epitooop, treden al de pun-
 ten van interactie tussen het eiwit en het interacterende molecuul (zoals een
 antilichaam) lineair op langs de primaire aminozuursequentie van het eiwit.
 In een conformationeel epitooop, treden de punten van interactie op tussen
 15 aminozuurresiduen op het eiwit die gescheiden zijn van elkaar. Zoals hierin
 toegepast, volgen de 20 conventionele aminozuren en hun afkortingen conven-
 tioneel gebruik. Zie Immunology – A Synthesis (2^{de} editie, E.S. Glub en D.R.
 Gren, Eds. , Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), welke hierin is
 opgenomen door referentie. Stereoisomeren (b.v. D-aminozuren) van de twintig
 20 conventionele aminozuren, onnatuurlijke aminozuren zoals α -, α -
 digesubstitueerde aminozuren, N-alkyl aminozuren, lactaatzuur en andere
 onconventionele aminozuren kunnen ook geschikte componenten zijn voor po-
 lypeptiden van de onderhavige uitvinding. Voorbeelden van onconventionele
 aminozuren omvatten: 4-hydroxyproline, γ -carboxyglutamaat, ϵ -N,N,N-
 trimethyllysine, ϵ -N-acetyllysine, O-fosfoserine, N-acetyls erine, N-
 25 formylmethionine, 3-methylhistidine, 5-hydroxylysine, s-N-methylarginine en
 andere vergelijkbare aminozuren en iminozuren (b.v., 4-hydroxyproline). In de
 polypeptide notatie hierin toegepast, is de linker hand richting de amino-einde
 richting en de rechterhandrichting is de carboxy-einde richting, in overeen-
 stemming met standaardgebruik en conventie.

De term "polynucleotide" zoals hierin naar verwezen betekent een polymere vorm van nucleotiden van ten minste 10 basen in lengte, ofwel ribonucleotiden of deoxynucleotiden of een gemodificeerde vorm van elk type van nucleotide. De term omvat enkel- en dubbelstrengs vormen van DNA.

De term "geïsoleerd polynucleotide" zoals hierin toegepast zal betekenen een polynucleotide van genoom, cDNA of synthetische origine of een combinatie daarvan, welke door werking van zijn oorsprong het "geïsoleerde polynucleotide" (1) niet geassocieerd is met geheel of een gedeelte van een polynucleotide in welke het "geïsoleerde polynucleotide" wordt gevonden in de natuur, (2) is operabel verbonden aan een polynucleotide waaraan het niet is verbonden in de natuur, of (3) niet voorkomt in de natuur als deel van een grotere sequentie.

15

De term "oligonucleotide" naar verwezen hierin omvat natuurlijk voorkomende, en gemodificeerde nucleotiden samengebonden door natuurlijk optredende, en niet-natuurlijk optredende oligonucleotide bindingen. Oligonucleotiden zijn een polynucleotide subset over het algemeen omvattende een lengte van 200 basen of minder. Geprefereerde oligonucleotiden zijn 10 tot 60 basen in lengte en meest geprefereerd 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 of 20 tot 40 basen in lengte. Oligonucleotiden zijn gebruikelijk enkelstrengs, bijvoorbeeld, voor probes; hoewel oligonucleotiden dubbelstrengs kunnen zijn, bijvoorbeeld, voor toepassing en de constructie van een genmutant. Oligonucleotiden van de uitvinding kunnen ofwel sense ofwel antisense oligonucleotiden zijn.

25

De term "natuurlijk voorkomende nucleotiden" hierin gerefereerd omvat deoxyribonucleotiden en ribonucleotiden. De term "gemodificeerde nucleotiden" hierin naar verwezen omvat nucleotiden met gemodificeerde of gesubsti-

tueerde suikergroepen en dergelijke. De term "oligonucleotide bindingen" hierin naar verwezen omvat oligonucleotide bindingen zoals fosforthioaat, fosfordithioaat, fosforselenaat, fosfordiselenaat, fosforanilothioaat, fosforaniladaat, fosforoamidaat, en dergelijke. Zie, b.v. LaPlanche et al., Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al., J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein et al., Nucl. Acids Res., 16:3209 (1988); Zon et al., Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach blz. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al., U.S. patent nr. 5,151,510; Uhimann and Peyman, Chemical Reviews, 90:543 (1990), waarvan de beschrijvingen hierbij worden opgenomen door referentie. Een oligonucleotide kan een label voor detectie omvatten, indien gewenst.

"Operabel verbonden"-sequenties omvatten zowel expressie controlesequenties die aangrenzend zijn met het gen van interesse en expressie controlesequenties die in trans of op een afstand functioneren om het gen van interesse te controleren. De term "expressie controlesequentie" zoals hierin toegepast refereert aan polynucleotide sequenties welke nodig zijn om de expressie en processing van coderende sequenties te effectueren aan welke ze zijn geligeerd. Expressie controlesequenties omvatten geschikte transcriptieinitiatie-, terminatie-, promotor- en enhancersequenties; efficiënte RNA-processingsignalen zoals splicing en polyadenylatiesignalen; sequenties die cytoplasmatisch mRNA stabiliseren; sequenties die translatie-efficiëntie versterken (b.v. Kozak-consensussequentie); sequenties die eiwitstabiliteit verhogen; en, indien gewenst, sequenties die eiwitsecretie verhogen. De aard van zulke controlesequenties verschilt afhankelijk van het gastheerorganisme; in prokaryoten, omvatten zulke controlesequenties in het algemeen promotor, ribosomale bindingsplaats, en transcriptie terminatiessequentie; in eukaryoten, in het algemeen, omvatten zulke controlesequenties promotors en transcriptieterminatie-

sequentie. De term "controlesequenties" worden bedoeld te omvatten, ten minste, alle componenten waarvan aanwezigheid essentieel is voor expressie en processing, en kan ook additionele componenten omvatten waarvan aanwezigheid voordelig is, bijvoorbeeld, leidersequenties en fusiepartnersequenties.

5

De term "vector", zoals hierin gebruikt, wordt bedoeld te refereren aan een nucleïnezuurmolecuul in staat een ander nucleïnezuur te transporteren waaraan het verbonden is. Een type vector is een "plasmide", welke refereert aan een circulaire dubbelstrengs-DNA-lus waarin additionele DNA-segmenten geligeerd kunnen zijn. Een ander type van vector is een virale vector, waarin additionele DNA-segmenten kunnen zijn geligeerd in het virale genoom. Bepaalde vectoren zijn in staat tot autonome replicatie in een gastheercel waarin ze zijn geïntroduceerd (b.v. bacteriële vectoren hebbende een bacteriële oorsprong van replicatie en episomale zoogdiervectoren). Andere vectoren (b.v. niet-episomale zoogdiervectoren) kunnen worden geïntegreerd in het genoom van de gastheercel bij introductie in de gastheercel, en worden daardoor gerepliceerd tezamen met het gastheergenoom. Bovendien, zijn bepaalde vectoren in staat de expressie van genen te richten aan welke zij operatief zijn verbonden. Zulke vectoren zijn hierin gerefereerd als "recombinante expressievectoren" (of eenvoudiger, "expressievectoren"). In het algemeen, zijn expressievectoren die bruikbaar zijn in recombinante DNA-technieken vaak in de vorm van plasmiden. In de onderhavige specificatie, kunnen "plasmide" en "vector" uitwisselbaar worden toegepast omdat het plasmide de meest toegepaste vorm van vector is. Echter, wordt de uitvinding bedoeld zulke andere vormen van expressievectoren te omvatten, zoals virale vectoren (b.v. replicatie defecte retrovirussen, adenovirussen en adeno-geassocieerde virussen), welke equivalente functies dienen.

10
15
20
25

De term "recombinante gastheercel" (of eenvoudig "gastheercel") zoals hierin toegepast, wordt bedoeld te refereren aan een cel waarin een recombinante expressievector geïntroduceerd is. Het moet worden begrepen dat zulke termen bedoeld zijn niet alleen te refereren aan de specifieke cel van onder-
5 werp maar aan het nageslacht van zo'n cel. Omdat bepaalde modificaties kunnen optreden in opvolgende generaties als gevolg van ofwel mutatie of omgevingsinvloeden, kan zulk nageslacht, in feite, niet identiek zijn aan de oudercel, maar zijn nog steeds omvat binnen de omvang van de term "gastheercel" zoals hierin toegepast.

10

De term "selectieve hybridisering" hierin naar verwezen betekent detecteerbaar en specifiek te binden. Polyonucleotiden, oligonucleotiden en fragmenten daarvan volgens de uitvinding hybridiseren selectief aan nucleïne-
15 zuurstrengen onder hybridisatie- en wascondities die merkbare hoeveelheden van detecteerbare binding aan niet-specifieke nucleïnezuren minimaliseren. "Hoge stringentie" of "hoog stringente" condities kunnen worden toegepast om selectieve hybridisatiecondities zoals bekend in de kunst en hierin beschreven, te bereiken. Een voorbeeld van "hoge stringentie" of "hoog stringente" condities is een werkwijze voor incubatie van een polynucleotide met een ander polynu-
20 cleotide, waarin een polynucleotide kan worden gebonden aan een vast oppervlak zoals een membraan, in een hybridisatiebuffer van 6X SSPE of SSC, 50% formamide, 5X Denhardt's reagens, 0,5% SDS, 100 µg/ml gedenatureerd, gefragmenteerd zalm-sperma-DNA bij een hybridisatietemperatuur van 42°C gedurende 12-16 uur, gevolgd door tweemaal wassing bij 55°C onder gebruik-
25 making van een wasbuffer van 1X SSC, 0,5% SDS. Zie ook Sambrook et al., hierboven, blz. 9.50-9.55.

De term "percentage sequentie identiteit" in de context van nucleotidesequenties refereert aan de residuen in twee sequenties welke hetzelfde zijn

wanneer op een lijn gebracht voor maximale correspondentie. De lengte van sequentie identiteit vergelijking kan zijn over een lengte van ten minste ongeveer negen nucleotiden, gebruikelijk ten minste ongeveer 18 nucleotiden, meer gebruikelijk ten minste ongeveer 24 nucleotiden, typisch ten minste ongeveer 5 28 nucleotiden, meer typisch ten minste ongeveer 32 nucleotiden, en bij voorkeur ten minste ongeveer 36, 48 of meer nucleotiden. Er zijn een aantal verschillende algoritmen bekend in de kunst welke gebruikt kunnen worden om nucleotide sequentieidentiteit te meten. Bijvoorbeeld, polynucleotidesequenties kunnen worden vergeleken toepassende FASTA, Gap of Bestfit, welke pro- 10 gramma's zijn in Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys, San Diego, CA. FASTA, welk omvat, bijvoorbeeld, de programma's FASTA2 en FASTA3, verschaft alignments en percentages sequentieidentiteit van de regio's van de beste overlap tussen de gevraagde en zoeksequenties (Pearson, Methods Enzymol., 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol . Biol., 132: 185-219 (2000); 15 Pearson, Methods Enzymol., 266: 227-258 (1996); Pearson, J. Mol. Biol., 276:71-84 (1998); hierin opgenomen door referentie). Tenzij anders gespecificeerd, worden standaardwaarde-parameters voor een specifiek programma of algoritme toegepast. Bijvoorbeeld, percentage sequentieidentiteit tussen nucleotidesequenties kan worden vastgesteld gebruikmakende van FASTA met 20 zijn standaardwaarde-parameters (een woordgrootte van 6 en de NOPAM-factor voor de scoringsmatrix) of toepassende Gap met zijn standaardwaarde-parameters zoals verschaft in Wisconsin Package Version 10.3, hierin opgenomen door referentie.

25 Een referentie aan een nucleotidesequentie omvat zijn complement tenzij anders gespecificeerd. Dus, een referentie aan een nucleïnezuurmolecuul met een specifieke sequentie moet worden begrepen zijn complementaire streng te omvaten, met zijn complementaire sequentie.

In de moleculair biologische kunst, gebruiken onderzoekers de termen "percentage sequentie identiteit", "percentage sequentie similariteit" en "percentage homologie" uitwisselbaar. In deze toepassing, zullen de termen dezelfde betekenis hebben met betrekking tot nucleotidesequenties alleen.

5

De term "substantiële similariteit" of "substantiële sequentie similariteit", indien refererende aan een nucleïnezuur of fragment daarvan, geeft aan dat, wanneer optimaal op een lijn gebracht met geschikte nucleotide inserties of -deleties met een ander nucleïnezuur (of zijn complementaire streng), er een nucleotide sequentie identiteit is in ten minste ongeveer 85%, bij voorkeur ten minste ongeveer 90%, en meer geprefereerd ten minste ongeveer 95%, 96%, 97%, 98%, of 99% van de nucleotidebasen, zoals gemeten door een goed bekend algoritme van sequentie identiteit, zoals FASTA, BLAST of Gap, zoals boven beschreven.

15

Zoals toegepast voor polypeptiden, betekent de term "substantiële identiteit" dat twee peptidesequenties, wanneer optimaal op een lijn gebracht, zoals door de programma's Gap of BESTFIT standaardwaarde gap gewichten toepassende, ten minste 75% of 80% sequentieidentiteit delen, bij voorkeur ten minste 90% of 95% sequentieidentiteit, zelfs meer geprefereerd ten minste 98% of 99% sequentieidentiteit. Bij voorkeur, verschillen residu-posities die niet overeenkomen door conservatieve aminozuursubstituties. Een "conservatieve aminozuursubstitutie" is een waarin een aminozuurresidu wordt vervangen door een ander aminozuurresidu hebbende een zijketen (R-groep) met vergelijkbare chemische eigenschappen (b.v. lading of hydrofobiciteit). In het algemeen, zal een conservatieve aminozuursubstitutie de functionele eigenschappen van een eiwit niet substantieel veranderen. In gevallen waar twee of meer aminozuursequenties van elkaar verschillen door conservatieve substituties, kan het percentage sequentie identiteit of gradatie van identiteit worden aan-

25

gepast naar boven om te corrigeren voor de conservatieve natuur van de substitutie. Middelen voor het maken van deze aanpassing zijn goed bekend aan de vakman. Zie, b.v., Person, *Methods Mol. Biol.* 24:307-31 (1994), hierin opgenomen door referentie. Voorbeelden van groepen van aminozuren die zijketens hebben met vergelijkbare chemische eigenschappen omvatten 1) alifatische zijketens; glycine, alanine, valine, leucine en isoleucine; 2) alifatische hydroxylzijketens: serine en threonine; 3) amide-omvattende zijketens: asparagine en glutamine; 4) aromatische zijketens: fenylalanine, tyrosine en tryptofaan; 5) basische zijketens: lysine, arginine en histidine; en 6) zwavelomvattende zijketens zijn cysteïne en methionine. Geprefereerde conservatieve aminozuursubstitutiegroepen zijn: valine-leucine-isoleucine, fenylalanine-tyrosine, lysine-arginine, alanine-valine, glutamaat-aspartaat en asparagine-glutamine.

Alternatief, is een conservatieve vervanging een verandering met een positieve waarde in de PAM250 log-waarschijnlijkheidmatrix beschreven in Gonnet et al., *Science* 256:1443-45 (1992), hierin opgenomen door referentie. Een "gemiddeld conservatieve" vervanging is een verandering met een niet-negatieve waarde in de PAM250 log-waarschijnlijkheidsmatrix.

Sequentie similariteit voor polypeptiden wordt typisch gemeten sequentie analysesoftware toepassende. Eiwit analysesoftware vergelijkt vergelijkbare sequenties maten van gelijkenis toepassende toegekend aan verschillende substituties, deleties en andere modificaties, inclusief conservatieve aminozuursubstituties. Bijvoorbeeld, GCG omvat programma's zoals "Gap" en "BESTFIT" welke toegepast kunnen worden met standaardwaarde-parameters om sequentiehomologie of sequentieidentiteit vast te stellen tussen sterk gereslateerde polypeptiden, zoals homologe polypeptiden van verschillende soorten van organismen of tussen een wild type eiwit en een muteïne daarvan. Zie,

b.v., Wisconsin package Version 10.3. Polypeptidesequenties kunnen ook worden vergeleken tussen FASTA standaardwaarde- of geadviseerde parameters toepassende, een programma in Wisconsin package Versie 10.3 FASTA (b.v., FASTA2 en FASTA3) verschaft alignments en percentage sequentieidentiteit
5 van de regio's van de beste overlap tussen de vraag- en zoeksequenties (Pearson (1990); Pearson (2000)). Een ander geprefereerd algoritme wanneer vergelijkende een sequentie van de uitvinding met een database omvattende een groot aantal van sequenties van verschillende organismen is het computerprogramma BLAST, specifiek blastp of tblastn, standaardwaardeparameters toe-
10 passende. Zie, b.v., Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); Altschul et al. Nucleic Acids Res. 25:3389-402 (1997); hierin opgenomen door referentie.

De lengte van polypeptidesequenties vergeleken voor homologie zal in het algemeen ten minste ongeveer 16 aminozuurresiduen zijn, gewoonlijk
15 ten minste ongeveer 20 residuen, meer gebruikelijk ten minste ongeveer 24 residuen, typisch ten minste ongeveer 28 residuen, en bij voorkeur meer dan ongeveer 35 residuen. Wanneer onderzoekende een database omvattende sequenties van een groot aantal van verschillende organismen, is het geprefereerd aminozuursequenties te vergelijken.

