



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0612645-6 A2**

(22) Data de Depósito: 28/06/2006  
(43) Data da Publicação: 23/11/2010  
(RPI 2081)



**(51) Int.Cl.:**  
A61K 39/395  
A61P 1/00  
A61P 37/00  
C07K 16/28

(54) Título: **USO DE ANTICORPOS ANTI-MADCAM PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA CELÍACA E ESPRU TROPICAL**

(30) Prioridade Unionista: 08/07/2005 US 60/697,454

(73) Titular(es): Pfizer Limited

(72) Inventor(es): GARY CRAIG BURGESS

(74) Procurador(es): Alexandre Ferreira

(86) Pedido Internacional: PCT IB2006001837 de 28/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/007145de 18/01/2007

(57) Resumo: USO DE ANTICORPOS ANTI-MADCAM PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA CELÍACA E ESPRU TROPICAL. Uso de anticorpos para o tratamento de doença celíaca e espru tropical. O pedido se relaciona ao uso de um anticorpo anti-MAdCAM para a fabricação de um medicamento para o tratamento de doença celíaca e/ou espru tropical. Métodos para tratamento de doença celíaca e/ou espru tropical usando uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-MAdCAM também estão incluídos.

"USO DE ANTICORPOS ANTI-MADCAM PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA CELÍACA E ESPRU TROPICAL"

Uso de anticorpos anti-MAdCAM para o tratamento de doença celíaca e espru tropical

5 A invenção se relaciona ao uso de anticorpos anti-MAdCAM para a fabricação de um medicamento para o tratamento de doença celíaca e/ou espru tropical.

A molécula de adesão celular adressina de mucosa (MAdCAM) é um membro da superfamília das imunoglobulinas de  
10 receptores de adesão celular. Ela é uma das moléculas de adesão envolvidas no recrutamento de linfócitos para tecidos quando necessário, por meio de interação com uma molécula de integrina na superfície dos linfócitos.

Foi mostrado que anticorpos que inibem a ligação  
15 de MAdCAM a seu par de ligação integrina,  $\alpha_4\beta_7$ , por exemplo, anticorpos anti-MAdCAM (por exemplo, MECA-367; US 5.403.919, US 5.538.724) ou anticorpos anti- $\alpha_4\beta_7$  (por exemplo, Act-1; US 6.551.593,=), podem inibir o extravasamento de leucócitos no intestino inflamado e podem, portanto, ser vantajosos no  
20 tratamento de doença intestinal inflamatória (IBD).

Anticorpos anti-MAdCAM tal como MECA-367, entretanto, não são úteis terapêuticamente em pacientes humanos; MECA-367 se liga a MAdCAM de camundongo e não mostra afinidade pela molécula de MAdCAM humana. Além disso, sendo um  
25 anticorpo de rato, ele levará a uma resposta imune em pacientes humanos e, portanto, não é adequado para uso terapêutico. Anticorpos monoclonais de camundongo, direcionados contra MAdCAM humana foram descritos (WO 96/24673), mas es-

ses provavelmente também são imunogênicos em humanos. Recentemente, anticorpos anti-MAdCAM humana completamente humanos, terapeuticamente úteis com especificidade e afinidade primorosas a MAdCAM humana e de primata foram desenvolvidos e divulgados em WO 2005/067620.

Um inibidor da interação entre MAdCAM e integrina  $\alpha_4\beta_7$ , tal como um anticorpo anti-MAdCAM de bloqueio, ou um anticorpo para integrina  $\alpha_4\beta_7$  (tal como MLN02, que é Act-1 humanizado, descrito em WO 01/078779), foi postulado como sendo útil no tratamento de doença intestinal inflamatória (IBD). Entretanto, foi demonstrado que inibidores desta interação incluindo anticorpos de bloqueio a MAdCAM, também são úteis no tratamento de doença celíaca e espru tropical.

A doença celíaca (também conhecida como enteropatia sensível a glúten ou espru celíaco) é uma patologia do intestino delgado. A patologia afeta até 1 em 300 pessoas no Reino Unido, Europa e EUA. A doença celíaca é uma patologia comum e pode afetar qualquer um em qualquer idade. Pensou-se que ela seria mais comum em homens, mas provavelmente ocorre igualmente em homens e mulheres.

Glúten, uma mistura de duas proteínas, gliadina e glutenina, é encontrado no trigo, cevada e centeio. Ele reage com o intestino delgado, causando lesão pela ativação do sistema imune para atacar o revestimento delicado do intestino, que é responsável por absorver nutrientes e vitaminas. A patologia freqüentemente é diagnosticada na infância após o desmame quando cereais são introduzidos na dieta, embora ela possa ser diagnosticada em qualquer idade. Os sintomas

podem ser sutis e o paciente pode sentir-se mal sem motivo por algum tempo antes do diagnóstico ser feito.

Os primeiros sintomas geralmente incluem tornar-se irritadiço e triste, com pouco apetite e dificuldade em ganhar peso. Fezes (movimentos intestinais) podem se tornar 5 pálidas, volumosas e de cheiro desagradável. Algumas crianças começam com vômito e diarreia, então a elas é frequentemente dado o diagnóstico errôneo de "gastroenterite". O estômago pode se tornar inchado e os músculos dos braços e 10 pernas se tornarem definhados e fracos. Em adultos os sintomas podem ser similares, incluindo perda de peso com palidez, diarreia ofensiva ou constipação e inchaço abdominal com "vento". Metade dos adultos com doença celíaca não têm quaisquer sintomas intestinais. Eles procuram seus médicos 15 por causa de cansaço extremo, problemas psicológicos como depressão, dor nos ossos e às vezes mesmo fraturas (devido ao afinamento dos ossos), úlceras na boca ou uma vesiculação, brotoeja cutânea que coça em geral nos cotovelos e joelhos (chamadas dermatite herpetiforme).

20 Algumas mulheres com doença celíaca têm dificuldade em engravidar e podem ser diagnosticadas por causa disto. Aborto recorrente (perda espontânea de um gravidez) algumas vezes está associado com doença celíaca. Algumas mulheres são diagnosticadas durante a gravidez porque seus intestinos 25 não conseguem absorver ferro e vitaminas suficientes para manter a demanda estando grávidas, tornando-as gravemente anêmicas. Bebês que são pequenos para sua idade no útero (retardo de crescimento intra-uterino) são mais frequente-

mente nascidos de mães com doença celíaca.

Se não tratada, a doença celíaca pode levar a anemia, doença óssea e raramente, algumas formas de câncer. O tratamento mais importante no momento é evitar toda comida  
5 que contenha glúten. Isto geralmente resulta na melhora ou mesmo desaparecimento, da lesão no revestimento do intestino. Entretanto, a lesão voltará a ocorrer se o glúten for re-introduzido na dieta.