20

Zoals hierin toegepast, refereren de termen "label" of "gelabeld" aan inbouw van een ander molecuul in het antilichaam. In één uitvoeringsvorm, is de label een detecteerbare marker, bijvoorbeeld, inbouw van een radio-gelabeld
aminozuur of verbinding aan een polypeptide of biotinyleenheden die kunnen
25 worden gedetecteerd door gemarkeerd avidine (b.v. streptavidine omvattende een fluorescente marker of enzymatische activiteit die kan worden gedetecteerd door optische of colorimetrische werkwijzen). In een andere uitvoeringsvorm, kan de label of marker therapeutisch zijn, b.v. een medicijnconjugaat of toxine. Verschillende werkwijzen van labelen van polypeptiden en glycoprote-

inen zijn bekend in de kunst en kunnen worden toegepast. Voorbeelden van labels voor polypeptiden omvatten, maar zijn niet beperkt tot, de volgende radioisotopen of radionucliden (b.v., ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), fluorescente labels (b.v., FITC, rhodamine, lanthanideforsfors), enzymatische labels (b.v. horseradishperoxidase, β -galactosidase, luciferase, alkalinefosfotase), chemoluminescente markers, biotinylgroepen, gepredetermineerde polypeptide-epitopen herkend door een secundaire reporter (b.v., leucine zipperpaarsequenties, bindingsplaatsen voor secundaire antilichamen, metaalbindingsdomeinen, epitoopt labels), magnetische agentia, zoals gadoliniumchela-

10 ten, toxinen zoals pertussis toxine, taxol, cytochalisine B, gramicidine D, ethidiumbromide, emetine, mitomycine, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicine, doxorubicine, daunorubicine, dihydroxyantracinedion, mitro-

15 troxantrone, mithramycine, actinomycine D, 1-dehydrotestosteron, glucocorticoiden, procaïne, tetracaïne, propranolol en pyromycine en analogen of homologen daarvan. In enkele uitvoeringsvormen zijn labels verbonden door spacerarmen van verschillende lengten of potentiële sterische hindering te verminderen.

De volgende voorbeelden zijn alleen voor illustratiedoeleinden en moeten niet worden geconstrueerd als beperkend voor de beschermingsomvang van de uitvinding op enige wijze.

20

Voorbeelden

25

Voorbeeld 1: Identificatie van potentiële immunogene epitopen

CD4⁺ T (Helper) celeitopen zijn kritisch in aansturing van T-celafhankelijke immuunresponsen op eiwitantigenen. Gedurende de initiatie van

een T-cel-afhankelijk immuunrespons vangen, verwerken en presenteren dendrische cellen eiwitantigeen in de vorm van lineaire polypeptiden gebonden in de groeven van MHC klasse II. Binding van de T-cel-receptor en het peptide/MHC-II-complex door naïeve CD4⁺ T-cellen kan een cascade ingang zetten

5 in welke T-cellen prolifereren, differentiëren en hulp verschaffen door costimulatoire cytokinen te produceren (b.v. IL-4, IL6) en door direct cel-cel-contact (b.v. CD40) aan B-cellen. De gecontinueerde hulp van T-cellen is vereist gedurende secundaire B-cel-lymfopoïese waarin B-cellen hun immunoglobuline ketens reorganiseren om hoog-affiniteit isotype geswitched immunoglobuline te

10 produceren tegen hetzelfde antigeen herkend door de T-cellen. Het is de binding van de B-cel-geproduceerde immunoglobulinen dat de effecten van eiwitgebaseerde therapieën kan neutraliseren. De identificatie van T-cel-epitopen omvat in therapeutische antilichamen is belangrijk in het voorspellen van immunogeniciteit in mensen. Met hun identificatie kan het gewenst zijn de

15 MHC-II-ankers te ontwerpen uit door plaatsgerichte mutagenese, genererende niet-immunogene bij elkaar gebrachte stoffen die de therapeutische activiteit van de ouder behouden.

20 Zes geheel humane anti-MAdCAM mAbs, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77,1-mod, 7.16.6 en 9.8.2 (eerder beschreven in WO2005/067620; hybridoma's uitscheidende 7.16.6 en 9.8.2 zijn gedeponeed in de Europese Collectie van Celcultures (ECACC), H.P.A in CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG op 9 september 2003 met de volgende depositnummers:

25 7.16.6: Deposit nr.: 03090909, 9.8.2: Deposit Nr: 03090912), werden onderworpen aan een *ex vivo* beoordeling om potentiële T-cel-epitopen te identificeren en hun immunogeniciteit vast te stellen. Sequentie overlappende peptiden (15 meren van zuiverheid > 90%) dekkende het framework (FR) en complementary dertermining regions (CDR's) van de zware en kappa lichte keten tegenhan-

gers van 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1, 7.16.6 en 9.8.2 werden gesynthetiseerd standaardwerkwijzen toepassende. De peptiden werden gescreend tegen een panel van 40 humane donoren in meerdere kweken van CD8⁺ T-cel uitgeputte PMSC, een bron van CD4⁺ en antigeen presenterende cellen verschaffende bij

5 fysiologische ratio's. De 40 gezonde donoren werden geselecteerd voor screening op basis van HLA-DR-typering en vertegenwoordigden >80% van de DR allelen tot expressie gebracht in de wereldpopulatie. Individuele peptiden (1 en 5 µM) werden gescreend in zesvoud, in samenhang met twee positieve controlepeptiden. Cellen werden behandeld met peptiden gedurende 7 dagen, dan

10 werd proliferatie gemeten door incorporatie van ³H-thymidine (0,5 µCi/well; 18 uren). De incorporatie van radiolabel werd vastgesteld door scintillatie telling en uitgedrukt als een stimulatieindex (SI) als volgt:

$$SI = \frac{\text{cpm van testpeptide}}{\text{Cpm van onbehandelde controle}}$$

15

Een T-cel-epitop wordt gedefinieerd als een peptide gevende een SI>2 in twee of meer onafhankelijke donoren..

20 Naast de peptide-geïnduceerde proliferatierespons, werden peptiden getest op PBMC-donoren in een ELISPOT-assay. Deze werkwijze vangt vrijgelaten cytokines en maakt quantificering van geactiveerde cellen binnen de gehele populatie mogelijk. De vrijgave van IL-2, het belangrijkste cytokine uitgescheiden door geactiveerde CD4⁺ T-cellen, werd geselecteerd om T-cel gestimuleerd door het peptide-epitop te identificeren. Zoals bij de proliferatie-assy,

25 werden donormonsters geïncubeerd met peptide gedurende 7 dagen voorafgaand aan beoordeling. Bij analyse werd iedere gestimuleerde T-cel vertegenwoordigd als een vlek van IL-2-vrijgave. Voor elke donor en peptide- (1 en 5

μM)combinatie werd het aantal van vlekken/well vastgesteld en een stimulatie-index berekend als een ratio:

$$SI = \frac{\text{vlekken/well van testpeptide}}{\text{vlekken/well van onbehandelde controle}}$$

In het algemeen zou er goede overlap in de responsen tussen de proliferatie en ELISPOT-assays geobserveerd moeten worden, hoewel verschillen in de kinetiek en grootte van responsen tussen de twee assays kunnen leiden tot enig tekort aan correlatie.

Tabel 1 beschrijft de gegevens van de T-cel-proliferatie en ELISPOT-assays. Gebaseerd op deze analyses, werden T-cel-epitopen geïdentificeerd in FR2/CDR2-regio van de 6.22.2-mod zware keten; CDR2, FR3/CDR3 en CDR3 van de kappa lichte keten van 6.34.2-mod lichte keten; FR3/CDR3 van de 6.67.1-mod kappa lichte keten; CDR3 van de 6.77.1-mod zware keten; CDR2 van de 7.16.6 zware keten en FR3/CDR3 van de 7.16.6 kappa lichte keten; en FR3/CDR3 van de 9.8.2 zware keten.

Tabel 1. De inductie van T-cel proliferatie en IL-2-productie in PBMC's van 40 gezonde vrijwilligers geïncubeerd met verschillende peptiden verkregen van de anti-MAdCAM mAbs 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod, 7.16.6 en 9.8.2. De sequenties van elk peptide zijn aangegeven, residuen welke verschillen van de oorspronkelijke sequentie zijn vetgedrukt.

Tabel 1

Anti- lichaam	Keten	Sequentie	Prolifera- tie (SI ₂)	ELISPOT (Sp-2)	
6.22.2	Zware	SGPTFSSDCMHRVQ EMVATFMYDSSKTY	2	1	
	Lichte	RASQYOSGLERKOD		1	
6.34.2	Zware	AVIEMDQEMTYADS	1		
	Lichte	ISSYLAWPQCKPKA	1		
		YLNWFOCKPKRANL	1	1	
		APKLLIYAAGLKRNG	3	1	
		LLIYAAGLERDUPS		1	
		SKLRGVPSRFSQSG	1		
		QFSDPATYTCQSYS	1		
		DFATTYCHQSYSLPV	2		
		CHQSYSLPFTFGGT	1	3	
		YSLFPFPGGTKVD		1	
6.67.1	Zware	GRITYSGGTNSPGL RDATTIIRGLIPSPF ITIRGLIPSPFTM LIPSPDYNGQTLV	1 1 1 1		
	Lichte	FPKLLIYWAHREIG	1		
		ARDVAVYPCQYYSI		1	
		VAVYPCQYYSIPPL		3	
		VPCQYYSIPPLTFC		1	
		YSIPPLTFGGTKVE	1		
	6.77.1	Zware	AVYYCARDGYSQMS RDCYRQMSYTYTYG YSSQMSYTYTYGNDV QMSYTYTYGNDVMOQ	1 1 3 4	
		Lichte	ISCKSSQRLLSQK	1	
			KARDVOVYSCMSIQ	1	
VYSCMSIQMSRFG			1		
SIQMSRFGQCKLE			1	1	
7.18.8		Zware	BVYSGWNTYAQRVQ AVYVCARQSSSSGD SGDYTYGNDVWQGT	2 1 1	
		Lichte	VEARDVOTYYCKNI	1	
			KWGTYYCKNTQIP	4	4
	GIYYCKNTQIPKTF		1	1	
	8.6.2	Zware	VAVIHYDQSNBYTAD IHYDQSNBYTADVR AEDTAVYVCARGAYH YAVYVCARGAYRFAY ARGAYH/YAYGOSTL		1 1 1 3 1
		Lichte	SIQPSDIATYSCMS	1	
PDIATYSCMSDMI			1		
IATYSCMSDNI.TPC			1		
YCDMSUNLTFQOCT			1		

Voorbeeld 2: Karakterisering van gemodificeerde varianten van 7.16.6

De T-celproliferatie en ELISPOT-analyse identificeerden een aantal potentiële T-celepitopen in de MAdCAM mAbs 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod, 7.16.6 en 9.8.2. Het belangrijkste T-celepitooop in de kappa lichte keten van 7.16.6 werd teruggebracht naar oorsprongslijn door plaatsgerichte mutagenese (QuikChange, Stratagene) volgens de instructies van de fabrikant. De sequenties van de oligonucleotiden toegepast om de gemodificeerde vormen te genereren worden beneden aangegeven: primerparen

7.16.6_V5 en 7.16.6_V3 werden toegepast om het 7.16.6_V samengevoegde product te genereren (VH=wildtype; VL=190V); 7.16.6_S5 en 7.16.6_S3 werden toegepast om het 7.16.6_S samengevoegde product te genereren (VH=wildtype; VL=N96S); 7.16.6_VS5 en 7.16.6_VS3 werden toegepast om het 7.16.6_VS samengevoegde product te genereren (VH=wildtype; VL=190V, N96S). De pEE12.1-vector omvattende het 7.16.6-zware keten cDNA (beschreven in WO2005/067620). In het kort, werd een functionele eukaryote expressievector omvattende de respectievelijke zware en lichte ketensequenties als volgt samengesteld: De zware keten cDNA-inserties werden uitgesneden uit de benodigde pEE6.1 met NotI/Sall, en de gezuiverde fragmenten werden gekloond in identieke plaatsen in de corresponderende pEE12.1-vector omvattende de benodigde versies van de kappa lichte ketensequenties.) werd toegepast als een template voor de QuikChange PCR.

7.16.6_V5 GGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGC
7.16.6_V3 GCATGCAGTAATAAACCCCAACATCCTCAGCC

7.16.6_S5 CTGCATGCAAAGTATACAGCTTCCGTGGAC
7.16.6_S3 GTCCACGGAAGCTGTATACTTTGCATGCAG

7.16.6_VS5 GGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTATACAGCTCCG
7.16.6_VS3 CGGAAGCTGTATACTTTGCATGCAGTAATAAACCCCAACATCC

pEE12.1 constructen omvattende de gemodificeerde kappa lichte ketens van 7.16.6_V, 7.16.6_S en 7.16.6_VS tezamen met de ouder 7.16.6 zware keten werden gegenereerd uit de QuikChange PCR-producten en geheel sequentie gecontroleerd. Een vergelijkbare PCR-benadering werd toegepast om de 7.16.6_L-variant te genereren (VH=V64L, VL=wildtype), onder gebruikmaking van de volgende oligonucleotiden en QuikChange PCR:

7.16.6_L5 CTATGCACAGAAGCTTCAGGGCAGAGTCAC
7.16.6_L3 GTGACTCTGCCCTGAAGCTTCTGTGCATAG

10

Ouder kappa lichte keten en 7.16.6_VS variant werden toegepast om de 7.16.6_1 en 7.16.6_LVS (VH=V64L; VL=190V, N96S) variant te genereren zoals beschreven in WO2005/067620. Recombinant materiaal werd gezuiverd door affiniteitschromatografie van FreeStyle HEK203-cellen (Invitrogen) kortstondig getransfecteerd met het geschikte construct.

15

De gezuiverde antilichamen werden onderzocht voor activiteit in een adhesie-assay MAdCAM-IgG₁ Fc fusie eiwit toepassende:

Een EcoRI/BgIII cDNA-fragment coderende voor het volwassen extracellulaire, immunoglobuline-achtige domein van MAdCAM werd uitgesneden uit een pINCY incytkloon (3279276) en gekloond in EcoRI/BamHI-plaatsen van de pIG1-vector (Simmons, D.L. (1993) in Cellular Interactions in Development; A Practical Approach, ed. Hartley, D.A (Oxford Univ. Press, Oxford), blz. 93-127.) om een in frame IgG₁ Fc fusie te genereren. De resulterende insertie werd uitgesneden met EcoRI/NotI en gekloond in pCDNA3.1+ (Invitrogen). Het MAdCAM-IgG₁ Fc cDNA in de vector werd sequentie bevestigd. De

20
25

aminozuursequentie van het MAdCAM-IgG₁ Fc-fusie eiwit wordt beneden getoond.

**MDPGLALLLAGLLGLLGGSLQVVKPLQVEPPEPVVAVALGASRQLTCRLACADRGASVQWEGLDTSLGAVQSDTGRS
VLTFRHABLSAAGFRVFCVGS CGERTFQRTVQLLVYAFPDQLTVSPAALVPGDPEVACTAHKCYTFVDFNALSPHLLVQ
GQELBQAQALGPFVQEEKEEPPQDEEDVLFKVTERRHLPFLQTFVPPALYCQATHRLPGLELSHRQATPVLEBPTSP
PFDTTSPESPDTTSPESPDTTSPESPDTTSPESPDTTSPESPDTTSPESPDTTSPESPDTTSPESPDTTSPESPDTTSP
PFIQPKSCDKTHTCTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLNI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVKNALPAP IERTI SIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATFPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRNQQGNVFSCEVMHEALNNHYTQKLSL
SPGK**

5 Onderstreept: signaalpeptide

Vetgedrukt: MAdCAM extracellulair domein

CHO-DHFR-cellen werden getransfecteerd met pCDNA3.1+-vector
omvattende MAdCAM-IgG₁ Fc-fusie eiwit cDNA en stabiele klonen MAdCAM-
10 IgG₁ Fc-eiwit tot expressie brengende geselecteerd in Iscove's medium omvat-
tende 600 µg/ml G418 en 100 ng/ml methotrexaat. Voor eiwitexpressie, werd
een holle vezel bioreactor gezaaid met stabiel tot expressie gebrachte MAd-
CAM-IgG₁ Fc CHO cellen in Iscove's medium omvattende 10% laag IgG foetaal
bovine serum (Gibco), niet essentiële aminozuren (Gibco), 2 mM glutamine
15 (Gibco), natriumpyruvaat (Gibco), 100 µg/ml G418 en 100 ng/mL methotrexaat,
en toegepast om geconcentreerd medium supernatant te genereren. Het MAd-
CAM-IgG₁ Fc fusie eiwit werd gezuiverd uit het geogoste supernatant door af-
finiteitschromatografie. In het kort, werd supernatant toegepast op een Hi-
Trap eiwit G Sefarose (5 ml, Pharmacia) kolom (2 ml/min), gewassen met 25
20 mM Tris pH8, 150 mM NaCl (5 kolomvolumes) en geëluëerd met 100 mM gly-
cine pH 2,5 (1 ml/min), direct fracties neutraliserende tot pH 7,5 met 1M Tris
pH 8. Fracties omvattende MAdCAM-IgG₁ Fc fusie-eiwit werden geïdentifi-
ceerd door SDS-PAGE, tezamen gepooled en aangebracht op een Sephacryl
S100-kolom (Pharmacia), vooraf uitgebalanceerd met 35 mM BisTris pH 6,5,
25 150 mM NaCl. De gelfiltratie werd uitgevoerd bij 0,35 ml/min, verzamelende

een piek van MAdCAM IgG₁ Fc fusie eiwit in ca. 3 x 5 ml fracties. Deze monsters werden gepooled en aangebracht op een Resource Q (6 ml, Pharmacia) kolom, vooraf uitgebalanceerd in 35 mM BisTris pH 6,5. De kolom werd gewassen met 5 kolomvolumes van 35 mM BisTris pH 6,5, 150 mM NaCl (6
 5 ml/min) en MAdCAM-IgG₁ Fc fusie eiwit geëlueerd in een 4-6 ml fractie met 35 mM BisTris pH 6,5, 400 mM NaCl. In dit stadium was het eiwit 90% zuiver en migreerde als een enkele band bij ongeveer 68 kD door SDS-PAGE. Voor toepassing als een immunogeen en alle opvolgende assays, werd het materiaal uitgewisseld door buffer in 25 mM HEPES pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT,
 10 100 mM NaCl, 50% glycerol en als aliquots bij -80°C opgeslagen.

100 µl van een 4,5 µg/ml oplossing van gezuiverd MAdCAM-IgG₁ Fc fusie eiwit in Dulbecco's PBS werd geabsorbeerd aan 96 well Black Microfluor "B" u-bodem (Dynex #7805)-platen overnacht bij 4°C. De MAdCAM gecoat
 15 platen werden dan omgekeerd en overbodig vloeistof afgevoerd, voorafgaand aan blokkeren bij 37°C gedurende ten minste 1 uur in 10% BSA/PBS. Gedurende deze tijd werden gekweekte JY-cellen geteld onder toepassing van tryptaan-blauw exclusie (moet ongeveer 8×10^5 cellen per ml zijn) en 20×10^6 cel-
 20 len/assay-plaat gepipetteerd in een 50 ml centrifugebuis. JY-cellen werden gekweekt in RPMI1640-medium (Gibco), omvattende 2 mM L-glutamine en 10% hitte-geïnactiveerd foetaal bovineserum (Life Technologies #10108-165) en gezaaid bij $1-2 \times 10^5$ /ml elke 2-3 dagen om de kweek van differentiatie af te hou-
 25 den. De cellen werden tweemaal gewassen met RPMI 1640-medium (Gibco) omvattende 2 mM L-glutamine (Gibco) door centrifugatie (240g), de uiteindelijke celpallet resuspenderende tot 2×10^6 cellen/ml in RPMI 1640 voor Calceïne AM-lading. Calceïne AM (Molecular Probes #C-3099) werd toegevoegd aan de cellen als een 1:200 verdunning in DMSO (ca. uiteindelijke concentratie 5 µM) en de cellen werden beschermd tegen licht gedurende de duur van de in-

cubatie (37°C gedurende 30 min). Gedurende deze cel incubatiestap werden de antilichamen om te testen als volgt verdund: voor enkele dosis testen, werden de antilichamen gemaakt tot 3 µg/ml (1 µg/ml uiteindelijk) in 0,1 mg/ml BSA (Sigma#A3059) in PBS; voor volledige IC₅₀-curves, werden de antilichamen
5 verdund in 0,1 mg/ml BSA/PBS, met 3 µg/ml (1 µg/ml uiteindelijk) de topconcentratie zijnde, dan verdunningen verdubbende (1:2 ratio) over de plaat. De laatste well van de rij werd toegepast voor het vaststellen van totale binding, dus 0,1 mg/ml BSA in PBS werd toegepast.

10 Na blokkering, werd de platinhoud uitgeslagen en 50 µl antilichamen/controles toegevoegd aan elke well en de plaat geïncubeerd bij 37°C gedurende 20 min. Gedurende deze tijd werden calceïne-geladen JY-cellen gewassen eenmaal met RPMI 1640-medium 10% foetaal bovineserum omvattende en eenmaal met 1 mg/ml BSA/PBS door centrifugatie, de laatste celpellet tot 1x10
15 6/ml in 1 mg/ml BSA/PBS resuspenderende. 100 µl cellen werden toegevoegd aan elke well van de U-bodemplaat, de plaat gesealed, kort gecentrifugeerd (1000 rpm gedurende 2 min) en de plaat daarna geïncubeerd bij 37°C gedurende 45 min. Aan het einde van deze tijd, werden de platen gewassen met een Skatron-plaatwasser en fluorescentie gemeten toepassende een Wallac Victor²
20 1420 multilabel reader (excitatie λ485 nm, emissie λ535 nm telling vanaf boven, 8 mm vanaf bodem van de plaat, gedurende 0,1 sec met normale emissieopening). Voor elke antilichaamconcentratie, werd percentage adhesie tot uitdrukking gebracht als een percentage van maximale fluorescentierespons in de afwezigheid van een antilichaam minus fluorescentie geassocieerd met niet-
25 specifieke binding. De IC₅₀-waarde wordt gedefinieerd als de anti-MAdCAM-antilichaamconcentratie waarbij de adhesierespons verminderd is tot 50% van de respons in de afwezigheid van anti-MAdCAM-antilichaam. Antilichamen die in staat waren de binding van JY-cellen aan MAdCAM-IgG₁ Fc fusie te in-

hiberen met een IC₅₀-waarde < 0,1 µg/ml , werden beschouwd potente antagonistactiviteit te hebben en gingen voorts naar de MAdCAM-CHO adhesieassay. De IC₅₀-waarden zijn opgesomd in tabel 2 (alle gegevenspunten gegeven in µg/ml):

5

Tabel 2. Kd-, k_a- en k_d-waarden voor de interactie van MAdCAM met het anti-MAdCAM-antilichaam 7.16.6 en 5 klonen daarvan verkregen.

* Geeft aan dat deze off rate-waarden net beneden de laagste limiet ($5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) voor BIAcore zijn. De affiniteits(KD)-waarden moeten daarom meer

10 accuraat worden geciteerd als:

<15pM ($=5 \times 10^{-6}/3.3 \times 10^5$) voor 7.16.6 en

<27.3pM ($=5 \times 10^{-6}/1.83 \times 10^5$) voor 7.16.6_V.

De off rates voor de andere vier antilichamen zijn binnen de grenzen van het instrument.

15

	Kd (pM)	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	IC ₅₀ (ng/mL)	s.d	n
7.16.6	7.3	3.3×10^5	2.42×10^{-6}	24.7	7.6	6
7.16.6_S	23.2	1.53×10^5	4.27×10^{-6}	34.2	7.4	6
7.16.6_V	162	1.53×10^5	2.49×10^{-6}	41.2	20.9	5
7.16.6_VS	90.8	2.40×10^5	2.18×10^{-6}	58.2	51.2	6
7.16.6_L	79.5	1.52×10^5	1.21×10^{-6}	35.6	10	5
7.16.6_LVS	119	1.94×10^5	2.31×10^{-6}	45.8	16.4	5

De resultaten tonen dat de varianten MAdCAM nog steeds met hoge affiniteit binden, hoog genoeg voor therapeutisch gebruik.

20

7.16.6, 7.16.6_V, 7.16.6_S, 7.16.6_VS, 7.16.6_L en 7.16.6_LVS bonden ook aan CHO-cellen MAdCAM tot expressie brengende, zoals gedetecteerd door stroom-cytometry.

25

De Kd-waarden getoond in tabel 2 werden vastgesteld door BIAcore, in essentie zoals beschreven in voorbeeld II in WO 2005/067620, met de volgende modificaties:

5 Monsterinjecties

Toegepaste stroomcellen: ofwel 2 met 1 als een referentie, of 4 met 3 als een referentie

Stroomsnelheid: 100 μ l/min

Injectietijd: 2 minuten

10 Wachten na injectie: 60 minuten (=dissociatietijd)

Injectierondes: drievoud van alle concentraties, plus zes injecties van blanco buffer

Regeneratiewerkwijze

15 Oplossing/stroomsnelheid/injectietijd:

Geïmmobiliseerd antilichaam	Regeneratieoplossing	Regeneratiestroomsnelheid, μ l/min	Injectietijd (vol)
7.16.6	50 mM fosforzuur	50	12 Seconden (10 μ l)
7.16.6_V	60 mM fosforzuur	50	54 Seconden (45 μ l)
7.16.6_S	4M magnesiumchloride	100	15 Seconden (25 μ l)
7.16.6_VS	50 mM fosforzuur	50	12 Seconden (10 μ l)
7.16.6_L	7,5 mM natriumhydroxide	50	6 Seconden (5 μ l)
7.16.6_LVS	5 mM natriumhydroxide	50	6 Seconden (5 μ l)

Stabilisatietijd na regeneratie: 5 minuten

Voorbeeld 3: Immunohistochemiekleuring van cynomolgusweefsels met varianten van 7.16.6

5 Immunohistochemie werd in essentie uitgevoerd zoals beschreven in voorbeeld III in WO 2005/067620. De resultaten zijn opgesomd in tabel 3 beneden.

Tabel 3: Samenvatting van kleuring van normale cynomolgusweefsels met anti-hMAAdCAM 1/500 verdunning (ca. 0,3 µg/ml), 1 uur incubatie bij kamertemperatuur).

Weefsel	Kleuringsintensiteit kloon 7.16.6	Kleuringspatroon	Vergelijkende intensiteit van verschillende klonen met kloon 7.16.6					
			7.16.6_LVS	7.16.6_L	7.16.6_	7.16.6_S	7.16.6_VS	Neg. controle
Positieve kleuring								
Ileum/Peyerse plaat (PP)	2-3+	HEV (PP), vasc. endotheel (lamina propria-LP)	=	>	=	=	=	<<<
Coecum	3+	Vasc. endotheel (LP)	=	=	=	=	=	<<<
Milt	2-4+	Sinus-omlijnde cellen (marginale zone van witte pulp)	<	=	=	<	<	<<<
Mesenterische lymfeknopen	4+	HEV	=	=	=	=	=	<<<
Axillaire lymfeknopen	spoor	Dendritisch-achtige cellen rond lymfoïde follikels	=	=	=	=	=	<<<
Pancreas	1+	Vasc. endotheel (venules van exocrine lobuli)	=	=	<	=	=	<<<
Negatieve kleuring								
Nier*	0	---	=	=	=	=	=	=
Hart (ventrikel)	0	---	=	=	=	=	=	=
Thyroid	0	---	=	=	=	=	=	=

5 Sterke kleuring in tubuli toe te schrijven aan niet-specifieke binding van het SEQundaire antilichaam en geïnterpreteerd als achtergrondruis.

Voorbeeld 4: Karakterisering van gemodificeerde varianten van 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1 en 9.8.2

Vergelijkbare werkwijzen toepassende als hier beschreven in voorbeeld 2 en aan gerefereerd aan WO2005/067620, werden enige van de significant potentiële T-celepitopen 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1 en 9.8.2 beschreven in tabel 1 gemodificeerd tot oorsprongslijn door substitutie of deletie om te genereren gezuiverd recombinant 6.22.2-mol_V (SEQ ID NO. 2), 6.34.2_mod_SSQ (SEQ ID NO. 8), 6.67.1-mod_Y (SEQ ID NO. 14), 6.77.1-mod_ΔAS (SEQ ID NO. 22) en 9.8.2-mod_ARGAYH,D (SEQ ID NO. 36) ketenvarianten. De IC₅₀-potenties van de volgende mAbs naar verwezen als 6.22.2-mod_V (SEQ ID NO. 2 en 4), 6.34.2_mod_SSQ (SEQ ID NOs. 6 en 8), 6.67.1-mod_Y (SEQ ID NOs. 14 en 20), 6.77.1-mod_ΔAS (SEQ ID NOs. 22 en 24) en 9.8.2-mod_ARGAYH,D (SEQ ID NOs. 36 en 38) in de MAdCAM-IgG₁ Fc fusie: JY celbindingsassay zijn gepresenteerd in tabel 4 vergeleken met hun oudertegenhanger 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1 en 9.8.2 mAbs. Alle gemodificeerde varianten behielden vergelijkbare antagonistpotentie met hun ouder mAbs.

Tabel 4. Vergelijking van IC₅₀-potenties van de 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.77.1 en 9.8.2 gemodificeerde mAbs, 6.22.2-mod_V, 6.34.2_mod_SSQ, 6.67.1-mod_Y, 6.77.1-mod_ΔAS en 9.8.2-mod_ARGAYH,D respectievelijk in de MAdCAM-IgG₁ Fc fusie: JY celbindingsassay

	IC ₅₀ (μg/mL)			IC ₅₀ (μg/mL)			
	IC ₅₀ (μg/mL)	S.D	n	IC ₅₀ (μg/mL)	S.D	n	
6.22.2	0.018	0.0109	4	6.22.2-mod_V	0.078	0.033	7
6.34.2	0.013	0.0079	4	6.34.2-mod_SSQ	0.086	0.04	11
6.67.1	0.013	0.0071	4	6.67.1-mod_Y	0.063	0.025	6
6.77.1	0.022	0.0045	4	6.77.1-mod_ΔAS	0.0485	0.0135	7
9.8.2	0.02	0.0047	4	9.8.2_ARGAYH,D	0.072	0.03	6

Sequenties:

De sequenties van de signaalpeptidesequentie (of de basen coderend voor hetzelfde) worden aangegeven in kleine letter en onderstreept. De variable regio's zijn in hoofdletters. De constante regio's zijn in hoofdletters en onderstreept in de eiwitsequenties. Vetgedrukt zijn residuen gemodificeerd van de oorspronkelijk beschreven sequenties (WO2005/067620).

SEQ ID NO: 1

6.22.2-mod_V Zwarte keten nucleotidesequentie

```

3   atggagtttg gggtgggctg ggttttctctg gttgctcttt taagaggtgt
51  ccagtgt CAG  GTCCAGCTGG  TGGAGTCTGG  GGGAGGGCTG  GTCCAGCCTG
101 GGAGGTCCCT GAGACTCTCC  TGTGCAGCGT  CTGGATTAC  CTTCACTAGC
151 GATGGCATGC ACTGGGTCCG  CCAGGCTCCA  GGCAGGGGGC  TGGAGTGGGT
201 GGCAGTGATA TGGTATGATG  GAAGTAATAA  ATATTATGCA  GACTCCGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC  AGAGACAATT  CCAAGAACAC  GCTGTATCTG
301 CAATTAACA  GCCTGAGAGC  CGAGGACACG  GCTGTATATT  ACTGTGCGAG
351 AGATCCCGGC TACTATTACG  GTATGGACGT  CTGGGGCCAA  GGGACCACGG
401 TCACCGTCTC CTCAGCTTCC  ACCAAGGGCC  CATCCGTCTT  CCCCCTGGCG
451 CCCTGCTCTA GAGGCACCTC  CGAGAGCACA  GCGGCCCTGG  GCTGCCTGGT
501 CAAGGACTAC TTCCCGAAC   CGGTGACCGT  GTCGTGGAAC  TCGAGCGCTC
551 TGACCAGCGG CGTGACACCC  TTCCAGCTG  TCCTACAGTC  CTCAGGACTC
601 TACTCCCTCA GCAGCGTGGT  GACCGTGCCC  TCCAGCAACT  TCGGCACCCA
651 GACCTACACC TGCACGCTAG  ATCACAAGCC  CAGCAACACC  AAGGTGGACA
701 AGACAGTTGA CGGCAATGT  TGTGTGAGT  GCCCACCGTG  CCCAGCACCA
751 CCTGTGGCAG GACCGTCACT  CTTCCTCTTC  CCCCCAAAC  CCAAGGACAC
801 CCTCATGATC TCCCGACCC  CTGAGGTCAC  GTGGGTGGTG  GTGGAGGTGA
851 GCCACGAAGA CCCCGAGTTC  CAGTCAACT  GGTACGTGGA  CGGCGTGGAG
901 GTGCATAATG CCAAGACAAA  GCCACGGGAG  GAGCAGTTCA  ACAGCACGTT
951 CCGTGTGGTC AGCCTCCTCA  CCGTTGTGCA  CCAGGACTGG  CTGAACGGCA
1001 AGGAGTACAA GTGCAAGGTC  TCCACCAAG  GCCTCCAGC  CCCCATCGAG
1051 AAACCATCT  CCAAAACCA  AGGCAGCCC  CGAGAACAC  AAGTGTACAC
1101 CCCGCCCCA TCCCGGAGG  AGATGACCA  GAACCAGGTC  AGCCTGACCT
1151 GCCTGGTCAA AGCCTTCTAC  CCCAGCGACA  TCGCCGTGGA  GTGGGAGGC
1201 AATGGGCAGC CGGAGAACAA  CTACAAACC  ACACCTCCCA  TCGTGGACTC
1251 CGACGGCTCC TTCTTCTCT  ACAGCAAGCT  CACCCTGGAC  AAGAGCAGGT
1301 GGCAGCAGGG GAACGTCTTC  TCTGCTCCG  TGATGCATGA  GGCTCTGCAC
1351 AACCACTACA CGCAGAGAG  CCTCTCCCTG  TCTCCGGTA  AATGATAG