Embora a doença celíaca não seja prevenível, seguindo uma dieta sem glúten pode-se reverter a lesão no  
10 intestino delgado. Isto requer considerável disciplina. Há uma necessidade em encontrar um medicamento com um baixo risco de efeitos colaterais que permitirá a pacientes comer uma dieta normal e evitar deficiências minerais e vitamínicas e  
15 outras patologias associadas com a doença celíaca.

Espru tropical é um problema digestivo que ocorre nos trópicos e subtropicais. Pessoas com espru tropical não absorvem nutrientes adequadamente, especialmente vitamina B12 e ácido fólico. A diarreia é o principal sintoma do  
20 espru tropical; pessoas que comem muita comida gordurosa podem ter diarreia mais grave que aquelas em dietas pobres em gordura. Outros sintomas incluem cólicas, náuseas, perda de peso, gases e indigestão.

Espru tropical afeta cerca de uma pessoa em um milhão e ocorre de cerca de 30 graus norte do Equador até 30  
25 graus sul dele. Ele é mais comum em certos países, incluindo Índia, Haiti, Cuba, Porto Rico e República Dominicana. É raro ou ausente na África, nas Bahamas e Jamaica. A patologia

aflige residentes dos países afetados assim como viajantes, embora geralmente afete apenas viajantes que ficam por seis meses ou mais.

A causa de espru tropical não foi identificada, mas provavelmente é devido a uma combinação de fatores, incluindo infecção e nutrição pobre, que agem juntos para lesionar o revestimento do intestino delgado, tornando este menos apto a absorver nutrientes.

O diagnóstico de espru tropical pode ser complicado, porque muitas doenças têm sintomas similares. Testes de fezes e sangue são realizados para descartar outras causas de diarréia. Se esses são negativos e o paciente viveu nos trópicos por um período prolongado de tempo, então espru tropical é uma causa potencial para a doença. Uma biópsia pode ser realizada para examinar as vilosidades para o achatamento típico das vilosidades do intestino delgado.

Certos testes sanguíneos também podem auxiliar no diagnóstico de espru tropical. Devido à doença impedir certas vitaminas e minerais de serem absorvidos, níveis baixos de albumina, cálcio ou vitaminas D, A, K e E podem ser observados. O paciente também pode ter anemia devido a deficiências em vitamina B12 e folato. Além disso, amostras fecais podem demonstrar uma quantidade excessiva de gordura.

O tratamento geralmente é de três a seis meses de antibióticos e suplementos de ácido fólico (também chamado folato). Pessoas com deficiência em vitamina B12 também receberão suplementos vitamínicos.

#### Aspectos da Invenção

Um aspecto da invenção é o uso de um anticorpo que se liga especificamente a MAdCAM para a fabricação de um medicamento para o tratamento de doença celíaca e/ou espru tropical. Um outro aspecto da invenção é um método para tratamento de doença celíaca e/ou espru tropical, de preferência doença celíaca, usando uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-MAdCAM.

Um outro aspecto da invenção é o uso de um anticorpo anti-integrina  $\alpha_4\beta_7$  para a fabricação de um medicamento para o tratamento de doença celíaca e/ou espru tropical, de preferência doença celíaca. De preferência, o anticorpo anti-integrina  $\alpha_4\beta_7$  é Act-1 humanizado, também chamado MLN02. Um outro aspecto da invenção é um método para tratamento de doença celíaca e/ou espru tropical, de preferência doença celíaca, usando uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti- $\alpha_4\beta_7$ , de preferência MLN02.

Um outro aspecto da invenção é o uso de um inibidor da adesão mediada por MAdCAM-integrina  $\alpha_4\beta_7$  para a fabricação de um medicamento para o tratamento de doença celíaca e/ou espru tropical. Ainda um outro aspecto da invenção é um método para tratamento de doença celíaca e/ou espru tropical, usando uma quantidade terapêuticamente eficaz de um inibidor da adesão mediada por MAdCAM-integrina  $\alpha_4\beta_7$ .

De preferência o anticorpo anti-MAdCAM ou porção de ligação a antígeno deste usado na invenção se liga especificamente a MAdCAM. Ainda de maior preferência, pelo menos as seqüências de CDR do citado anticorpo são seqüências de CDR humanas, ou uma porção de ligação a antígeno de um anti-

corpo humano. De preferência, o anticorpo é um anticorpo humano, de maior preferência um anticorpo monoclonal humano ou porção de ligação a antígeno deste, ainda de maior preferência um anticorpo ou porção de ligação a antígeno deste que  
5 age como um antagonista de MAdCAM.

De preferência, o anticorpo ou porção possui pelo menos uma das seguintes propriedades:

(a)liga-se a células humanas;

(b)tem uma seletividade por MAdCAM sobre VCAM ou  
10 fibronectina de pelo menos 100 vezes;

(c)liga-se a MAdCAM humana com um  $K_d$  de  $3 \times 10^{-10}M$  ou menos; ou

(d)inibe a ligação de células que expressam  $\alpha_4\beta_7$  a MAdCAM humana;

(e)inibe o recrutamento de linfócitos para o tecido  
15 linfóide gastrintestinal.

De preferência, o anticorpo ou porção de ligação a antígeno inibe a ligação de MAdCAM humana a  $\alpha_4\beta_7$  e tem pelo menos uma das seguintes propriedades:

(a)compete de maneira cruzada com um anticorpo de  
20 referência para ligação a MAdCAM;

(b)compete com um anticorpo de referência para ligação a MAdCAM;

(c)liga-se ao mesmo epítipo de MAdCAM que um anti-  
25 corpo de referência;

(d)liga-se a MAdCAM com consideravelmente o mesmo  $K_d$  que um anticorpo de referência;

(e)liga-se a MAdCAM com consideravelmente a mesma

taxa de desligamento que um anticorpo de referência;

em que o anticorpo de referência é selecionado do grupo que consiste em: anticorpo monoclonal 1.7.2, anticorpo monoclonal 1.8.2, anticorpo monoclonal 6.14.2, anticorpo monoclonal 6.22.2, anticorpo monoclonal 6.34.2, anticorpo monoclonal 6.67.1, anticorpo monoclonal 6.73.2, anticorpo monoclonal 6.77.1, anticorpo monoclonal 7.16.6, anticorpo monoclonal 7.20.5, anticorpo monoclonal 7.26.4, anticorpo monoclonal 9.8.2, anticorpo monoclonal 6.22.2-mod, anticorpo monoclonal 6.34.2-mod, anticorpo monoclonal 6.67.1-mod, anticorpo monoclonal 6.77.1-mod e anticorpo monoclonal 7.26.4-mod.