```

SEQ ID NO: 2

6.22.2-mod_V Voorspelde zware keten eiwitsequentie

```

1  mefqlswvfl vallrqvqcq volvesgggv vqgrslrls caasgftfss
51  dgmhvrqap grglewvavi wydgskyya dsvkgrftis rdnskntlyl
101 qmhrlraedt avyycardpg yytgndvhwg gtvtvssas tkgpsvfpla
151 pcsrstsest aalgclvkdy fpfvvsmn sgaltsgvht fpavlaqssgl
201 yslssvvtvp ssnfgtqytt cnvdhkpsnt kvdtvkrkc cvecpfpap
251 pvagpsvflp ppkpdilmi srtpevtcvv vdvshedpev qfnwyvdgve
301 vehaktkpre hqnstfrvv svltvvhqdw lsgkykckv snkglpapir
351 ktisktkgop reppvltlpp sresntksqv sltclvkgfy psdlavewes
401 ngqpennykt tpmldsds fflyskltvd kserwoqgnvf scsvmhralh
451 nhytokslsl spxk

```

SEQ ID NO: 3

6.22.2-mod-Kappa lichte keten nucleotidesequentie

```

1  atgttgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcttc
51  caaggggtgaa attgtgctga ctcagtcctc agactttcag tcrtgactc
101 caaaagagaa agtcaccatc acctgccggg ccagtcagag aattggtagt
151 agcttacct ggtaccagca gaaaccagat cagctcctca aactcctcat
201 caagtatgct tcccagtcct tctcaggggt cccctcagag ttcagtgcca
251 gtggatctgg gacagatttc acctcacc tcaatagcct ggaagctgaa
301 gatgctgcaa cttattactg tcatcagagt ggtcgtttac cgctcacttt
351 cgccggagg accaaggtgg agatcaaacc aaactgtggct gcaccatctg
401 tcttcatctt ccccccatct gatgagcagt tgaaatctgg aaactgctct
451 gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca agttacagtg
501 gaaggtggat aaccccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agttcacag
551 agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg
601 agcaagcag actacagaa alacaaaatc tacccctggc aagtcacca
651 tcagggcctg agctgccccg tcacaaagag cttcaacag ggagagtgtt
701 agtga

```

SEQ ID NO: 4

6.22.2-mod Voorspelde kappa lichte keten aminozuursequentie

```

1  mipeqliqfl llwvpsargE ivltqspdfq svtpkekvti tcrasqrigs
51  slhnyoqkpd qspkllikya sqspgvpss fsqsgsgtdp tltinsleae
101 daatyychqs grlpltpgg tkveikrtva apsvfifpps deqlksgtas
151 vvcllnfyf rrakvqkv nalqscnsqe svteodskds tyslsstltl
201 skadyekkv yacevthqgl sspvtkspnr gbc

```

SEQ ID NO: 5

6.34.2-mod Zware keten nucleotidesequentie

```

1  atgaggtttg ggctgagctg ggttttcttc gttgctcttt taagaggtgt
51  ccagtgctcag gtgcagctgg tggagtcctg gggagggctg gtccagcctg
101 ggaggtccct gagactctcc tggcagccct ctggatcac ctccagttagc
151 tatgscatgc actgggtccg ccaggctcca gccaagggc tggagtgggt
201 ggcagttata tcaaatgatg gaataataa atactatgca gactccgtga
251 agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaaaaacac gctgtatctg
301 caantgaaca gctgogcgc tgaggacacg gctgtgtatt actgtgcbag
351 agatagtaac gcataacct actactacta cggaatggac gtctggggcc
401 aagggaccac ggtcaccgtc tcctcagctt ccaccraggg ccacatccgtc
451 ttccccctgg cggcctgctc tagaagcacc tccgagagca cagcggccct
501 gggctgctg gtcaggact acttccccga accggtagc ggtcgtgga
551 actcagggcg tcgaccagc gggctgcaca cttcccagc tgctctacag
601 tctcagggc tctactccct cagcagcgtg gtcaccgtc cctcagcaa
651 cttcggcacc cagacctaca cctgcacgt agatcacag cccagcaaca
701 ccaaggtgga cagacagtt gagcgcaat gttgtgtcga gtgcccaccg
751 tggccagcac cactgtggc aggaccgtca gtcttctct tcccccaaa
801 acccaggac accctcatga tctccggac cctgaggtc acgtgctgg
851 tggtgacgt gagccagaa gacccggag tccagttca ctggtacgtg
901 gacggcgtg aggtgcataa tgccaagaca aagccacgg aggagcagtt
951 caacagcacg ttcggtggtc tcagcgtcct caccgttctg caccaggact
1001 ggctgaacgg cagagagfac aagtgcaagg tctccaaca agcctccca
1051 gccccatcg agaaaacct ctccaaaacc aaagggcagc cccggaacc
1101 acaggtgtac accctgccc catccggga ggagatgacc aagaaccag
1151 tcagcctgac ctgctggtc aaaggcttct accccagca catgcccgtg
1201 gagtggaga gcaatggca cccggagaac aactacaaga ccacacctc
1251 catgctggac tccgaccgt cttcttct ctacagcaag ctacccgtg
1301 acaagagcag gtgacagcag ggbaacgtct tctcatgctc cgtgatgat
1351 gaggctctgc acraccta cagcagaag agcctctccc tgtctcggg
1401 taaatgatag

```

SEQ ID NO: 6

6.34.2-mod Voorspelde zware keten aminozuursequentie

```

1  mdfqlwvfl vallrgvqcq vqlvesggv vqqrslrls caasgftfss
51  ygmwvrqap gkglewvavi sndgmnkyia dsvkorftis rdnsknlyl
101  qnslraedt avyycardst aityyygmd vngqgttvv ssastkpsv
151  fplapcsrst sestaalgcl vkdyfbdvt vsmnsgalts gvhtfpavlq
201  ssglyslssv vtvfssnfgt qtytcnvdhk psntkvdktv erkcvcpp
251  cpappvagps vflfppkpd flmistrpev tcvvvdvshb dpevqfnwv
301  dgvevhnaft kpreeqfnst frvsvltvv hqowlagkby kckvsnkqlp
351  aplektiskt kqprepqvy tlpfseemt knovsltclv kfpysdlav
401  enesnoqpen nykttppml dgsfflysk ltvdksrnqq gnvfscsvni
451  ealhhhytqk slslspgk

```

SEQ ID NO: 7

6.34.2-mod_SSQ Kappa lichte keten nucleotidesequentie

```

1   atggacatga gggccccgc tcagctectg gggctectgc tactctggct
51  ccgaggtgcc agatgtGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT
101 CTGCATCTGT CCGAGACAGA GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCAGAGT
151 ATTAGTAGCT ATTTAAATG GTATCAGCAG AAACCAGGGA AAGCCCCTAA
201 GCTCCTGATC TAGCTGCAT CCGTTTGAG TCAGGGGGTC CCATCACGGT
251 TCAGTGGTAG TGGATCTGG ACAGATTCA CTCTACCAT CAGTTCTCTG
301 CAACCTGAGG ATTTGCAAC TTACTACTGT CACCAGAGTT ACAGTCTCCC
351 ATTCACTTC GGCCTGGGA CCAAAGTGA TATCAAACGA ACTGTGGCTG
401 CACCATCTGT CTTCATCTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
451 ACTGCCTCTG TTGTGTGCT GCTGAATAAC TTCTATCCA GAGAGGCCAA
501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
551 GTGTACAGA GCAGACAGC AAGGACAGCA OCTACAGCCT CAGCAGCACC
601 CTGACCTGA GCAAAGCAGA CTACAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCCCCCT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
701 GAGAGTGTTA GTGA

```

SEQ ID NO: 8

6.34.2-mod_SSQ Voorspelde kappa lichte keten eiwitsequentie

```

1   ndhrvpagll qlillwlrqa rcDIQMTQSP SLSASVGDV VITCRASQS
51  ISSYLWYQQ KPGKAPKLLI YAASLSQGV PSRFSQSGSG TDFTLTISL
101 QPEDPATYFC HQSYSLPFTY GPGTKVDIKR TAAAPSVFIF PPSDEQLKSG
151 TASVVCILNR FYPRAKVN KVDNALQSN SQESVTEQDS KDSYLSST
201 LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

```

SEQ ID NO: 9:

6.34.2-mod_QT Kappa lichte keten nucleotidesequentie

```

1   atggacatga gggccccgc tcagctectg gggctectgc tactctggct
51  ccgaggtgcc agatgtGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT
101 CTGCATCTGT CCGAGACAGA GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCAGAGT
151 ATTAGTAGCT ATTTAAATG GTATCAGCAG AAACCAGGGA AAGCCCCTAA
201 GCTCCTGATC TAGCTGCAT CCGTTTGAA GCGTGGGGTC CCATCACGGT
251 TCAGTGGTAG TGGATCTGG ACAGATTCA CTCTACCAT CAGTTCTCTG
301 CAACCTGAGG ATTTGCAAC TTACTACTGT CAGCAGAGTT ACAGTACTCC
351 ATTCACTTC GGCCTGGGA CCAAAGTGA TATCAAACGA ACTGTGGCTG
401 CACCATCTGT CTTCATCTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
451 ACTGCCTCTG TTGTGTGCT GCTGAATAAC TTCTATCCA GAGAGGCCAA
501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
551 GTGTACAGA GCAGACAGC AAGGACAGCA OCTACAGCCT CAGCAGCACC
601 CTGACCTGA GCAAAGCAGA CTACAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCCCCCT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
701 GAGAGTGTTA GTGA

```

SEQ ID NO: 10

6.34.2-mod_QT Voorspelde kappa lichte keten eiwitsequentie

```

1  mdsrvpagll gllllwlrqa rcDIQMTQSP SLSASVQDR VTITCRASQS
51 ISSYLNWYQQ KPGKAPKLLI YAASGLKRGV PSRFSGGSGG TDFTLTISLL
101 QPEDFATYYC QGSYSTPFTF GPSTKVDIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
151 TASVVCLLLN FYPFRKRVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST
201 LTLKADYER HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

```

SEQ ID NO: 11

6.34.2-mod_SSQ, QT Kappa lichte keten nucleotidesequentie

```

1  atggacatga gggtccocgc tcagctcctg gggtcctgc tactctggt
51 ccgggtgac agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt
101 ctgcactctgt gggagacmga gtcaccatca cttgccgggc aagtcagagt
151 attatagct atttamtg gtatcagcag aaaccagga aagccctaa
201 gctcctgac tatgctgcat ccagtttgag tcagggggtc ccatcacggt
251 tcagtggtag tggatctggg acagatttca ctctaccat cagttctctg
301 caacctgag atttgcmac tactactgt cagcagagt acagtactcc
351 attcacttc ggccctgga ccaaagtga tatcaaaoga actgtggctg
401 caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga
451 actgcctctg ttgtgtcct gctgaataac ttctatcca gagagccaa
501 agtacagtg aaggtgata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga
551 gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacaacct cagcagcacc
601 ctgaogctga gcraagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcca
651 agtcacccat caggccctga gctgccctgt cacaaagagc ttcaacaggg
701 gagagtotta gtga

```

SEQ ID NO: 12

6.34.2-mod_SSQ, QT Voorspelde kappa lichte keten eiwitsequentie

```

1  mdsrvpagll gllllwlrqa rcDIQMTQSP SLSASVQDR VTITCRASQS
51 ISSYLNWYQQ KPGKAPKLLI YAASSLQGV PSRFSGGSGG TDFTLTISLL
101 QPEDFATYYC QGSYSTPFTF GPSTKVDIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
151 TASVVCLLLN FYPFRKRVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST
201 LTLKADYER HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

```

SEQ ID NO: 13

6.67.1-mod Zware keten nucleotidesequentie

```

1   atgaaacacc tqtggttatt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt
51  cctgtccCAG GTGCACTOC AGGAGTCGGG CCCAGGACTG GTGAAGCCTT
101 CGGAGACCCY GTCCCTCACC TGCCTGTCT CTGGTGACTC CATCAGTAGT
151 AACTATTGGA GCTGGATCCG GCAGCCCGCC GGGAAAGGAC TGGAGTGGAT
201 TGGSCGTATC TATACCAGTG GGGGCACCAA CTCCAAACCC TCCCTCAGGG
251 GTGAGTTCAC CATGTCAATA GACAGTCCA AGAACCAGTT CTCTCTGAAA
301 CTGATTTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCC GTGTATTACT GTGCGAGAGA
351 TCGTATFACT ATAATTGCGG GACTTATTCC ATCCITCTTT GACTACTGGG
401 GCCAGGGAAC CCTGCTCACC GTCTCCTCAG CTTCCACCAA GGGCCCTCC
451 GTCTTCCCCC TGGCGCCCTG CTCTAGAAGC ACCTCCGAGA GCACAGCCGC
501 CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCTT
551 GGACTCAGG CGCTCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCTTA
601 CAITCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG
651 CAACTTCGGC ACCCAGACTT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCGACCA
701 ACACCAAGGT GGACAAGACA GTTGAGCGCA AATGTTGTGT CGAGTCCCCA
751 CCGTGCCAG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC
801 AAAACCCAAG GACACCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACTGCG
851 TGGTGGTGGG CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTAC
901 GTGGACCGCG TGGAGGTCCA TAATGCCAAG ACAAGGCCAC GGGAGGAGCA
951 GTTCACAGC ACGTTCGGTG TGGTACGGT CCTCACCGTT GTGACCAGG
1001 ACTGGCTGAA CCGCAGGAG TACAAGTCCA AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC
1051 CCGCCCCCA TCGAGAAAC CATCTCCAAA ACCAAAGGCC AGCCCGGAGA
1101 ACCCAGGTG TACACCTGC CCCCATCCG OGAGGAGATG ACCAAGAACC
1151 AGTCCAGCT GACCTGCCG GTCAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCC
1201 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCCGAG AACAATAA AGACCACACC
1251 TCCCATGCTG GACTCCGAG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCG
1301 TGGACAGAG CAGGTGCGAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
1351 CATGAGGCTC TGCACAACA CTACACGCG AAGAGCCTCT CCTCTCTCC
1401 GGTAATGA TAG

```

SEQ ID NO: 14

6.67.1-mod Voorspelde zware keten aminozuursequentie

```

1   mkhlwfflll vaaprwlslq VOLQESGPGS VKPSETLBLT CTVSGDSISS
51  NYMSWIRQPA GKOLEWIGRI YTEGGTMSNP SLRGRVIMBV DTSKMQFSLK
101 LSSVTAADTA VYCARDRIT IIRGLIPSPF DYWGQGITLVI VSSASTKSPS
151 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVEDYFPPPV TVSNHSGALT SGVHTFPAVL
201 QSSGLYSLSS VVTVPSENFQ TQTYTCNVDK KPSNTKVDKT VERKCCVECP
251 PCPAPFVAGP SVFLFPPPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH SDPEVQFNWY
301 VDGVEVHNAK TKPREQPHS TFRVVBVLTV VHQQWANGKE YKCKVSNKGL
351 PAPIKTIK TRQPRBPQV YTLFPRRBM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
401 VENEENQPE MNYKTFPML DSDGSEFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFCQVM
451 HEALHNHYTO KSLSLSPK

```

SEQ ID NO: 15

6.67.1-mod_Y Kappa lichte keten nucleotidesequentie

```

1   atggtgttgc agaccacggt cttcatttct ctggttgcctt ggatctctgq
51  tgectacggg GACATCGTGA TGACCCAGTC TCCAGACTCC CTGGCTGTGT
101 CTCTGGGCGA GAGSGCCACC ATCAACTGCA AGTCCAGCCA GAGTGTTTTA
151 TACAGCTCCA ACARETAGAA CTACTTAGCT TGGTACCAAC AGAAACCAGG
201 ACAGCCTCCT AAATTGCTCA TTEACTGGGC ATCTATAAGG GAATATGGGG
251 TCCCTGACCG ATTCAGTGGC AGCGGGTCTG GGACAGATTT CACTCTCACC
301 ATCAGCAGCC TGCAGGCTGA AGATGTGCGA GTTATTATTT GTCACAAATA
351 TTATAGTATT CCTCCCTCA CTTTCGGGGG AGGGACCAAG GTGGAGATCA
401 AACGAACTGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG
451 CAGTTGAAAT CTGGAACATC CTCTGTGTGT TGCTGCTGA ATAACTTCTA
501 TCCCGAGAG GCCAAGTAC AGTGGAAAGT GGATAACGCC CTCCAATCGG
551 GTAACTCCCA GGAGAGTGTG ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC
601 AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAACACAA
651 AGTCTACGCC TCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCGTCACAA
701 AGAGCTCAA CAGGGGAGAG TGTTACTGA

```

SEQ ID NO: 16

6.67.1-mod_Y Voorspelde kappalichte keten aminozuursequentie

```

1   mvlqtqvfi lllwiegag DIWVTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL
51  YSSNKNYLA WYQKPGOPP KLLIYWASIR EYGVDRPSG SSGTDFTLT
101 ISSLQAEVA VYTCQYYSI PPLTFGGGTK VEIKRTVAAP SVPIFPPEOE
151 QLKSGTASVY CLLNFYPRE AKVQNKVDNA LQSNBQBSV TQDSKIDSTY
201 SLSLTLTLEK ADYKHKVYA CEVTHQGLBS PVTKSPNROE C

```

SEQ ID NO: 17

6.67.1-mod_TAP Kappa lichte keten nucleotidesequentie

```

1   atggtggtgc agaccacggg ettcatttct ctggtgctct ggaatctctg
51  tgctacggg  GACATCGTGA TGACCCAGTC TCCAGACTCC CTGGCTGTGT
101 CTCTGGGCGA GAGGGCCACC ATCAACTGCA AGTCCAGCCA GAGTGTTTTA
151 TACAGCTCCA ACAATAAGAA CTACTTAGCT TGSTACCAAC AGAAACCAGG
201 ACAGCCTCCT AAATTGCTCA TTTACTGGGC ATCTATACGG GAATATGGGG
251 TCCCTGACCG ATTCAGTGGC AGCGGGTCTG GGACAGATTT CACTCTCACC
301 ATCAGCAGCC TCCAGGCTGA AGATGTGGCA GTTTATTTCT GTCAACAATA
351 TTATAGTACC CCT---CTCA CTTTCGGCGG AGGGACCAAG GTGGAGATCA
401 AACGACTGT  GGCTGCACCA TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG
451 CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG TGCTGCTGA ATAACCTCTA
501 TCCAGAGAG  GGCNAGTTC AGTGGAGGTT GGATAACGCC CTCCAATCGG
551 GTAACCTCCA GGAGAGTGTG ACNAGGCRGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC
601 AGCCTCAGCA GCACCTGAC  GCTGAGCAA GCAGACTACG AGAAACACAA
651 AGTCTACGC  TCGGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA
701 AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TTTTAGTGA

```

SEQ ID NO: 18

6.67.1-mod_TAP Voorspelde kappa lichte keten aminozuursequentie

```

1   mvltqvfls llwlggnyg DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL
51  YSSMKNYLA WYQQRPGQPF KLLIYNASIR EYGVDFRFSQ SGSOTDPTLT
101 ISSLQAEVVA VYFCQYYST P-LTFGGGTK VEIKRTVAAP SVFIFPPSDE
151 QLKSGTASVV CLLNNYPRE AKVOMKVDNA LOSGNSQESV TEOGSKDSTY
201 SLSTLTLEK ADYEKIKVYA CEVTHQGLS FVTKSFMRGE C

```

SEQ ID NO: 19

6.67.1-mod_Y,TΔP Kappa lichte keten nucleotidesequentie

```

1   atggtggtgc agaccaggt ctccatttct ctggtgctct ggtatctctg
51  tgccctacggh GACATCGTGA TGACCCAGTC TCCAGACTCC CTGGCTGTGT
101 ctctgggoga GAGGGCCACC ATCBACTGCA AGTCCAGCCA GAGTGTTTTA
151 TACAGCTCCA ACAATAAGAA CTACTTAGCT TGGTACCAC AGAAACCAGG
201 ACAGCCTCCT AAATTGCTCA TTTACTGGGC ATCTATACGG GAATATGGGG
251 TCCCTGACCG ATTCACTGGC AGCGGGTCTG GGACAGATTT CACTCTCAOC
301 ATCAGCAGCC TGCAGGCTGA AGATGTGGCA GTTTATTATT GTCAACAATA
351 TTATGTACC CCT---CTCA CTTTCGGCGG AGGGACCAAG GTGGAGATCA
401 AACGAACTGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG
451 CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTGTG TGCTGTCTGA ATAACTTCTA
501 TCCAGAGAG GCCAAGTAC AGTGGAGGT GGATAAGCC CTCCAATCGG
551 GTAAGTCCA GGAGAGTGT ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC
601 AGCCTCAGCA GCACCTGAC GCTGAGCAA GCAGACTAAG ABAACACAA
651 AGTCTACGCC TGCAGGTCA CCCATCAGG CCTGAGCTGG CCGTCACAA
701 AGAGCTTCAA CAGGGGAGG TGTTAGTGA

```

SEQ ID NO: 20

6.67.1-mod_Y,TΔP Voorspelde kapa lichte keten aminozuursequentie

```

1   mvlqtqvfi lllwiegayg DIVMTQSPDS LAVSLGRAT INCKSSQSVL
51  YSEKIKNYLA WYQKPOQP KLLIYNASIR EYGVPRFSG SSGTDFTLT
101 ISSLQAEVA VYCCQYYS P-LTFGGTK VEIKRTVAAP SVFIPPPSDE
151 QLKSGTASV CLLNIFYPRE ARVQWKVDNA LQGNSSQESV TRQDSKDSY
201 SLGSTITLSE ADYEKKKYA CEVTKOGLSE PVTKSYNRGE C

```

SEQ ID NO: 21

6.77.1-mod_ΔS Zware keten nucleotidesequentie

```

1  atggaactgg ggtccgctg ggttttcett gttgctattt tagaaggtag
51  ccagtgtgag gtgcagctgg tggagctcgg gggaggcctg gtcraagcctg
101  ggggtccct gagactctcc tggcagcct ctggattcac cttcagtagc
151  tttagcatga actgggtccg ccaggctcca gggaggggc tggagtggt
201  ttcatocatt agtagtagta gtattacat atactacgca gactcagtga
251  agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaggaactc actgtatctg
301  caaatgaca gctgagagc cgaggacacg cctgtgtatt actgtgagc
351  agatgggtat agcagtggtt gg---tacta ctactactac ggtatgagc
401  tctggggcca agggaccacg gtcaccgtct cctcagcttc caccragggc
451  ccatccgtct tcccctggc gccctgctct agaagcactt ccgagagcac
501  agcggccctg gctgctcgg tcaaggacta cttcccoga cccgtgacgg
551  gtctctgaa ctcaggcct ctgaccagcg gctgacac cttcccagct
601  gtcctacagt ctcaggact cfactccctc agcagcgtgg tgaccctgcc
651  ctccagcaac ttggcacc ccagctacac ctgcaacgta gatcacaagc
701  ccagcaacac caaggctgac aagacagttg agcccaatg ttgtctcgag
751  tgcccaaccg gccagcacc acctgtggca gacccctcag tcttctctt
801  cccccaaaa cccaggaca cctcatgat ctcccgacc cctgaggtca
851  cgtgctggt ggtgagctg agccacgaag acccogagt ccagttcaac
901  tggtagctg acggctgga gctgcataat gccagacaa agccacgga
951  ggagcagttc aacagcagct tccgtgtgtt cagcctctc accctgtgc
1001  accaggaact gctgacggc aaggagtaca agtgcagggt ctccaacaa
1051  ggcctcccag ccccatoga gaaaaccatc tccaaaacca aaggccagcc
1101  ccagaaacca caggtgtaca cctgcccccc atcccggag gagatgacca
1151  agaaccaggt cagcctgacc tgcctgtca aaggctcta ccccagcagc
1201  atcccgctg agtgagagc caatggcag cccgagaca actacaagc
1251  cacacctccc atgctgact ccagcgcct cttcttctc tagcagac
1301  tcacgtgga caagacagc tggcagcag ggaacctct ctcagctcc
1351  gtgatgatg aggtctgca caaccactac accgagaaga gcctctccct
1401  gtcctccggt aatgatag

```

SEQ ID NO: 22

6.77.1-mod_ΔS Voorspelde zware keten eiwitsequentie

```

1  melqirvfl vaileqvqk volvesgggl vkpggslrls caagcftfss
51  ymrvrqap gkglewvssi ssssyiyya dsvkrptis rdhaknsllyl
101  qmvlrabdt avyycardgy ssgn-yyyy ghdvwgqgt vtvssastkg
151  psvfplapcs rstsestlaal gclvkdypfe pvtvswnsa ltsgvrtfpa
201  vlqssglysl svvtvpsn fgtqyttcv dhkpsntkvd ktverkkcvb
251  cfpcpappva qpsvplfpe kptlmiert pevctvvdv shedfevqfn
301  wyvdevevhn aktkrbbqf nstprvsvl tvvhqdlng keykckvsnr
351  glppliekti sktrqprep qvylpvrk bmtknqvslt clvkrfyps
401  iavewsnq pbnyktp mlodgspfl yskltvksr wqgnvpscs
451  vmhealhmhy tqkslsfpg k

```

SEQ ID NO: 23

6.77.1-mod Kappa lichte keten nucleotidesequentie

```

1   atgaggctcc ctgctcaggt cctgggggtg ctaatsctct ggataacctgg
51  atccagtgca GATATTGTA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CTCCGGACA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA AGTCTAGTCA GAGCCTOCTG
151 CTTAGTGTG GAAAGACCTA TTTGAATTGG TACCTGCAGA AGCCCGGCCA
201 GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGAAGTTTC CAACCGGTTT TCTGGAGTGC
251 CAGACAGTT CAGTGGCAGC GGTCAGGGA CAGATTTTCA ACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTTGGGOTT TATTACTGCA TCCAAAGTAT
351 ACAGCTTATG TGCAGTTTTG GCCAGGGGAC CAAGCTGGAG ATCAAAGGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTTATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAATTG
451 AAATCTGAAA CTGCCTCTGT TGTGTGCTTG CTGATAACT TCTATOCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGTAACT
551 CCCGGAGAG TGTACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA
651 CGCCTGGAAA GTCACCCATC AGGCTCTGAG CTGCCCCGTC ACAAAGAGCT
701 TCAACAGGGG AGAGTGTTAG TGA

```

SEQ ID NO: 24

6.77.1-mod Voorspelde kappa lichte keten aminozuursequentie

```

1   nrtpaqllql lmlvipgssa DIVHTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLI
51  LSDGKTYLW YIQKPGQPPQ LLIYEVSNRF SGVDFRFSOS GSGLDFLKI
101 SRVREADVGV YSCMQSIQLM SSFGGQTKLE IKRTVAAPSV PIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LHNFYPREAK VQNKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSYYEL
201 SSLLTLEKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSPNRGEC

```

SEQ ID NO: 25

7.16.6 Zware keten nucleotidesequentie

```

1   atggaactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcag caacaggtgc
51  caactcccaG GTTCAGCTGG TGCAGTCTGG AGCTGAGGTG AAGAAGCCTG
101 GGGCTCAGT GAAGGTCTCC TGCAGGCTT CTGGTTACAC CTTTACCAGC
151 TATGGTATCA ACTGGGTGCC ACAGGCCCTT GGACAAAGGC TTGAGTGGAT
201 GGGATGGATC AGCGTTTACA GTGGTAACAC AACTATGCA CAGAAGGTCC
251 AGGCAGAGT CACCATGACC GCAGACACAT CCAAGAGCAC AGCCTACATG
301 GACCTGAGGA GCCTGAGATC TGACGACACG GCGGTGTATT ACTGTCCGAG
351 AGAGGTAGC AGCTCGTCCG GAGACTACTA TTAAGGTATG GACGTCTGGG
401 GCCAAGGGAC CACGGTCACC GTCTCCTCAG CCTCCACCA/ GGGCCCATCG
451 GTCTTCCCCC TGGCCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGGGC
501 CTTGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACCGTGTGTF
551 GGAAGTCAAG CGCTCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCTTA
601 CAGTCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG
651 CAAGTCCGGC ACCCAGACTT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCACGCA
701 ACACCAAGGT GGACAGACA GTTGAGGCGA AATGTTGTTT CGAGTGCCCA
751 CCGTCCCGAG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCCC
801 AAAACCCAAG GACACCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACGTGGC
851 TGGTGGTGGG CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAAGTGGTAC
901 GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAGGCCAC GGGAGGAGCA
951 GTTCAACAGC ACGTTCGGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTT GTGCACCAGG
1001 ACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTCA AGGTCTCCAA CAAAGGCCCTC
1051 CCAGCCCCCA TCBAGAAAC CATCTCCAAA ACCAAAGGGC AGCCCCGAGA
1101 ACCACAGGTG TACACCTGTC CCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACC
1151 AGTTCAGCCT GACCTGCTTG GTCAAAAGCT TCTACCCAG CGACATGGC
1201 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACACC
1251 TCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCG
1301 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCGGTGTG
1351 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACAGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC
1401 GGGTAAATGA

```

SEQ ID NO: 26

7.16.6 Voorspelde zware keten eiwitsequentie

```

1   mdwtwsilf1 vaastgahsq VQLVQSGARV KKPQASVKVS CKASQYTFTS
51  YGINWVRQAP GQGLEWGGHI SVYSGNTNYA QKVVQGRVTMT ADTSTSTAYM
101 DLRSLSDDT AVYYCAREGS SSSGDYYTGM DWVQGGTIVI YSSASTKGPS
151 VFPLAPCSRS TSESTAALC LVKDYFPEPV TVSMNSGALT SGVRTFFPAVL
201 QSSGLYSLS VTVPSSEFG TQTYTCNVQH KPSWTKVDKT VERKCCVECP
251 PCPAPPVAGP SVFLFPPKPK DTLMIERTPE VTCVVVDVSH SDPEVQFNHY
301 VDG'EVHNAK TKPRRQFNS TFRVVSVLTV VHQDMLNGRE YRCKVSNKGL
351 PAPIERTISK TKGQPREPQV YTLPPSRREM TRNQVSLTCL VIGFYPSDIA
401 VVESNQPE NBYKTTPEML DSDGSEFLYS KLTVDKSRNQ QGNVFSQSVN
451 REALHNHYTQ KLSLSFGK

```

SEQ ID NO: 27

7.16.6_L Zware keten nucleotidesequentie

```

1  atggactgga cctggaagcat cctttttcttg gtggcaagag caacaggtgc
51  caatctccCAG GTTCAGCTGG TGCGTCTGG AGCTGAGGTG AAGAAGCCTG
101  GGGCCTCAGT GAAGGTCTCC TGCAGGCTT CTGGTTACAC CTTTACCAGC
151  TATGTTATCA ACTGGGTGGG ACAGGCCCCC GGACAAGGGC TTGAGTGGAT
201  GGGATGGATC AGCGTTTACA GTGTTAACAC AAACATGCA CAGTAGCTTC
251  AGGCGAGGT CACCATGACC GCAGACACT CCACGAGCAC AGCCTACATG
301  GACCTGAGGA GCTGAGATC TGACBACAG GCCGTGTATT ACTGTGGAG
351  AGAGGTTAGC AGCTGGTCCG GAGACTACTA TTAAGGTATG GACGTCTGGG
401  GCCAAGGGAC CACGGTCACC GTCTCCTCAG CCTOCACCAA GGGCCCATCG
451  GTCTTCCCCC TGGGGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGGGGC
501  CCTGGGCTGC CTGGTCAAG ACTACTTCCC GGAACCGGTG ACGGTGTGTT
551  GAACTCAGG CGCTCTGACC AGGGGGGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCTTA
501  CAGTCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG
651  CAACTCGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCA
701  ACACCAAGGT GGACAGACA GTTGAGGSCA AATGTTGTGT CGAGTGCCCA
751  CGGTGCCCGG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCCC
801  AAAACCCAG GACACCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCAGGTGGG
851  TGGTGGTGGG CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTAC
901  GTGGACGGCG TGGAGGTCCA TAATGCCAAG ACAAGGCCAC GGGAGGAGCA
951  GTTCACAGC ACGTTCGGT TGGTCAGCGT CCTCACCGTT TGACACCAAG
1001  ACTGCTGAA CGGCAAGGGG TACAAGTGCA AGGTCTCAA CAAGGCCTC
1051  CCGCCCCCA TCGAGAAAC CATCTCCAA ACCAAGGGC AGCCCCGAGA
1101  ACCCAGGTG TACACCCTGC CCCCCTCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACC
1151  AGGTACGCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCCG CGACATGGCC
1201  GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACACC
1251  TCCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCG
1301  TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
1352  CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACAGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC
1401  GGATAAATGA

```

SEQ ID NO: 28

7.16.6_L Voorspelde zware keten eiwitsequentie

```

1  mdetwajlf1 vaaatgahsQ VQLVQSGAEV KRPGASVKVS CKASGYTFTS
51  YGINWVRQAF GQGLSMGNI SVYSGNTNYA QKLQQRVIMT ADTGTSTAYM
101  DLRLSRSDDT AVYYCAREGS SSSGYYTGM DVMGQGTIVT VSSASTKGPS
151  VFPLAPCSRK TRSTAAALGC LVDYFFPEPV TVSHNSGALT SGVITFFAVL
201  QSSGLYSLSE VVIYPSSENG TQTTCTVDH KPSNTRVDKT VERKCCVECP
251  PCPAPFVAGF SVPLFPKPK DTLNISRTPE VTCVVVDVSH BDPHYQFNWY
301  VDGVEVHNAK TKPREHGFNS TFRVVSVLTV VEQDNLNQRS YKCKVSNKEL
351  PAPIKTIISK TGGPREPOV YLPPSRERM TKNQVSLTCL VEGYPSDIA
401  VENEGQPB ENYKTPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVYSCSVH
452  HEALHNYTQ KSLSLSPK

```

SEQ ID NO: 29

7.16.6_V Kappa lichte keten nucleotidesequentie

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg
51  atccagtgca GATATTGGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CCCTGGACA GCCGGCCTCC ATCTCTGCA AGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CTA CTACTGATG GAAAGACCTA TTTGTAATTGG TA CCTG CAGA AGCCAGGCCA
201 GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGAAGTTTC CAACCGGTTT TCTGAGTGC
251 CAGATGGTTC CAGTGGCAGC GGTTCAGGGA CAGATTTCAC ACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTGGGGTT TATTACTGCA TGCAAATAT
351 ACAGCTTCCG TGGACCTTCG GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAACGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG
451 AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTCCCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGGG AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGTA ACT
551 CCCAGGAGAG TGTACAGAG CAGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACCC TGACCTGAG CAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAGTCTA
651 CGCTGGGAA GTCACCCATC AGGCCCTGAG CTCGCCCTC ACAAGAGCT
701 TCAACAGGGG AGAGTOTTAG TGA

```

SEQ ID NO: 30

7.16.6_V Voorspelde kappa lichte keten eiwitsequentie