Em um outro aspecto da invenção a região variável de cadeia pesada, a região variável de cadeia leve ou ambas do anticorpo anti-MAdCAM possuem pelo menos 90% de identidade na seqüência de aminoácidos com a região ou regiões correspondentes de um anticorpo monoclonal selecionado do grupo que consiste em: anticorpo monoclonal 1.7.2, anticorpo monoclonal 1.8.2, anticorpo monoclonal 6.14.2, anticorpo monoclonal 6.22.2, anticorpo monoclonal 6.34.2, anticorpo monoclonal 6.67.1, anticorpo monoclonal 6.73.2, anticorpo monoclonal 6.77.1, anticorpo monoclonal 7.16.6, anticorpo monoclonal 7.20.5, anticorpo monoclonal 7.26.4, anticorpo monoclonal 9.8.2, anticorpo monoclonal 6.22.2-mod, anticorpo monoclonal 6.34.2-mod, anticorpo monoclonal 6.67.1-mod, anticorpo monoclonal 6.77.1-mod e anticorpo monoclonal 7.26.4-mod.

De preferência o anticorpo é selecionado do grupo

que consiste em:

(a)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4, sem as seqüências sinais;

5 (b)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 8, sem as seqüências sinais;

(c)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 12, sem as  
10 seqüências sinais;

(d)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 16, sem as seqüências sinais;

(e)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 20, sem as  
15 seqüências sinais;

(f)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 22 e SEQ ID NO: 24, sem as seqüências sinais;

20 (g)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 26 e SEQ ID NO: 28, sem as seqüências sinais;

(h)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 30 e SEQ ID NO: 32, sem as  
25 seqüências sinais;

(i)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 34 e SEQ ID NO: 36, sem as seqüências sinais;

(j)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 38 e SEQ ID NO: 40, sem as seqüências sinais;

5 (k)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 44, sem as seqüências sinais;

(l)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 46 e SEQ ID NO: 48, sem as seqüências sinais;

10 (m)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 52 e SEQ ID NO: 54, sem as seqüências sinais;

(n)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 56 e SEQ ID NO: 58, sem as  
15 seqüências sinais;

(o)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 60 e SEQ ID NO: 62, sem as seqüências sinais;

20 (p)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 64 e SEQ ID NO: 66, sem as seqüências sinais;

(q)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 68, sem as seqüências sinais.

25 Em um outro aspecto da invenção, o anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno deste é selecionado dos seguintes anticorpos:

(a)a cadeia pesada compreende as seqüências de a-

minoácidos CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada de um anticorpo de referência selecionado do grupo que consiste em: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod e 7.26.4-mod

(b) a cadeia leve compreende as seqüências de aminoácidos CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve de um anticorpo de referência selecionado do grupo que consiste em: 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod e 7.26.4-mod

(c) o anticorpo compreende uma cadeia pesada de (a) e uma cadeia leve de (b); e

(d) o anticorpo de (c) em que as seqüências de aminoácidos de CDR de cadeia pesada e cadeia leve são selecionadas do mesmo anticorpo de referência.

Em um outro aspecto da invenção, o anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno deste compreende:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de região variável de cadeia pesada de um anticorpo selecionado do grupo que consiste em: 1.7.2 (SEQ ID NO: 2), 1.8.2 (SEQ ID NO: 6), 6.14.2 (SEQ ID NO: 10), 6.22.2 (SEQ ID NO: 14), 6.34.2 (SEQ ID NO: 18), 6.67.1 (SEQ ID NO: 22), 6.73.2 (SEQ ID NO: 26), 6.77.1 (SEQ ID NO: 30), 7.16.6 (SEQ ID NO: 34), 7.20.5 (SEQ ID NO: 38), 7.26.4 (SEQ ID NO: 42) e 9.8.2 (SEQ ID NO: 46), 6.22.2-mod (SEQ ID NO: 52), 6.34.2-mod (SEQ ID NO: 56), 6.67.1-mod (SEQ ID NO: 60), 6.77.1-mod (SEQ ID NO: 64) e 7.26.4-mod (SEQ ID NO: 42);

(b) uma cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de região variável de cadeia leve de um anticorpo selecionado do grupo que consiste em: 1.7.2 (SEQ ID NO: 4), 1.8.2 (SEQ ID NO: 8), 6.14.2 (SEQ ID NO: 12), 6.22.2 (SEQ ID NO: 16), 6.34.2 (SEQ ID NO: 20), 6.67.1 (SEQ ID NO: 24), 6.73.2 (SEQ ID NO: 28), 6.77.1 (SEQ ID NO: 32), 7.16.6 (SEQ ID NO: 36), 7.20.5 (SEQ ID NO: 40), 7.26.4 (SEQ ID NO: 44) e 9.8.2 (SEQ ID NO: 48), 6.22.2-mod (SEQ ID NO: 54), 6.34.2-mod (SEQ ID NO: 58), 6.67.1-mod (SEQ ID NO: 62), 6.77.1-mod (SEQ ID NO: 66) e 7.26.4-mod (SEQ ID NO: 68); ou

(c) a cadeia pesada de (a) e a cadeia leve de (b).

Um outro aspecto da invenção é o uso da cadeia pesada e/ou leve do citado anticorpo anti-MAdCAM da região variável ou de outra porção de ligação a antígeno deste, ou moléculas de ácido nucléico codificando qualquer um dos antecedentes e um veículo farmacêuticamente aceitável. Este aspecto da invenção inclui o uso de fragmentos de quaisquer dos anticorpos antecedentes, incluindo, mas não limitando a fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fv de cadeia única (scFv).

De preferência, o anticorpo anti-MAdCAM é um anticorpo anti-MAdCAM inibitório humano selecionado de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod como descrito em WO 2005/067620 (com ou sem a seqüência sinal) ou a região variável de qualquer uma das citadas seqüências de aminoácidos, ou uma ou mais CDRs dessas seqüências de aminoácidos. O an-

ticorpo anti-MAdCAM de preferência compreende uma cadeia pesada compreendendo uma seqüência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 52, 56, 60 ou 64 como mostrado em WO 2005/067620 (com ou sem a seqüência sinal) ou a seqüência de aminoácidos da região variável, ou de qualquer uma ou mais CDRs das citadas seqüências de aminoácidos. O anticorpo anti-MAdCAM de preferência é um anticorpo anti-MAdCAM humano compreendendo a seqüência de aminoácidos do início da CDR1 até o final da CDR3 de qualquer uma das seqüências acima mencionadas. O anticorpo anti-MAdCAM usado na invenção também pode ser um anticorpo anti-MAdCAM compreendendo um ou mais regiões FR de qualquer das seqüências acima mencionadas.

O anticorpo anti-MAdCAM usado na invenção também pode incluir um anticorpo anti-MAdCAM compreendendo uma das seqüências de aminoácidos acima mencionadas em que uma ou mais modificações foram feitas. Por exemplo, cisteínas no anticorpo, que podem ser reativas quimicamente, são substituídas com um outro resíduo, tal como, sem limitação, alanina ou serina. A substituição pode ser feita em uma CDR ou região estrutural de um domínio variável ou no domínio constante de um anticorpo.

Uma substituição de aminoácidos também pode ser feita para eliminar potenciais sítios proteolíticos no anticorpo. Tais sítios podem ocorrer em uma CDR ou região estrutural de um domínio variável ou no domínio constante de um anticorpo. A substituição de resíduos de cisteína e remoção de sítios proteolíticos podem diminuir a heterogeneidade no

produto de anticorpo. Pares asparagina-glicina, que formam potenciais sítios de desaminação, podem ser eliminados pela alteração de um ou de ambos os resíduos. Uma substituição de aminoácidos pode ser feita para adicionar ou para remover potenciais sítios de glicosilação na região variável de um anticorpo usado na invenção.

A lisina C-terminal da cadeia pesada do anticorpo anti-MAdCAM usado na invenção pode ser clivado. As cadeias pesada e leve dos anticorpos anti-MAdCAM podem opcionalmente incluir uma seqüência sinal.

Vinte anticorpos monoclonais anti-MAdCAM humanos inibitórios preferidos para uso na invenção (1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 e 9.8.2) são descritos em detalhe em WO 2005/067620, incorporados aqui inteiramente como referência.

#### *Classes e subclasses de anticorpos anti-MAdCAM*

O anticorpo pode ser uma molécula de IgG, de IgM, de IgE, de IgA ou de IgD. De preferência, o anticorpo é de uma classe IgG e é de uma subclasse, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> ou IgG<sub>4</sub>. De maior preferência, o anticorpo anti-MAdCAM é de uma subclasse IgG<sub>2</sub> ou IgG<sub>4</sub>. De maior preferência, o anticorpo anti-MAdCAM é da mesma classe e subclasse do anticorpo 1.7.2, 1.8.2, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod que é IgG<sub>2</sub>, ou 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, ou e 9.8.2, que é IgG<sub>4</sub> conforme descrito em WO 2005/067620.

A classe e subclasse de anticorpos anti-MAdCAM podem ser determinadas por qualquer método conhecido na técnica

ca. Em geral, a classe e subclasse de um anticorpo podem ser determinadas usando anticorpo que são específicos para uma classe e subclasse particulares de anticorpo. Tais anticorpos estão disponíveis comercialmente. ELISA, *Western Blot* assim como outras técnicas podem determinar a classe e subclasse. Senão, a classe e subclasse podem ser determinadas por seqüenciamento do todo ou de uma porção dos domínios constantes das cadeias pesada e/ou leve dos anticorpo, comparando suas seqüências de aminoácidos com as seqüências de aminoácidos conhecidas de várias classes e subclasses de imunoglobulinas e determinando a classe e subclasse dos anticorpo como a classe que mostra a maior identidade de seqüência.

#### *Seletividade por molécula e espécie*

O anticorpo anti-MAdCAM usado na invenção demonstra tanto seletividade por espécie como por molécula. O anticorpo anti-MAdCAM pode se ligar a MAdCAM humana, de cínomo ou canina. Outros anticorpos anti-MAdCAM usados na invenção não se ligam a espécies de macaco do Novo Mundo tal como um sagüi. Alguém pode determinar a seletividade por espécie de um anticorpo anti-MAdCAM usando métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, alguém pode determinar seletividade por espécie usando *Western Blot*, FACS, ELISA ou imuno-histoquímica. Em uma modalidade preferida, alguém pode determinar a seletividade por espécie usando imuno-histoquímica.

Um anticorpo anti-MAdCAM usado na invenção que se liga especificamente a MAdCAM tem seletividade por MAdCAM

sobre VCAM, fibronectina ou qualquer outro antígeno que é pelo menos de 10 vezes, de preferência pelo menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 vezes, da maior preferência pelo menos 100 vezes. De preferência, o anticorpo anti-MAdCAM não  
5 exibe qualquer ligação apreciável a VCAM, fibronectina ou qualquer outro antígeno fora MAdCAM. Alguém pode determinar a seletividade do anticorpo anti-MAdCAM por MAdCAM usando métodos bem conhecidos na técnica seguindo os ensinamentos da especificação. Por exemplo, alguém pode determinar a se-  
10 letividade usando *Western Blot*, FACS, ELISA ou imunohistoquímica.

*Afinidade de ligação de anticorpos anti-MAdCAM por MAdCAM*

Os anticorpos anti-MAdCAM usados na invenção de  
15 preferência se ligam especificamente a MAdCAM com alta afinidade. Um anticorpo anti-MAdCAM usado na invenção se liga especificamente a MAdCAM com  $K_d$  de  $3 \times 10^{-8}M$  ou menos, como medido por ressonância de plasma de superfície, tal como BI-Acore. De preferência, o anticorpo se liga especificamente a  
20 MAdCAM com  $K_d$  de  $1 \times 10^{-8}$  ou menos ou  $1 \times 10^{-9}M$  ou menos. De maior preferência, o anticorpo se liga especificamente a MAdCAM com  $K_d$  de  $1 \times 10^{-10}M$  ou menos. Um anticorpo usado na invenção se liga especificamente a MAdCAM com  $K_d$  de  $2,66 \times 10^{-10}M$  ou menos,  $2,35 \times 10^{-11}M$  ou menos ou  $9 \times 10^{-12}M$  ou menos.  
25 De preferência, o anticorpo se liga especificamente a MAdCAM com  $K_d$  de  $1 \times 10^{-11}M$  ou menos. De preferência, o anticorpo se liga especificamente a MAdCAM com consideravelmente o mesmo  $K_d$  que um anticorpo selecionado de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2,

6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod como descrito em WO 2005/067620.