```

1   mrllpaqlgl lmlwipgssa DIWMTQPLS LSVTRGQPAS ISCKSSQSLI
51  HTDQTTYLYW YLQKPGQPPQ LLIYEVENRF SGVPDRFSGS GGTDFTLKI
101 SRVRAEDVGV YTCMQNIQLP HTPGQTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQSSVTE QDEKDSYSL
201 SSITLTKAD YEKHKVYACE VTHQQLSSPV TRKFNROEC

```

SEQ ID NO: 31

7.16.6_S Kappa lichte keten nucleotidesequentie

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctantgctct ggataacctgg
51  atccagctga GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CCOCTGGACA GCOGGCTCC ATCTCCTGCA AGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CATACTGATG GAACGACCTA TTGTATTTGG TACCTGCAGA AGCCAGGCCA
201 GCCTCACAG CTCTGATCT ATGAAGTTC CAACCGTTC TCTGGAGTGC
251 CAGTAGGTT CAGTGCAGC GGATCAGGA CAGATTTCAC ACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGG TGTGGGATP TATTACTGCA TGCAAAGTAT
351 ACAGCTTCGG TGGAGTTCS GCCAAGGAC CAAGGTGGAA ATCAAACGAA
401 CTGTGCTGC ACCATCTGC TTCATCTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTC
451 AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGA AGGTGGATA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT
551 CCCAGCAGAG TGTACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACC CTACGCTGAG CAAGCAGAC TACGAGAAC ACAAGTCTA
651 CGCTGGGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCTC ACAAGAGCT
701 TCACAGGGG AGAGTGTAG TGA

```

SEQ ID NO: 32

7.16.6_S Voorspelde kappa lichte keten eiwitsequentie

```

1   mrtpaqllgl lmlwipgssa DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL
51  HTDGTTYLYW YLQKPGQPPQ LLIYEVSNERF SGVPDRFSGS GSOTDFTLKI
101 SRVEAEDVGI YYCHQSIQLP WTPGQSTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYFREAK VQNKVDNALQ SGNISQESVTE QDSKDSYSL
201 SSTLLSKAD YEKIKVYACE VTHQGLSSPV TRSFNRGEC

```

SEQ ID NO: 33

7.16.6_VS Kappa lichte keten nucleotidesequentie

```

1   atggggctcc ctgctcagct cctggggttg ctaatgctct ggatacctgg
51  atccagtgca GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CCCTGGACA GCGGCTCC ATCTCTGCA AGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CACTGTATG GAAGACCTA TTTGTTTGG TACCTGCAGA AGCCAGGCCA
201 GCTCCACAG CTCTGATCT ATGAAGTTT CAACCGGTTT TCTGGAGTGC
251 CAGTAGGTT CAGTGGCAGC GGGTCAGGA CAGATTTAC ACTGAAAATC
301 AGCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTGGGGTT TATTACTGCA TGCAAAGTAT
351 ACAGCTTCCG TGGACGTTCC GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAACGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTC OCCATCTGA TGAGCAGTTG
451 AAATCTGGAA CTGCTCTGT TGTGTGCTG CTGAATAACT TCIATCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGA AGGTGGATAA CGCCCTCAA TCGGTAATC
551 CCCAGAGAG TGTACAGAG CAGGACAGCA AGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACC TGACGCTGAG CAAGCAGAC TAGGAGAAAC ACAAGTCTA
651 CCGCTGGAA GTCACCCATC AGGGCTGAG CTGCCCCTC ACAAGAGCT
701 TCAACAGGG AGAGTGTTAG TGA

```

SEQ ID NO: 34

7.16.6_VS Voorspelde kappa lichte keten eiwitsequentie

```

1   arlpagllgl lmlwipgsaa DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLI
51  HTDGTFLYN YLQKPGQFPQ LLIYEVSRRF SGVPDRFSGS QSGTDFTLKI
101 SRVRAEDVGV YYCHQSIQLP WTFGQGTKE IKRTVAAPSV FIFPPSEDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDESTYEL
201 SSITLISKAD YRKHVYACK VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

```

SEQ ID NO: 35

9.8.2_ARGAYH, D Zware keten nucleotidesequentie

```

1   atggagtttg ggtcggctg gttttcctc gttgctottt taagaggtgt
51   ccagtgctcg gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcctg gtccagcctg
101  ggaggtccct gagactctcc tgtcagcgtt ctggattcac cttcagtagc
151  tatggcatgc actgggtccg ccagcctcca ggcaaggggc tggagtgggt
201  ggcagttata tggtatgatg gaagtaatga atactatgca gactccgtga
251  agggccgatt caccatctcc agagacraat ocagAACAC GCTGTATCTG
301  caaatgaaca gcctgagagc csagAACACG GCTGTATAT ACTGTGCG--
351  ----- ---TTTgact actgggcca ggaacccctg gtcaccgtct
401  cctcagcttc caccagggc ccattcgtct tccccctggc gccctgctcc
451  aggagcactt ccgagAACAC agcccccctg gctgctctgg tcaaggacta
501  cttccccgaa ccggtgagcg tttcctggaa ctcagccccc ctgaccagcg
551  ggtgcacac cttccccgct gtctacagt cctcagactt ctactccctc
601  agcagcgtgg tgaccctgct ctccagcagc ttgggcacga agacctacac
651  ctgcacgta gattcagcag ccagAACAC caaggtgagc aagagagttg
701  agtccraata tgggtccccA tggccatcat gccagcacc ttagttcctg
751  ggggaccat cagtcttctt gttcccccca aaaccAAG ACACTCTCAT
801  gatctccgg acccctgagg tcactgctgt ggtgctgac gtgagccag
851  aagaccucca ggtccagttc aactgctacc tggatggctt ggaggtgcat
901  aatgccaga caagccccc ggaagAACAG ttaacagca cgtaccgtgt
951  ggtcagcgtc ctcaccctcc tgaccagga ctggctgac gccagagagt
1001 acagtccaa ggtctccAAC aaggccctcc cgtcctccat cgagaaacc
1051 atctccaaag ccaagAACCA gccccagagc ccacaggtt acaccctgcc
1101 cccrccccg gaggagtga ccaagAACCA ggtcagcctg acctgcctgg
1151 tcraagcctt ctaccccac gacatgccc tggagtggga gacraatggg
1201 cagcccgaga acaactaca gaccagcctt cccgtgctgg actccgacgg
1251 ctctctctc ctctacagca ggctaacctt ggacagagc aggtgacag
1301 aggggaatgt cttctcagc tccgtgatgc atgagcctct gcacaaccac
1351 tacacacaga agagcctctc cctgtctctg ggtAAATGA

```

SEQ ID NO: 36

9.8.2_ARGAYH, D Voorspelde zware keten eiwitsequentie

```

1   nefqlswvl vallrvqc0 VOLVESGGGV VQGRSLRLS CAASGFTVSS
51   YQSHVROAP GKGLEAVAVI WYDGSNEYFA DSVKGRFTIS RDNKNTLYL
101  QNLSLAEDT AVYYCA---- -FDYWGQTL VIVSEASTKG PSVPLAPCS
151  NSTSSTAAL GCLVKDYFPE FVTVEWESGA LTRGVHTFPA VLOSSGLYSL
201  SEVTVPSSE LQTKYTCNV DHRPSHTKVD KRVEKYGPP CPSCPAPEFL
251  GGPVFLFPP KPEDLALSR TPEVTCVVVD VQEDDEVDQF RMYVDGVEVH
301  NAKTKPREEQ FNSTYRVSV LTVLHQDWLN GKBYKCKVEN KQLPSSIEKT
351  ISKIQQPRE EQYTLPPSQ RENTKQVSL TCLVKQPYPS DIAVWESNG
401  QPEHWYKTFP FVLDSGSEFP LYSRLTVDRS RNQEGNVFSC SVMRALHNN
451  YTRSLSLSL GK

```

SEQ ID NO: 37

9.8.2_mod Kappa lichte keten nucleotidesequentie

```

1   atggacatga gggccctgc tcagctcctg gggcctcctg tgctctggct
51  ctccgtcggc ggtgccagat gtgacatcca gatgaccag  tctccatcct
101 cctgtctgc atctgtagga gacabagtca ccactacttg ccaggcgagt
151 caggacatta gcaactattt aaattggtat cagcagaaac cagggaaagc
201 cccrtagctc ctgactcagc atgcatcaa tttggaaaca ggggtcccat
251 caagttcag tggagtga tctgggacag attttacttt caccatcagc
301 agoctgcagc ctgaagatat tgcaacatat tcctgtcaac actctgataa
351 tctatcacc ttcggccagg ggacacgact ggagattaaa cgaactgtgg
401 ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct
451 ggaactgctt ctgttgggtg cctgctgaat aacttctatc ccaggagggc
501 caagtacag tggaggtgg ataacgccc ccaatcgggt aactcccagg
551 agatgtcac agagcaggac ascaaggaca gcacctacag cctcagcagc
601 accctgaccg tggcaggcc agactaccag aaacraaag tctaogcctg
651 cgaatcacc catcaggccc ttagctcgcc cgtcacaag agcttcaaca
701 gggagagtg ttagtga

```

SEQ ID NO: 38

9.8.2_mod Voorspelde kappa lichte keten eiwitsequentie

```

1   mdrvpagll qllllwlava garcDIQMTQ SPSSLASVG DRVTTCQAS
51  QDISHYLNWY QOKPKAPKL LIYDASNLET GVPSPSGGG SGTDFPTIS
101 SLOPHDIATY SCQHSNLIY FQQTRLEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS
151 GTASVCLLN NPYPRAKVQ NKVDNALQSG NSQSSVTBQD SKDSTYSLSS
201 TLTLEKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC

```

Conclusies

1. Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of anti-geen bindend gedeelte daarvan, geselecteerd uit de groep bestaande uit:
- (a) een antilichaam omvattende de variabele regio van de zware keten van
5 6.22.2-mod_V (SEQ ID NO: 2);
- (b) een antilichaam omvattende de variabele regio van de lichte keten van
6.34.2-mod_SSQ, 6.34.2-mod_QT, of 6.34.2-mod_SSQ,QT (SEQ ID NOs.: 8, 10,
12);
- (c) een antilichaam omvattende de variabele regio van de lichte keten van
10 6.67.1-mod_Y, 6.67.1-mod_TAP, of 6.67.1-mod_Y,TAP (SEQ ID NOs.: 16, 18,
20);
- (d) een antilichaam omvattende de variabele regio van de zware keten van
6.77.1-mod_ΔS (SEQ ID NO: 22);
- (e) een antilichaam omvattende de variabele regio van de zware keten van
15 7.16.6_L (SEQ ID NO: 28); of
- (f) een antilichaam omvattende de variabele regio van de lichte keten van
7.16.6_V, 7.16.6_S of 7.16.6_VS (SEQ ID NOs: 30, 32, 34);
- (g) een antilichaam omvattende de variabele regio van de lichte keten
7.16.6_V, 7.16.6_S of 7.16.6_VS (SEQ ID NOs: 30, 32, 34) en de variabele regio
20 van de zware keten van 7.16.6_L (SEQ ID NO: 28); of
- (h) een antilichaam omvattende de variabele regio van de zware keten van
9.8.2_ARGAYH,D (SEQ ID NO: 36).
- (i) een antilichaam omvattende de variabele regio van de lichte keten van
9.8.2-mod (SEQ ID NO: 38).
- 25
2. Het antilichaam of gedeelte volgens conclusie 1, geselecteerd uit de groep bestaande uit:

1032132

- (a) een antilichaam omvattende de variabele regio's gecodeerd door de nucleïnezuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 3;
- (b) een antilichaam omvattende de variabele regio's gecodeerd door de nucleïnezuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 5 en SEQ ID NOs: 7, 9 of 11;
- 5 (c) een antilichaam omvattende de variabele regio's gecodeerd door de nucleïnezuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 13 en SEQ ID NOs: 15, 17 of 19;
- (d) een antilichaam omvattende de variabele regio's gecodeerd door de nucleïnezuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 21 en SEQ ID NO: 23;
- 10 (e) een antilichaam omvattende de variabele regio's gecodeerd door de nucleïnezuursequenties uiteengezet in SEQ ID NOs: 25 of 27 en SEQ ID NOs: 29, 31 of 33; of
- (f) een antilichaam omvattende de variabele regio's gecodeerd door de nucleïnezuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 35 en SEQ ID NO: 37.

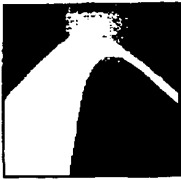
15

3. Het monoklonaal antilichaam of gedeelte volgens conclusie 1 of conclusie 2, waarin het antilichaam is geselecteerd uit de groep bestaande uit:

- (a) een antilichaam omvattende de variabele regio's van de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 2 en SEQ ID NO: 4, zonder de signaalsequenties;
- 20 (b) een antilichaam omvattende de variabele regio's van de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 6 en SEQ ID NOs: 8, 10, of 12, zonder de signaalsequenties;
- (c) een antilichaam omvattende de variabele regio's van de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 14 en SEQ ID NOs: 16, 18, of 20, zonder de signaalsequenties;
- 25 (d) een antilichaam omvattende de variabele regio's van de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 22 en SEQ ID NO: 24, zonder de signaalsequenties;

- (e) een antilichaam omvattende de variabele regio's van de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NOs: 26 of 28 en SEQ ID NOs: 30, 32 of 34, zonder de signaalsequenties; of
- (f) een antilichaam omvattende de variabele regio's van de aminozuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 36 en SEQ ID NO: 38, zonder de signaalsequenties.
- 5
4. Het antilichaam of gedeelte volgens een van conclusies 1-3, geselecteerd uit de groep bestaande uit:
- 10 (a) een antilichaam gecodeerd door de nucleïnezuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 3;
- (b) een antilichaam gecodeerd door de nucleïnezuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 5 en SEQ ID NOs: 7, 9 of 11;
- (c) een antilichaam gecodeerd door de nucleïnezuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 13 en SEQ ID NOs: 15, 17, of 19;
- 15 (d) een antilichaam gecodeerd door de nucleïnezuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 21 en SEQ ID NO: 23;
- (e) een antilichaam gecodeerd door de nucleïnezuursequenties uiteengezet in SEQ ID NOs: 25 of 27 en SEQ ID NOs: 29, 31, of 33; of
- 20 (f) een antilichaam gecodeerd door de nucleïnezuursequenties uiteengezet in SEQ ID NO: 35 en SEQ ID NO: 37.
5. Een monoklonaal antilichaam of gedeelte van een van conclusies 1-4, waarin het zware keten C-terminale lysine is gekliefd.
- 25
6. Toepassing van het antilichaam of antigeen-bindende gedeelte van een van conclusies 1-5 als een medicament.

7. Toepassing van het antilichaam van een van conclusies 1-5 voor de vervaardiging van een medicament voor de behandeling van een ziekte die MAdCAM-gemedieerde adhesie van leukocyten met zich meebrengt.
- 5 8. De toepassing van conclusie 7, waarin de ziekte een inflammatoire ziekte is.
9. De toepassing van conclusie 7, waarin de ziekte is geselecteerd uit inflammatoire bowel disease, leverfibrose, graft-versus-host-ziekte, uveïtis, encefalitis, insuline-afhankelijke diabetes.
- 10 10. De toepassing van conclusie 9, waarin inflammatoire bowel disease de ziekte van Crohn of ulceratieve colitis is.
- 15 11. Een farmaceutische samenstelling omvattende het antilichaam of antigeen-bindende gedeelte van een van conclusies 1-5 en een farmaceutisch acceptabele drager of excipiënt.
12. Een werkwijze voor behandeling van inflammatoire ziekte in een patiënt die het nodig heeft, omvattende de stap van het toedienen aan genoemde patiënt van het monoklonale antilichaam of antigeen-bindende gedeelte daarvan volgens een van conclusies 1-5.
- 20



**RAPPORT BETREFFENDE HET ONDERZOEK
NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK**

Octroolaanvraag Nr.:

NO 135771
NL 1032132

VAN BELANG ZIJNDE LITERATUUR

Categorie	Vermelding van literatuur met aanduiding voor zover nodig, van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie(s)Nr.:	Internationale classificatie
	<p>EENHEID VAN UITVINDING ONTBREEKT zie aanvullingsblad B ONVOLLEDIG ONDERZOEK zie aanvullingsblad C</p>		<p>INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P37/00</p>
D,X	<p>WO 96/24673 A (LEUKOSITE INC [US]; BRISKIN MICHAEL J [US]; RINGLER DOUGLAS J [US]; PI) 15 augustus 1996 (1996-08-15) * het gehele document *</p>	1-12	<p>Onderzochte gebieden van de techniek</p> <p>C07K A61K A61P</p>
X	<p>WO 99/58573 A (GENENTECH INC [US]) 18 november 1999 (1999-11-18) * het gehele document *</p>	1-12	
X,D	<p>WO 01/78779 A2 (MILLENNIUM PHARM INC [US]; GENENTECH INC [US]; BRETTMAN LEE R [US]; FO) 25 oktober 2001 (2001-10-25) * bladzijde 2, regel 21 - bladzijde 3, regel 19 * * bladzijde 9, regel 25 - regel 31 * * bladzijde 23, regel 15 - regel 24 *</p>	1-12	
X	<p>LEUNG EUPHEMIA ET AL: "Bioassay detects soluble MAdCAM-1 in body fluids" IMMUNOLOGY AND CELL BIOLOGY, deel 82, nr. 4, augustus 2004 (2004-08), bladzijden 400-409, XP002417044 ISSN: 0818-9641 * het gehele document *</p>	1-5,11	
P,X, D	<p>NL 1 027 975 C2 (PFIZER [US]; ABGENIX INC [US]; PFIZER LTD [GB]; PULLEN NICHOLAS [GB];) 23 december 2005 (2005-12-23) * het gehele document *</p>	1-12	
A	<p>US 2004/010810 A1 (KUCHERLAPATI RAJU [US] ET AL) 15 januari 2004 (2004-01-15) * het gehele document *</p>	1-5	