Um anticorpo com "consideravelmente o mesmo  $K_d$ "  
5 que um anticorpo de referência tem um  $K_d$  que é  $\pm 100$  pM, de preferência  $\pm 50$  pM, de maior preferência  $\pm 20$  pM, ainda de maior preferência  $\pm 10$  pM,  $\pm 5$  pM ou  $\pm 2$  pM, comparado ao  $K_d$  do anticorpo de referência no mesmo experimento. De preferência, o anticorpo se liga a MAdCAM com consideravelmente o  
10 mesmo  $K_d$  que um anticorpo que compreende um ou mais domínios variáveis ou uma ou mais CDRs de um anticorpo selecionado de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod como descrito em  
15 WO 2005/067620. De preferência, o anticorpo se liga a MAdCAM com consideravelmente o mesmo  $K_d$  que um anticorpo que compreende uma das seqüências de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62,  
20 64, 66 ou 68 como descrito em WO 2005/067620 (com ou sem a seqüência sinal), ou o domínio variável deste. De preferência, o anticorpo se liga a MAdCAM com consideravelmente o mesmo  $K_d$  que um anticorpo que compreende uma ou mais CDRs de um anticorpo que compreende uma seqüência de aminoácidos se-  
25 lecionada de SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66 ou 68 como descrito em WO 2005/067620.

A afinidade de ligação de um anticorpo anti-MAdCAM pode ser determinada por qualquer método conhecido na técnica. Em uma modalidade, a afinidade de ligação pode ser medida por ELISAs competitivos, RIAs ou ressonância de plasma de superfície. Em uma modalidade ainda mais preferida, a afinidade de ligação e taxa de dissociação são medidas usando um BIAcore. Um exemplo de determinação de afinidade de ligação pode ser encontrado em WO 2005/067620.

*Meia-vida de anticorpos anti-MAdCAM*

10 O anticorpo anti-MAdCAM usando na invenção tem uma meia-vida de pelo menos um dia *in vitro* ou *in vivo*. De preferência, o anticorpo ou porção deste tem uma meia-vida de pelo menos três dias. De maior preferência, o anticorpo ou porção deste tem uma meia-vida de quatro dias ou maior. Ainda de maior preferência, o anticorpo ou porção deste tem uma  
15 meia-vida de oito dias ou maior. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno deste usada na invenção também pode ser derivada ou modificada tal que ela tenha uma meia-vida maior, conforme discutido abaixo. Em uma outra modalidade preferida, o anticorpo pode conter mutações pontuais para au-  
20 mentar a meia-vida sérica, tal como descrito em WO 00/09560.

A meia-vida de anticorpo pode ser medida por quaisquer meios conhecidos por alguém que tem conhecimento ordinário da técnica. Por exemplo, a meia-vida de anticorpo  
25 pode ser medida por *Western blot*, ELISA ou RIA por um período de tempo apropriado. A meia-vida de anticorpo pode ser medida em qualquer animal apropriado, tal como um primata, por exemplo, macaco cinomolgo ou um humano.

*Identificação de epítomos de MAdCAM reconhecidos por anticorpo anti-MAdCAM*

A invenção também provê o uso de um anticorpo anti-MAdCAM humano que se liga ao mesmo antígeno ou epítopo que um anticorpo anti-MAdCAM humano provido aqui. Adicionalmente, a invenção provê o uso de um anticorpo anti-MAdCAM humano que compete ou compete de maneira cruzada com um anticorpo anti-MAdCAM humano. De preferência, o anticorpo anti-MAdCAM humano é 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod como descrito em WO 2005/067620. De preferência, o anticorpo anti-MAdCAM humano compreende um ou mais domínios variáveis ou uma ou mais CDRs de um anticorpo selecionado de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. De preferência, o anticorpo anti-MAdCAM humano compreende uma das seqüências de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66 ou 68 como descrito em WO 2005/067620 (com ou sem a seqüência sinal), ou um domínio variável deste. De preferência, o anticorpo anti-MAdCAM humano compreende uma ou mais CDRs de um anticorpo que compreende uma das seqüências de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 58, 62, 64, 66 ou 68 como descrito em WO 2005/067620.

Alguém pode determinar se um anticorpo anti-MAdCAM se liga ao mesmo antígeno que um outro anticorpo anti-MAdCAM usando uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, alguém pode usar um anticorpo anti-MAdCAM conhecido para capturar o antígeno, eluir o antígeno do anticorpo anti-MAdCAM e então determinar se o anticorpo teste se ligará ao antígeno eluído. Alguém pode determinar se um anticorpo compete com um anticorpo anti-MAdCAM pela ligação do anticorpo anti-MAdCAM a MAdCAM sob condições saturadas e então medir a habilidade do anticorpo teste em se ligar a MAdCAM. Se o anticorpo teste é capaz de se ligar à MAdCAM ao mesmo tempo em que um anticorpo anti-MAdCAM, então o anticorpo teste se liga a um epítopo diferente que o anticorpo anti-MAdCAM. Entretanto, se o anticorpo teste não for capaz de se ligar à MAdCAM ao mesmo tempo, então o anticorpo teste compete com o anticorpo anti-MAdCAM humano. Este experimento pode ser realizado usando ELISA, ou ressonância de plasma em superfície ou, de preferência, BIAcore. Para testar se um anticorpo anti-MAdCAM compete de maneira cruzada com um outro anticorpo anti-MAdCAM, alguém pode usar o método de competição descrito acima em duas direções, isto é, determinando se o anticorpo conhecido bloqueia o anticorpo teste e vice-versa.

#### *Uso de gene de cadeia leve e pesada*

A invenção também provê o uso de um anticorpo anti-MAdCAM que compreende uma região variável de cadeia leve codificada por um gene  $\kappa$  humano. De preferência, a região variável de cadeia leve é codificada por uma família gênica

O18, O12, B3, A26, A3, A2 de Vk humana. De preferência, a cadeia leve compreende não mais que onze, não mais que seis ou não mais que onze três substituições de aminoácidos a partir da seqüência O18, O12, B3, A26, A3, A2 de Vk humana  
5 de linhagem germinativa. De preferência, as substituições de aminoácidos são substituições conservativas.

De preferência, a VL do anticorpo anti-MAdCAM contém as mesmas mutações, em relação à seqüência de aminoácidos de linhagem germinativa, que qualquer uma ou mais das  
10 VLs de anticorpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod descritos em WO 2005/067620. A invenção inclui o uso de um anticorpo anti-MAdCAM que utiliza os mesmos genes Vk humano e Jk humano que um anticorpo exemplificado. O anticorpo pode  
15 compreender uma ou mais das mesmas mutações de linhagem germinativa que um ou mais anticorpos exemplificados, ou o anticorpo pode compreender substituições diferentes em uma ou mais posições que um ou mais dos anticorpos exemplificados.  
20 Por exemplo, a VL do anticorpo anti-MAdCAM pode conter uma ou mais substituições de aminoácidos que são as mesmas daquelas presentes no anticorpo 7.16.6 e uma outra substituição de aminoácidos que é a mesma que a de anticorpo 7.26.4. Desta maneira, alguém pode misturar e parear características  
25 diferentes de ligação de anticorpo a fim de alterar, por exemplo, a afinidade do anticorpo por MAdCAM ou sua taxa de dissociação do antígeno. As mutações podem ser feitas na mesma posição daquelas encontradas em qualquer uma ou mais

das VLs de anticorpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod, mas substituições de aminoácidos conservados são feitas em vez de usar o mesmo aminoácido. Por exemplo, se a substituição de aminoácidos comparada com a linhagem germinativa em um dos anticorpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod é glutamato, alguém pode substituir conservativamente por aspartato. De maneira similar, se a substituição de aminoácidos é serina, alguém pode substituir conservativamente por treonina.

A cadeia leve do anticorpo anti-MAdCAM pode compreender uma seqüência de aminoácidos que é a mesma que a seqüência de aminoácidos da VL de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. A cadeia leve de preferência compreende seqüências de aminoácidos que são as mesmas que as de regiões CDR da cadeia leve de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. A cadeia leve pode compreender uma seqüência de aminoácidos com pelo menos uma região CDR da cadeia leve de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. A cadeia leve po-

de compreender seqüências de aminoácidos com CDRs de diferentes cadeias leves que usam os mesmos genes Vk e Jk. De preferência, as CDRs de diferentes cadeias leves são obtidas de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 5 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. De preferência, a cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 58, 62, 64, 66 ou 68 de WO 2005/067620 com ou 10 sem a seqüência sinal. De preferência, a cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácidos codificada por uma seqüência nucleotídica selecionada de SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 53, 61, 65 ou 67 de WO 2005/067620 (com ou sem a seqüência sinal), ou uma seqüência 15 nucleotídica que codifica uma seqüência de aminoácidos que tem 1-11 inserções, deleções ou substituições de aminoácidos daí. De preferência, as substituições de aminoácidos são substituições de aminoácidos conservados. O anticorpo ou porção deste pode compreender uma cadeia leve lambda.

20 A presente invenção também provê o uso de um anticorpo anti-MAdCAM ou porção deste que compreende uma seqüência de gene VH humano ou uma seqüência derivada de um gene VH humano. A seqüência de aminoácidos de cadeia pesada pode ser derivada de uma família de gene 4-4, 3-33, 3-30, 3-23, 25 3-21, 3-15, 1-1B de VH humano. De preferência, a cadeia pesada compreende não mais que quinze, não mais que seis ou não mais que três alterações de aminoácidos a partir da seqüência de gene 4-4, 3-33, 3-30, 3-23, 3-21, 3-15, 1-18 de

VH humano de linhagem germinativa.

As SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42 e 46 divulgadas em WO 2005/067620 proveram as seqüências de aminoácidos das cadeias pesadas completas de vinte anticorpos anti-MAdCAM para uso na invenção. Todas as SEQ ID NOS aqui referidas se relacionam às seqüências realmente divulgadas em WO 2005/067620.

De preferência, a VH do anticorpo anti-MAdCAM contém as mesmas mutações, em relação à seqüência de aminoácidos de linhagem germinativa, que qualquer uma ou mais das VHs de anticorpos 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. Similar ao discutido acima, o anticorpo compreende uma ou mais das mesmas mutações de linhagem germinativa que um ou mais anticorpos exemplificados. O anticorpo também pode compreender substituições diferentes em uma ou mais das mesmas posições que um ou mais dos anticorpos exemplificados. Por exemplo, a VH do anticorpo anti-MAdCAM pode conter uma ou mais substituições de aminoácidos que são as mesmas daquelas presentes no anticorpo 7.16.6 e uma outra substituição de aminoácidos que é a mesma que a de anticorpo 7.26.4. Desta maneira, alguém pode misturar e parear características diferentes de ligação de anticorpo a fim de alterar, por exemplo, a afinidade do anticorpo por MAdCAM ou sua taxa de dissociação do antígeno. Uma substituição de aminoácidos comparada com a linhagem germinativa pode ser feita na mesma posição que uma substituição de linhagem germinativa como

encontrado em qualquer uma das VHs de anticorpo de referência 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod, mas a posição é  
5 substituída com um resíduo diferente, que é uma substituição conservativa comparada com o anticorpo de referência.

De preferência, a cadeia pesada do anticorpo anti-MAdCAM usado na invenção compreende uma seqüência de aminoácidos que é a mesma que a seqüência de aminoácidos da VH de  
10 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. De maior preferência, a cadeia pesada compreende seqüências de aminoácidos que são as mesmas que as de regiões CDR da cadeia pesada de  
15 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. De preferência, a cadeia pesada pode compreender uma seqüência de aminoácidos com pelo menos uma região CDR da cadeia pesada de  
20 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod, ou a cadeia pesada pode compreender seqüências de aminoácidos com CDRs de diferentes cadeias pesadas. De preferência, as CDRs de diferentes  
25 cadeias pesadas são obtidas de 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod. De preferência, a cadeia pesada compreen-

de uma seqüência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 42, 46, 52, 60 ou 64 de WO 2005/067620 com ou sem a seqüência sinal. A cadeia pesada também pode compreender uma seqüência de aminoácidos codificada por uma seqüência nucleotídica selecionada de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 51, 55, 59 ou 63 de WO 2005/067620, ou uma seqüência nucleotídica que codifica uma seqüência de aminoácidos que tem 1-15 inserções, deleções ou substituições de aminoácidos daí. As substituições são de preferência substituições de aminoácidos conservados.

Ácidos nucleicos, vetores, células hospedeiras e métodos recombinantes para fazer anticorpo

Os ácidos nucleicos, vetores, células hospedeiras e métodos recombinantes para fazer esses anticorpos são descritos em WO 2005/067620.

Anticorpos derivados e marcados

Um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção pode ser derivado ou ligado a uma outra molécula (por exemplo, um outro peptídeo ou proteína). Em geral, os anticorpos ou porções destes são derivados tal que a ligação a MADCAM não é afetada adversamente pela derivação ou marcação. Conseqüentemente, os anticorpos e porções de anticorpo usadas na invenção destinam-se a incluir tanto formas intactas como modificadas dos anticorpos anti-MADCAM humanos descritos aqui. Por exemplo, um anticorpo ou porção de anticorpo usado na invenção pode ser ligado funcionalmente (por acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou de ou-

tro modo) a uma ou mais outras entidades moleculares, tal como um outro anticorpo (por exemplo, um anticorpo biespecífico ou um diacorpo), um agente de detecção, um agente citotóxico, um agente farmacêutico e/ou uma proteína ou peptídeo que pode mediar a associação do anticorpo ou porção de anticorpo com uma outra molécula (tal como uma região de cerne de estreptavidina ou um marcador de poli-histidina).