Indien gewijzigde conclusies zijn ingediend, heeft dit rapport betrekking op de conclusies ingediend op :

3

Plaats van onderzoek 's-Gravenhage	Datum waarop het onderzoek werd voltooid 20 Maart 2007	Vooronderzoeker (EOB) Luyten, Kattie
--	--	--

CATEGORIE VAN DE VERMELDE LITERATUUR

- X: op zichzelf van bijzonder belang
- Y: van bijzonder belang in samenhang met andere documenten van dezelfde categorie
- A: achtergrond van de stand van de techniek
- O: verwijzend naar niet op schrift gestelde van de techniek
- P: literatuur gepubliceerd tussen voorrang- en indieningsdatum

- T: niet tijdig gepubliceerde literatuur over theorie of principe ten grondslag liggend aan de uitvinding
- E: andere octrooipublicatie maar gepubliceerd op of na indieningsdatum
- D: in de aanvraag genoemd
- L: om andere redenen vermelde literatuur
- &: lid van dezelfde octroofamilie, corresponderende literatuur document

EOB FORM 02.83 (P0414)



**RAPPORT BETREFFENDE HET ONDERZOEK
NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK**

Octrooiaanvraag Nr.:
NO 135771
NL 1032132

VAN BELANG ZIJNDE LITERATUUR

Categorie	Vermelding van literatuur met aanduiding voor zover nodig, van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie(s)Nr.:	Internationale classificatie
A	<p>TANGRI SHABNAM ET AL: "Rationally engineered therapeutic proteins with reduced immunogenicity." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 15 MAR 2005, deel 174, nr. 6, 15 maart 2005 (2005-03-15), bladzijden 3187-3196, XP002417364 ISSN: 0022-1767 * het gehele document *</p>	1-5	
P,A	<p>DE GROOT A S ET AL: "De-immunization of therapeutic proteins by T-cell epitope modification." DEVELOPMENTS IN BIOLOGICALS 2005, deel 122, 2005, bladzijden 171-194, XP008074262 ISSN: 1424-6074 * het gehele document *</p>	1-5	
			Onderzochte gebieden van de techniek
Indien gewijzigde conclusies zijn ingediend, heeft dit rapport betrekking op de conclusies ingediend op :			

3 Plaats van onderzoek 's-Gravenhage	Datum waarop het onderzoek werd voltooid 20 Maart 2007	Vooronderzoeker (EOB) Luyten, Kattie
---	--	--

<p>CATEGORIE VAN DE VERMELDE LITERATUUR</p> <p>X : op zichzelf van bijzonder belang Y : van bijzonder belang in samenhang met andere documenten van dezelfde categorie A : achtergrond van de stand van de techniek O : verwijzend naar niet op schrift gestelde van de techniek P : literatuur gepubliceerd tussen voorrangs- en indieningsdatum</p>	<p>T : niet tijdig gepubliceerde literatuur over theorie of principe ten grondslag liggend aan de uitvinding E : andere octrooipublicatie maar gepubliceerd op of na indieningsdatum D : in de aanvraag genoemd L : om andere redenen vermelde literatuur & : lid van dezelfde octrooifamilie, corresponderende literatuur document</p>
--	---

EOB FORM 02 B3 (P0414)

**ONVOLLEDIG ONDERZOEK
AANVULLINGSBLAD C**

Octrooiaanvraag Nr.:

NO 135771
NL 1032132

Ofschoon de conclusies 6 en 12 gericht zijn op een methode voor het therapeutisch behandelen van het menselijk of dierlijk lichaam, is het vooronderzoek uitgevoerd op basis van de veronderstelde werking van de verbinding/samenstelling.

AANVULLINGSBLAD B

De Instantie voor Nieuwheidsonderzoek heeft vastgesteld dat deze aanvraag meerdere uitvindingen bevat, te weten:

1. conclusies: 1a, 2a, 3a, 4a (geheel) en 5-12 (gedeeltelijk).

Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of anti-geen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de zware keten van 6.22.2-mod_V (SEQ ID NO: 2); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

2. conclusies: 1b, 2b, 3b, 4b en 5-12 (gedeeltelijk).

Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van 6.34.2-mod_SSQ (SEQ ID NO: 8); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

3. conclusies: 1b, 2b, 3b, 4b en 5-12 (gedeeltelijk).

Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van 6.34.2-mod_QT (SEQ ID NO: 10); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

4. conclusies: 1b, 2b, 3b, 4b en 5-12 (gedeeltelijk).

Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van 6.34.2-mod_SSQ,QT (SEQ ID NO: 12); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

5. conclusies: 1c, 2c, 3c, 4c en 5-12 (gedeeltelijk).

Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van 6.67.1-mod_Y (SEQ ID NO: 16); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

6. conclusies: 1c, 2c, 3c, 4c en 5-12 (gedeeltelijk).

AANVULLINGSBLAD B

De Instantie voor Nieuwheidsonderzoek heeft vastgesteld dat deze aanvraag meerdere uitvindingen bevat, te weten:

Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van 6.67.1-mod_TdeltaP (SEQ ID NO: 18); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

7. conclusies: 1c, 2c, 3c, 4c en 5-12 (gedeeltelijk).

Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van 6.67.1-mod_Y,TdeltaP (SEQ ID NO: 20); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

8. conclusies: 1d, 2d, 3d, 4d (geheel) en 5-12 (gedeeltelijk).

Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de zware keten van 6.77.1-mod_ S (SEQ ID NO: 22); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

9. conclusies: 1e (geheel) en 1g, 2e, 3e, 4e, 5-12 (gedeeltelijk).

Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de zware keten van 7.16.6-mod_L (SEQ ID NO: 28); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

10. conclusies: 1f, 1g, 2e, 3e, 4e en 5-12 (gedeeltelijk).

Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van 7.16.6-mod_V (SEQ ID NO: 30); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

11. conclusies: 1f, 1g, 2e, 3e, 4e en 5-12 (gedeeltelijk).

Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van 7.16.6-mod_S (SEQ ID NO: 32); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

AANVULLINGSBLAD B

De instantie voor Nieuwheidsonderzoek heeft vastgesteld dat deze aanvraag meerdere uitvindingen bevat, te weten:

12. conclusies: 1f, 1g, 2e, 3e, 4e en 5-12 (gedeeltelijk).

Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van 7.16.6-mod_VS (SEQ ID NO: 34); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

13. conclusies: 1h (geheel) en 2f, 3f, 4f, 5-12 (gedeeltelijk).

Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de zware keten van 9.8.2_ RGAYH,D (SEQ ID NO: 36); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

14. conclusies: 1i (geheel) en 2f, 3f, 4f, 5-12 (gedeeltelijk).

Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van 9.8.2-mod (SEQ ID NO: 38); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

Het vooronderzoek werd tot het eerste onderwerp beperkt.



DOSSIER NUMMER NO135771	INDIENINGSDATUM 07.07.2006	VOORRANGSDATUM 08.07.2005	AANVRAAGNUMMER NL1032132
CLASSIFICATIE INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P37/00			
AANVRAGER Pfizer Limited te Sandwich, Groot-Brittannië (GB)			

Deze schriftelijke opinie bevat een toelichting op de volgende onderdelen:

- Onderdeel I Basis van de schriftelijke opinie
- Onderdeel II Voorrang
- Onderdeel III Vaststelling nieuwheid, inventiviteit en industriële toepasbaarheid niet mogelijk
- Onderdeel IV De aanvraag heeft betrekking op meer dan één uitvinding
- Onderdeel V Gemotiveerde verklaring ten aanzien van nieuwheid, inventiviteit en industriële toepasbaarheid
- Onderdeel VI Andere geciteerde documenten
- Onderdeel VII Overige gebreken
- Onderdeel VIII Overige opmerkingen

	DE BEVOEGDE AMBTENAAR Luyten, Kattie
--	---

Onderdeel I Basis van de Schriftelijke Opinie

1. Deze schriftelijke opinie is opgesteld op basis van de meest recente conclusies ingediend voor aanvang van het onderzoek.
2. Met betrekking tot **nucleotide en/of aminozuur sequenties** die genoemd worden in de aanvraag en relevant zijn voor de uitvinding zoals beschreven in de conclusies, is dit onderzoek gedaan op basis van:
 - a. type materiaal:
 - sequentie opsomming
 - tabel met betrekking tot de sequentie lijst
 - b. vorm van het materiaal:
 - op papier
 - in elektronische vorm
 - c. moment van indiening/aanlevering:
 - opgenomen in de aanvraag zoals ingediend
 - samen met de aanvraag elektronisch ingediend
 - later aangeleverd voor het onderzoek
3. In geval er meer dan één versie of kopie van een sequentie opsomming of tabel met betrekking op een sequentie is ingediend of aangeleverd, zijn de benodigde verklaringen ingediend dat de informatie in de latere of additionele kopieën identiek is aan de aanvraag zoals ingediend of niet meer informatie bevatten dan de aanvraag zoals oorspronkelijk werd ingediend.
4. Overige opmerkingen:

Onderdeel III Vaststelling nieuwheid, inventiviteit en industriële toepasbaarheid niet mogelijk

De vraag of de uitvinding in de aanvraag nieuw, inventief en industrieel toepasbaar is, wordt niet behandeld in deze schriftelijke opinie met betrekking tot:

- de gehele aanvraag
- conclusies 1b-i, 2b-f, 3b-f, 4b-f (all completely) and 5-12 (all partially); 6 and 12 (with respect to industrial applicability)

omdat:

- deze aanvraag of deze conclusies 6 and 12 (with respect to industrial applicability), betrekking hebben op materie waarvoor het niet zinvol is een schriftelijke opinie op te stellen.

Zie aparte bladzijde

- de beschrijving, figuren of deze conclusies , , zo onduidelijk zijn dat het niet zinvol is een schriftelijke opinie op te stellen.
- deze conclusies , onvoldoende steun vinden in de beschrijving waardoor het niet zinvol is een schriftelijke opinie op te stellen.
- geen onderzoek naar de stand van de techniek is uitgevoerd voor deze conclusies 1b-i, 2b-f, 3b-f, 4b-f (all completely) and 5-12 (all partially).
- een zinvolle schriftelijke opinie niet opgesteld kon worden omdat de sequentie opsomming niet beschikbaar was in het juiste formaat, of in het geheel niet beschikbaar was (WIPO ST25).
- een zinvolle schriftelijke opinie niet opgesteld kon worden zonder de tabellen met betrekking tot de sequentie opsommingen; of deze tabellen waren niet beschikbaar in elektronische vorm.
- Zie aparte bladzijde

Onderdeel IV De aanvraag heeft betrekking op meer dan één uitvinding

1. Vastgesteld is dat de octrooiaanvraag betrekking heeft op meer dan één uitvinding.

Zie aparte bladzijde

2. Het onderzoek naar de stand van de techniek is beperkt tot de eerstgenoemde uitvinding in de conclusies en betreft:
 - alle conclusies
 - conclusies: (zie nieuwheidsrapport)

SCHRIFTELIJKE OPINIE

Onderdeel V Gemotiveerde verklaring ten aanzien van nieuwheid, inventiviteit en industriële toepasbaarheid

1. Verklaring

Nieuwheid	Ja: Conclusies 1a, 2a, 3a, 4a, 5-12 Nee: Conclusies
Inventiviteit	Ja: Conclusies Nee: Conclusies 1a, 2a, 3a, 4a, 5-12
Industriële toepasbaarheid	Ja: Conclusies 1a, 2a, 3a, 4a, 5, 7-11 Nee: Conclusies

2. Citaties en toelichting:

Zie aparte bladzijde

Onderdeel VI Andere geciteerde documenten

Andere geciteerde openbaarmakingen

Zie aparte bladzijde

Niet schriftelijke openbaarmakingen

Onderdeel VIII Overige opmerkingen

De volgende opmerkingen met betrekking tot de duidelijkheid van de conclusies, beschrijving, en figuren, of met betrekking tot de vraag of de conclusies nawerkbaar zijn, worden gemaakt:

Zie aparte bladzijde

SECTION III

Claims 6 and 12 relate to a method of treatment of the human or animal body by surgery or therapy. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims.

SECTION IV

UNITY

The present application lacks unity for the following reasons:

The technical problem to be solved by the present application is to provide anti-MAdCAM antibodies which are less immunogenic than murine anti-MAdCAM antibodies when used in humans.

The proposed solutions are:

- I Claims 1a, 2a, 3a, 4a (all completely) and 5-12 (all partially):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de zware keten van 6.22.2-mod_V (SEQ ID NO: 2); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- II Claims 1b, 2b, 3b, 4b (all completely) and 5-12 (all partially):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van 6.34.2-mod_SSQ (SEQ ID NO: 8); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- III Claims 1b, 2b, 3b, 4b (all completely) and 5-12 (all partially):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van 6.34.2-mod_QT (SEQ ID NO: 10); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- IV Claims 1b, 2b, 3b, 4b (all completely) and 5-12 (all partially):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van

6.34.2-mod_SSQ,QT (SEQ ID NO: 12); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

- V Claims 1c, 2c, 3c, 4c (all completely) and 5-12 (all partially):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van 6.67.1-mod_Y (SEQ ID NO: 16); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- VI Claims 1c, 2c, 3c, 4c (all completely) and 5-12 (all partially):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van 6.67.1-mod_TΔP (SEQ ID NO: 18); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- VII Claims 1c, 2c, 3c, 4c (all completely) and 5-12 (all partially):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van 6.67.1-mod_Y,TΔP (SEQ ID NO: 20); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- VIII Claims 1d, 2d, 3d, 4d (all completely) and 5-12 (all partially):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de zware keten van 6.77.1-mod_ΔS (SEQ ID NO: 22); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- IX Claims 1e (completely) and 1g, 2e, 3e, 4e, 5-12 (all partially):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de zware keten van 7.16.6-mod_L (SEQ ID NO: 28); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- X Claims 1f, 1g, 2e, 3e, 4e and 5-12 (all partially):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van 7.16.6-mod_V (SEQ ID NO: 30); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- XI Claims 1f, 1g, 2e, 3e, 4e and 5-12 (all partially):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van

7.16.6-mod_S (SEQ ID NO: 32); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

XII Claims 1f, 1g, 2e, 3e, 4e and 5-12 (all partially):

Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van 7.16.6-mod_VS (SEQ ID NO: 34); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

XIII Claims 1h (completely) and 2f, 3f, 4f, 5-12 (all partially):

Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de zware keten van 9.8.2_ΔRGAYH,D (SEQ ID NO: 36); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

XIV Claims 1i (completely) and 2f, 3f, 4f, 5-12 (all partially):

Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variable regio van de lichte keten van 9.8.2-mod (SEQ ID NO: 38); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

To solve the problem of immunogenicity the application provides human monoclonal anti-human MAdCAM antibodies, whereas the prior art (D1 to D3) discloses murine or rabbit monoclonal anti-human MAdCAM monoclonal antibodies. Thus, the present antibodies differ from the prior art antibodies in that they are human antibodies. However, "human antibodies" cannot be considered as a special technical feature, since it is within the common knowledge of the skilled person that human antibodies are less immunogenic than murine antibodies when used in human, and the production of human antibodies to a known antigen is a routine procedure. Moreover, D4 already mentions the medical use of human anti-MAdCAM antibodies and further mentions that human antibodies can be produced by using transgenic animals or phage display. The different entities do not have another special technical feature in common. Hence, the subject-matter of the claims is not so linked as to form a single inventive concept and defines 14 different inventions. Only the first invention has been searched, and therefore, also the present opinion is limited to the first invention.

SECTION V

1 PRIOR ART

1.1 Reference is made to the following documents:

D1: WO 96/24673 A (LEUKOSITE INC [US]; BRISKIN MICHAEL J [US]; RINGLER DOUGLAS J [US]; PI) 15 August 1996 (1996-08-15) (cited in the application)

D2: WO 99/58573 A (GENENTECH INC [US]) 18 November 1999 (1999-11-18)

D3: LEUNG EUPHEMIA ET AL: "Bioassay detects soluble MAdCAM-1 in body fluids" IMMUNOLOGY AND CELL BIOLOGY, vol. 82, no. 4, August 2004 (2004-08), pages 400-409, XP002417044 ISSN: 0818-9641

D4: WO 01/78779 A2 (MILLENNIUM PHARM INC [US]; GENENTECH INC [US]; BRETTMAN LEE R [US]; FO) 25 October 2001 (2001-10-25) (cited in the application)

1.2 Document D1 discloses murine monoclonal anti-human MAdCAM antibodies (Example 2) and the use of these antibodies to inhibit cell adhesion in vitro. D1 further discloses the therapeutic use of anti-mouse MAdCAM antibodies in a murine colitis model (whole document).

1.3 Document D2 discloses rabbit monoclonal anti-human MAdCAM (amino acid residues 1-567) antibodies and the use of said antibodies in immunohistochemistry. D2 further claims anti-MAdCAM antibodies for treating hepatic disorders (whole document).