Um tipo de anticorpo derivado é produzido por reticulação de dois ou mais anticorpos (do mesmo tipo ou de tipos diferentes, por exemplo, para criar anticorpos biespecíficos). Reticuladores adequados incluem aqueles que são heterobifuncionais, que têm dois grupos distintamente reativos separados por um espaçador apropriado (por exemplo, éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) ou homobifuncionais (por exemplo, suberato de dissuccinimidila). Tais ligantes estão disponíveis a partir de Pierce Chemical Company, Rockford, III.

Um outro tipo de anticorpo derivado é um anticorpo marcado. Agentes de detecção úteis com os quais um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção pode ser derivado incluem compostos fluorescentes, incluindo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloreto de 5-dimetilamina-1-naftalenossulfonila, ficoeritrina, lantanídeo fósforos e semelhantes. Um anticorpo também pode ser marcado com enzimas que são úteis para detecção, tal como peroxidase de rabanete,  $\beta$ -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina, glicose oxidase e semelhantes. Quando um anticorpo é marcado com uma enzima detectável, ele é detectada pela adição de reagentes

adicionais que a enzima usa para produzir um produto de reação que pode ser distinguido. Por exemplo, quando o agente peroxidase de rabanete está presente, a adição de peróxido de hidrogênio e diamobenzidina leva a um produto de reação colorido, que é detectável. Um anticorpo também pode ser marcado com biotina e detectado através de medição indireta de ligação de avidina ou estreptavidina. Um anticorpo pode ser marcado com um agente magnético, tal como gadolínio. Um anticorpo também pode ser marcado com um epítipo polipeptídico pré-determinado reconhecido por um repórter secundário (por exemplo, seqüências de par de zíperes de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação a metal, marcadores de epítipo). Em algumas modalidades, marcadores são aderidos por braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir potencial impedimento estérico.

Um anticorpo anti-MAdCAM também pode ser marcado com um aminoácido radiomarcado. O radiomarcador pode ser usado tanto para fins diagnósticos como terapêuticos. Por exemplo, o radiomarcador pode ser usado terapêuticamente como uma toxina para tecido doente ou tumores que expressam MAdCAM. Exemplos de marcadores para polipeptídeos incluem, mas não estão limitados a, os seguintes radioisótopos ou radionucléotons -  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ .

Um anticorpo anti-MAdCAM também pode ser derivado com um grupo químico tal como polietileno glicol (PEG), um grupo metila ou etila, ou um grupo de carboidrato. Essas grupos podem ser úteis para melhorar as características bio-

lógicas do anticorpo, por exemplo, para aumentar a meia-vida sérica ou para aumentar a ligação tecidual. Esta metodologia também se aplicaria a quaisquer fragmentos de ligação a antígeno ou versões de anticorpos anti-MAdCAM.

5                    Composições farmacêuticas e kits

Em um aspecto adicional, a invenção provê composições compreendendo um anticorpo anti-MAdCAM humano inibitório e métodos para tratar indivíduos com tais composições. Em algumas modalidades, o indivíduo do tratamento é humano. 10 Em outras modalidades, o indivíduo é um indivíduo veterinário. Em algumas modalidades, o indivíduo veterinário é um cachorro ou primata não humano.

O tratamento pode envolver a administração de um ou mais anticorpos monoclonais anti-MAdCAM inibitórios, ou 15 fragmentos de ligação a antígeno destes, sozinhos ou com um veículo farmacêuticamente aceitável. Anticorpos anti-MAdCAM inibitórios e composições os compreendendo, podem ser administrados em combinação com um ou mais de outros agentes terapêuticos, diagnósticos ou profiláticos. Agentes terapêuticos 20 adicionais incluem agentes antiinflamatórios ou imunomodulatórios. Esses agentes incluem, mas não estão limitados a, os corticosteróides tópicos e orais tal como prednisolona, metilprednisolona, NCX-1015 ou budenosídeo; os aminosalicilatos tal como mesalazina, olsalazina, balsalazida ou 25 NCX-456; a classe de imunomoduladores tal como azatioprina,  $\beta$ -mercaptipurina, metotrexato, ciclosporina, FK506, IL-10 (Ilodecakin), IL-11 (Oprelevkin), IL-12, antagonistas de MIF/CD74, antagonistas de CD40, tal como TNX-100/5-D12, an-

tagonistas de OX40L, GM-CSF, pimecrolimo ou rapamicina; a classe de agentes anti-TNF $\alpha$  tal como infliximab, adalimumab, CDP-870, onercept, etanercept; a classe de agentes antiinflamatórios, tal como inibidores de PDE-4 (roflumilast, etc), inibidores de TACE (DPC-333, RDP-58, etc) e inibidores ICE (VX-740, etc) assim como antagonistas de receptor de IL-2, tal como da daclizumab, a classe de antagonistas de molécula de adesão seletiva, tal como natalizumab, MLN-02 ou alicaforsen, classes de agentes analgésicos tal como, mas não limitando a, inibidores de COX-2, tal como rofecoxib, valdecoxib, celecoxib, moduladores de canal ( $\alpha 2\delta$ ) sensível a voltagem tipo P/Q, tal como gabapentina e pregabalina, antagonistas de receptor NK-1, moduladores de receptor canabinóide e agonistas de receptor opióide, assim como agentes antineoplásicos, antitumorais, antiangiogênicos ou quimioterapêuticos. Tais agentes adicionais podem ser incluídos na mesma composição ou administrados separadamente.

Conforme aqui utilizado, "veículo farmacologicamente aceitável" significa qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de aumento ou retardo de absorção e semelhantes que são fisiologicamente compatíveis. Alguns exemplos de veículos farmacologicamente aceitáveis são água, salina, salina tamponada com fosfato, tampão de acetato com cloreto de sódio, dextrose, glicerol, polietileno glicol, etanol e semelhantes, assim como combinações destes. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoois tais como manitol, sorbi-

tol ou cloreto de sódio na composição. Exemplos adicionais de substâncias farmacêuticamente aceitáveis são agentes tensoativos, agentes umidificantes ou quantidade menores de substâncias auxiliares tal como de agentes umidificantes ou emulsificantes, conservantes ou tampões, que melhoram a vida  
5 de prateleira ou eficácia do anticorpo.