1.4 Document D3 discloses murine monoclonal anti-human MAdCAM antibodies. Said antibodies block T-cell adhesion in vitro (whole document).

1.5 Document D4 relates to the treatment of a disease associated with leukocyte infiltration of mucosal tissues, e.g. inflammatory bowel disease (page 2, line 21 - page 3 line 19). D4 mentions the use of human anti-human MAdCAM-1 antibodies in said treatment (page 23, lines 15-24) and indicates how human antibodies can be produced (page 9, lines 25-31).

2 NOVELTY

2.1 None of the cited documents discloses an anti-MAdCAM antibody comprising the variable region of SEQ ID NO: 2, therefore the subject-matter of claims 1a, 2a, 3a, 4a (all completely) and 5-12 (all partially) is novel over the cited prior art.

3 INVENTIVE STEP

3.1 Document D1 is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claims 1a-4a and 5-12.

3.2 Claims 1a-4a and 6-12 differ from document D1 in that the anti-MAdCAM antibody is a human antibody and not a murine antibody. The effect of the difference is that the human antibodies are expected to be less immunogenic than murine antibodies when used in human. The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as to provide anti-MAdCAM antibodies which are less immunogenic than murine antibodies when used in humans. It falls, however, within the general knowledge of the person skilled in the art to prepare and use human antibodies for the treatment of humans. Furthermore, document D4 already suggests to use human anti-MAdCAM antibodies for treating inflammatory bowel disease and indicates how to prepare human antibodies. Therefore, the preparation and medical use of human anti-human MAdCAM monoclonal antibodies does not involve an inventive step. The present application aims at providing modified human anti-MAdCAM antibodies which are even less immunogenic than the unmodified human antibodies. However, there is no comparative technical evidence in the application that shows that the modified antibodies are indeed less immunogenic or that the present antibodies have another unexpected effect. Therefore, the present antibodies do not show a surprising effect and the claimed solutions are mere arbitrary solutions which do not involve an inventive step.

3.3 The dependent claim 5 does not appear to contain any additional features which in combination with the features of claim 1 involve an inventive step as the relevant subject matter falls within the knowledge and ability of the skilled person.

3.4 Thus, the present application does not meet the criteria of patentability, because the subject-matter of claims 1a-4a and 5-12 does not involve an inventive step.

4 INDUSTRIAL APPLICABILITY

4.1 Claims 6 and 12 relate to a method of treatment of the human/animal body by surgery/therapy. Consequently, their subject-matter is not susceptible of industrial application. Claims to a 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 (claims 7-10) may be allowed.

SECTION VI

The examination has been based on the assumption that the claimed priority is valid for all claims. However, if this is not the case, then the following document would become relevant for claims 1-12:

WO 2005/067620 A2 (PFIZER [US]; ABGENIX INC [US]; PFIZER LTD [GB]; PULLEN NICHOLAS [GB];) 28 July 2005 (2005-07-28)

SECTION VIII

1 CLARITY AND SUPPORT

1.1 The heavy chain in claim 1 is not clearly defined since it is only defined by an internal designation. The corresponding SEQ ID NO is provided within parentheses and is therefore only optional and not limiting the scope of the claims. To render

claim 1 clear, the parentheses should be removed.

- 1.2 The therapeutic application in the medical use claim 7 is functionally defined by a mechanism of action which does not allow any practical application in the form of a defined, real treatment of a pathological condition. Since the disease to be treated is not clearly defined, claim 7 lacks clarity.
- 1.3 Thus, claims 1 and 7 are not clear.

DEEL III

De conclusies 6 en 12 betreffen een chirurgische of therapeutische behandelingsmethode van het menselijk of dierlijk lichaam. Dientengevolge wordt geen opinie gegeven met betrekking tot de industriële toepasbaarheid van de materie van deze conclusies.

DEEL IV

EENHEID

Onderhavige uitvinding ontbeert eenheid om de volgende redenen:

Het door onderhavige aanvraag op te lossen technische probleem is het voorzien in anti-MAdCAM antilichamen die bij gebruik bij de mens minder immunogeen zijn dan de muriene anti-MAdCAM antilichamen.

De voorgestelde oplossingen zijn:

- I De conclusies 1a, 2a, 3a, 4a (alle volledig) en 5-12 (alle gedeeltelijk):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variabele regio van de zware keten van 6.22.2-mod_V (SEQ ID NO: 2); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- II De conclusies 1b, 2b, 3b, 4b (alle volledig) en 5-12 (alle gedeeltelijk):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variabele regio van de lichte keten van 6.34.2-mod_SSQ (SEQ ID NO: 8); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- III De conclusies 1b, 2b, 3b, 4b (alle volledig) en 5-12 (alle gedeeltelijk):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variabele regio van de lichte keten van 6.34.2-mod_QT (SEQ ID NO: 10); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- IV De conclusies 1b, 2b, 3b, 4b (alle volledig) en 5-12 (alle gedeeltelijk):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variabele regio van de lichte keten van 6.34.2-mod_SSQ,QT (SEQ ID NO: 12); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

- V De conclusies 1c, 2c, 3c, 4c (alle volledig) en 5-12 (alle gedeeltelijk):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variabele regio van de lichte keten van 6.67.1-mod_Y (SEQ ID NO: 16); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- VI De conclusies 1c, 2c, 3c, 4c (alle volledig) en 5-12 (alle gedeeltelijk):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variabele regio van de lichte keten van 6.67.1-mod_TΔP (SEQ ID NO: 18); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- VII De conclusies 1c, 2c, 3c, 4c (alle volledig) en 5-12 (alle gedeeltelijk):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variabele regio van de lichte keten van 6.67.1-mod_TΔP (SEQ ID NO: 20); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- VIII De conclusies 1d, 2d, 3d, 4d (alle volledig) en 5-12 (alle gedeeltelijk):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variabele regio van de zware keten van 6.77.1-mod_ΔS (SEQ ID NO: 22); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- IX De conclusies 1e (volledig) en 1g, 2e, 3e, 4e, 5-12 (alle gedeeltelijk):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variabele regio van de zware keten van 7.16.6-mod_L (SEQ ID NO: 28); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- X De conclusies 1f, 1g, 2e, 3e, 4e en 5-12 (alle gedeeltelijk):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variabele regio van de lichte keten van 7.16.6-mod_V (SEQ ID NO: 30); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- XI De conclusies 1f, 1g, 2e, 3e, 4e en 5-12 (alle gedeeltelijk):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variabele regio van de lichte keten van 7.16.6-mod_S (SEQ ID NO: 32); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.
- XII De conclusies 1f, 1g, 2e, 3e, 4e en 5-12 (alle gedeeltelijk):
Een monoklonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variabele regio van de lichte keten van 7.16.6-

mod_VS (SEQ ID NO: 34); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

XIII De conclusies 1h (volledig) en 2f, 3f, 4f, 5-12 (alle gedeeltelijk):

Een monokonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variabele regio van de zware keten van 9.8.2._ΔRGAYH,D (SEQ ID NO: 36); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

XIV De conclusies 1i (volledig) en 2f, 3f, 4f, 5-12 (alle gedeeltelijk):

Een monokonaal antilichaam dat specifiek MAdCAM bindt, of antigeen bindend gedeelte daarvan, omvattende de variabele regio van de lichte keten van 9.8.2.-mod (SEQ ID NO: 38); de medische toepassing van dit antilichaam en een farmaceutische samenstelling omvattende dit antilichaam.

Om het probleem van de immunogeniteit op te lossen voorziet de aanvraag in menselijke monoklonale antimenselijke anti-MAdCAM antilichamen, terwijl de stand van de techniek (D1 – D3) muriene of konijnmonoklonale antimenselijke anti-MAdCAM antilichamen openbaart. Derhalve verschillen onderhavige antilichamen in zoverre van antilichamen volgens de stand van de techniek dat dit menselijke antilichamen zijn. "Menselijke antilichamen" kunnen echter niet als een specifiek technisch kenmerk worden beschouwd, aangezien het voor deskundigen algemeen bekend is dat menselijke antilichamen minder immunogeen zijn dan muriene antilichamen wanneer deze bij mensen worden gebruikt, en de productie van menselijke antilichamen tot een bekend antigeen een routineprocedure is. Bovendien vermeldt D4 reeds het medisch gebruik van menselijke anti-MAdCAM antilichamen en vermeldt voorts dat menselijke antilichamen kunnen worden geproduceerd met behulp van transgene dieren of faagweergave. De verschillende entiteiten hebben geen ander specifiek technisch kenmerk gemeen. Derhalve is de materie van de conclusies niet zodanig gekoppeld dat dit één inventief concept vormt en definieert 14 verschillende uitvindingen. Uitsluitend de eerste uitvinding is doorzocht, waardoor onderhavige opinie zich beperkt tot de eerste uitvinding.

DEEL V

1 STAND VAN DE TECHNIEK

1.1 Er wordt verwezen naar de volgende documenten:

D1: WO 96/24673 A (LEUKOSITE INC [US]; BRISKIN MICHAEL J [US]; RINGLER

- DOUGLAS J [US]; PI) 15 augustus 1996 (1996-08-15) (genoemd in de aanvraag)
- D2: WO 99/58573 A (GENENTECH INC [US]) 18 november 1999 (1999-11-18)
- D3: LEUNG EUPHEMIA ET AL: "Bioassay detects soluble MAdCAM-1 in body fluids" IMMUNOLOGY AND CELL BIOLOGY, vol. 82, no. 4, augustus 2004 (2004-08), pagina's 400-409, XP002417044 ISSN: 0818-9641
- D4: WO 01/78779 A2 (MILLENIUM PHARM INC [US]; GENENTECH INC [US]; BRETTMAN LEE R [US]; FO) 25 oktober 2001 (2001-10-25) (genoemd in de aanvraag)

- 1.2 Document D1 openbaart muriene monoklonale antimenselijke anti-MAdCAM antilichamen (Voorbeeld 2) en het gebruik van deze antilichamen om celadhesie in vitro te remmen. Voorts openbaart D1 het therapeutisch gebruik van antimuis antilichamen in een murien colitismodel (gehele document).
- 1.3 Document D2 openbaart konijn monoklonale antimenselijk anti-MAdCAM (aminozuurresiduen 1-567) antilichamen en het gebruik van genoemde antilichamen binnen de immunohistoscheikunde. Voorts openbaart D2 anti-MAdCAM antilichamen voor het behandelen van hepatische stoornissen (gehele document).
- 1.4 Document D3 openbaart muriene monoklonale antimenselijke MAdCAM antilichamen. Genoemde antilichamen blokkeren T-celadhesie in vitro (gehele document).
- 1.5 Document D4 betreft de behandeling van een ziekte in verband met de infiltratie van leukocyten van slijmvliesweefsel, bv. een intestinale ontstekingsziekte (pagina 2, regel 21 – pagina 3, regel 19). D4 vermeldt het gebruik van menselijke anti-MAdCAM-1 antilichamen in genoemde behandeling (pagina 23, regels 15-24) en geeft aan hoe menselijke antilichamen geproduceerd kunnen worden (pagina 9, regels 25-31).

2 NIEUWHEID

- 2.1 Geen van genoemde documenten openbaart een anti-MAdCAM antilichaam omvattende de variabele regio van SEQ ID NO: 2, derhalve is de materie van de conclusies 1a, 2a, 3a, 4a (alle volledig) en 5-12 (alle gedeeltelijk) nieuw ten opzichte van genoemde stand van de techniek.

3 INVENTIVITEIT

- 3.1 Document D1 wordt beschouwd als de stand van de techniek die de materie van de conclusies 1a-4a en 5-12 het dichtst benadert.
- 3.2 De conclusies 1a-4a en 6-12 verschillen in zoverre van document D1 dat het anti-MAdCAM antilichaam een menselijk antilichaam en geen murien antilichaam is. Het gevolg van het verschil is dat de menselijke antilichamen bij gebruik bij de mens naar verwachting minder immunogeen zijn dan muriene antilichamen. Het door onderhavige uitvinding op te lossen probleem kan derhalve worden beschouwd als het voorzien in anti-MAdCAM antilichamen die bij gebruik bij de mens minder immunogeen zijn dan muriene antilichamen. Voor deskundigen valt echter het bereiden en gebruiken van menselijke antilichamen voor de behandeling van mensen binnen de algemeen kennis. Voorts stelt document D4 reeds voor menselijke anti-MAdCAM antilichamen te gebruiken voor de behandeling van intestinale ontstekingsziekten en geeft aan hoe deze menselijke antilichamen te bereiden. Derhalve behelst het bereiden en het medisch gebruik van menselijke anti-MAdCAM monoklonale antilichamen geen inventiviteit. Onderhavige aanvraag beoogt te voorzien in gemodificeerde menselijke anti-MAdCAM antilichamen die nog minder immunogeen zijn dan de niet-gemodificeerde menselijke antilichamen. De aanvraag vermeldt echter geen vergelijkend technisch bewijs waaruit blijkt dat de gemodificeerde antilichamen inderdaad minder immunogeen zijn of dat onderhavige antilichamen een ander onverwacht effect hebben. Derhalve vertonen onderhavige antilichamen geen verrassend effect en zijn de oplossingen volgens de conclusies veelal willekeurige oplossingen die geen inventiviteit betreffen.
- 3.3 De onafhankelijke conclusie 5 lijkt geen aanvullende maatregelen te bevatten die in combinatie met de maatregelen van conclusie 1 inventiviteit betreffen, aangezien de materie binnen de kennis en vaardigheden van deskundigen valt.
- 3.4 Derhalve voldoet onderhavige aanvraag niet aan de criteria van octrooieerbaarheid, omdat de materie van de conclusies 1a-4a en 5-12 geen inventiviteit betreffen.

4 INDUSTRIELE TOEPASBAARHEID

- 4.1 De conclusies 6 en 12 betreffen een chirurgische of therapeutische behandelings-

wijze voor het menselijk/dierlijk lichaam. Dientengevolge valt de materie daarvan buiten het kader van industriële toepassing. Conclusies die betrekking hebben op een samenstelling voor het eerste gebruik in een medische behandeling en het gebruik van deze samenstelling voor de productie van een geneesmiddel voor een nieuwe medische behandeling (conclusies 7-10) kunnen toegestaan zijn.

DEEL VI

Het onderzoek was gebaseerd op de aanname dat de prioriteit volgens de conclusies geldt voor alle conclusies. Wanneer dit echter niet het geval is, dan zou het volgende document relevant zijn voor de conclusies 1-12:

WO 2005/067620 A2 (PFIZER [US]; ABGENIX INC [US]; PFIZER LTD [GB]; PULLEN NICHOLAS [GB];) 28 juli 2005 (2005-07-28)

DEEL VIII

1 DUIDELIJKHEID EN ONDERSTEUNING

- 1.1 De zware keten in conclusie 1 wordt niet duidelijk gedefinieerd, aangezien deze uitsluitend door een interne aanduiding wordt gedefinieerd. Het corresponderende SEQ ID NO wordt tussen haakjes gegeven en derhalve uitsluitend optioneel en niet beperkend voor het bereik van de conclusies. Om conclusie 1 duidelijk te maken moeten de haakjes worden verwijderd.
- 1.2 De therapeutische toepassing in het medisch gebruik [volgens] conclusie 7 wordt functioneel gedefinieerd door een werkingsmechanisme dat geen praktische toepassing in de vorm van een gedefinieerde, daadwerkelijke behandeling van een pathologische conditie toestaat. Aangezien de te behandelen aandoening niet duidelijk gedefinieerd wordt, is conclusie 7 niet duidelijk.
- 1.3 Derhalve zijn de conclusies 1 en 7 niet duidelijk.

**AANHANGSEL BEHORENDE BIJ HET RAPPORT BETREFFENDE
HET ONDERZOEK NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK,
UITGEVOERD IN DE OCTROOIAANVRAGE NR.**

NO 135771
NL 1032132

Het aanhangsel bevat een opgave van elders gepubliceerde octrooiaanvragen of octrooien (zogenaamde leden van dezelfde octrooifamilie), die overeenkomen met octrooischriften genoemd in het rapport.

De opgave is samengesteld aan de hand van gegevens uit het computerbestand van het Europees Octrooibureau per De juistheid en volledigheid van deze opgave wordt noch door het Europees Octrooibureau, noch door het Bureau voor de Industriële eigendom gegarandeerd; de gegevens worden verstrekt voor informatiedoeleinden.

20-03-2007

In het rapport genoemd octrooigeschrift		Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
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 9958573	A	18-11-1999	AU 3986699	A 29-11-1999
			CA 2330000	A1 18-11-1999
			EP 1078006	A1 28-02-2001
			JP 2002514660	T 21-05-2002
WO 0178779	A2	25-10-2001	AU 5162901	A 30-10-2001
			CA 2406220	A1 25-10-2001
			EP 1278543	A2 29-01-2003
			JP 2003531129	T 21-10-2003
			MX PA02010059	A 19-08-2004
			US 2005095238	A1 05-05-2005
NL 1027975	C2	23-12-2005	AR 047372	A1 18-01-2006
			AU 2005204678	A1 28-07-2005
			CA 2552523	A1 28-07-2005
			EP 1709080	A2 11-10-2006
			KR 20060129006	A 14-12-2006
			NL 1027975	A1 12-07-2005
			WO 2005067620	A2 28-07-2005
US 2004010810	A1	15-01-2004	GEEN	