As composições usadas nesta invenção podem estar em uma variedade de formas, por exemplo, formas de dosagem líquida, semi-sólida e sólida, tal como soluções líquidas  
10 (por exemplo, soluções injetáveis e infusionáveis), dispersões ou suspensões, comprimidos, pílulas, massa liofilizada, pós secos, lipossomos e supositórios. A forma preferida depende do modo de destino de administração e aplicação terapêutica. Composições preferidas típicas estão na forma de  
15 soluções injetáveis ou infusionáveis, tal como composições similares àquelas usadas para imunização passiva de humanos. O modo preferido de administração é parenteral (por exemplo, intravenoso, subcutâneo, intraperitoneal, intramuscular, intradérmico). Em uma modalidade preferida, o anticorpo é ad-  
20 ministrado por infusão ou injeção intravenosa. Em uma outra modalidade preferida, o anticorpo é administrado por injeção intramuscular, intradérmica ou subcutânea. Se desejado, o anticorpo pode ser administrado pelo uso de uma bomba, enema, supositório ou reservatório *indwelling* ou semelhante.

25 Composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis sob condições de fabricação e estocagem. A composição pode ser formulada como uma solução, massa liofilizada, pó seco, microemulsão, dispersão, lipossomo ou outra

estrutura encomendada adequada para alta concentração de droga. Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas pela incorporação do anticorpo anti-MAdCAM na quantidade necessária em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguidas por esterilização. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem a vácuo e secagem por congelamento que rende um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução previamente estéril desse. Geralmente, dispersões são preparadas pela incorporação do composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários a partir daqueles enumerados acima. As características desejadas de uma solução podem ser mantidas, por exemplo, pelo uso de agentes tensoativos e o tamanho de partícula requerido no caso de dispersão pelo uso de agentes tensoativos, fosfolipídeos e polímeros. A absorção prolongada de composições injetáveis podem ser provocada pela inclusão na composição de um agente que retarde a absorção, por exemplo, sais de monoestearato, materiais poliméricos, óleos e gelatina.

Os anticorpos da presente invenção podem ser administrados por uma variedade de métodos conhecidos na técnica, embora para muitas aplicações terapêuticas, a via/modo de administração preferido seja infusão subcutânea, intramuscular, intradérmica ou intravenosa. Como será apreciado pelo técnico versado, a via e/ou modo de administração vari-

ará dependendo dos resultados desejados.

Em certas modalidades, as composições de anticorpo podem ser preparadas com um veículo que protegerá o anticorpo contra liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastos transdérmicos e sistemas de distribuição microencapsulada. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados, tal como acetato de etileno vinila, polianidretos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou geralmente conhecidos por aqueles versados na técnica. Veja, por exemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems* (J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1978)).

Em certas modalidades, um anticorpo anti-MAdCAM da invenção pode ser administrado oralmente, por exemplo, com um diluentes inerte ou um veículo comestível assimilável. O composto (e outros ingredientes, se desejado) também podem ser revestidos por uma cápsula gelatinosa dura ou mole, comprimidos em comprimidos, ou incorporados diretamente na dieta do indivíduo. Para administração terapêutica oral, os anticorpos anti-MAdCAM podem ser incorporados com excipientes e usados na forma de comprimidos ingeríveis, comprimidos bucais, pastilhas, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, hóstias e semelhantes. Para administrar um composto da invenção por outra administração fora a parenteral, pode ser necessário revestir o composto com, ou co-administrar o composto com, um material para prevenir sua inativação.

As composições da invenção podem incluir uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou uma "quantidade profilaticamente eficaz" de um anticorpo ou porção de ligação a antígeno da invenção. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para atingir o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo ou porção de anticorpo pode variar de acordo com fatores tal como o estado da doença, idade, sexo, e peso do indivíduo e a habilidade do anticorpo ou porção de anticorpo para elicitar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz também é aquela em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais do anticorpo, ou porção de anticorpo, são superados pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para atingir o resultado profilático desejado. Tipicamente, desde que uma dose profilática seja usada em indivíduos antes de ou em estágio precoce da doença, a quantidade profilaticamente eficaz será menor que a quantidade terapeuticamente eficaz.

Regimes de dosagens podem ser ajustados para prover a resposta desejada ótima (por exemplo, uma resposta terapêutica ou profilática). Por exemplo, um único bolus pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas durante o tempo ou a dose pode ser reduzida ou aumentada proporcionalmente como indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular com-

posições parenterais na forma de unidade de dosagem para facilitar a administração e uniformidade de dosagem. A forma de unidade de dosagem como aqui utilizada se refere a unidades discretas fisicamente adequadas para dosagens unitárias para os indivíduos mamíferos a serem tratados; cada unidade contendo uma quantidade pré-determinada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico requerido. A especificação para as formas de unidade de dosagem da invenção são ditadas por e diretamente dependentes (a) das características únicas do anticorpo anti-MAdCAM ou porção deste e do efeito terapêutico ou profilático particular a ser obtido e (b) das limitações inerentes da técnica de fazer compostos como um anticorpo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

Uma faixa exemplar, não limitante para uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção é de 0,025 até 50 mg/kg, de maior preferência 0,1 até 50 mg/kg, de maior preferência 0,1-25, 0,1 até 10 ou 0,1 até 3 mg/kg. Em algumas modalidades, a formulação contém 5 mg/mL de anticorpo em um tampão de acetato de sódio 20 mM, pH 5,5, NaCl 140 mM e polissorbato 80 0,2 mg/mL. Em outras modalidades, a formulação contém 10 mg/mL de anticorpo em acetato de sódio triidratado 2,73 mg/mL, manitol 45 mg/mL, EDTA dissódico diidratado 0,02 mg/mL, polissorbato 80 0,2 mg/mL ajustado a pH 5,5 com ácido acético glacial, por exemplo, para uso intravenoso. Em outras modalidades, uma formulação contém 50 mg/mL de anticorpo, acetato de sódio triidratado 2,73 mg/mL, manitol 45

mg/mL, EDTA dissódico diidratado 0,02 mg/mL, polissorbato 80 0,4 mg/mL ajustado a pH 5,5 com ácido acético glacial, por exemplo, para uso subcutâneo ou intradérmico. É para notar-se que valores de dosagem podem variar com o tipo e gravida-  
5 de da condição a ser aliviada. Entenda-se adicionalmente que para qualquer indivíduo particular, regimes de dosagem específicos devem ser ajustados com o tempo de acordo com a necessidade individual e o julgamento profissional da pessoa que administra ou supervisiona a administração das composi-  
10 ções e que faixas de dosagem expostas aqui são exemplares apenas e não se destinam a limitar o âmbito ou prática da composição reivindicada.

Em uma modalidade, o anticorpo é administrado em uma formulação como uma solução aquosa estéril que tem um pH  
15 que varia de cerca de 5,0 até cerca de 6,5 e compreendendo de cerca de 1 mg/mL até cerca de 200 mg/mL de anticorpo, de cerca de 1 milimolar até cerca de 100 milimolar de tampão de histidina, de cerca de 0,01 mg/mL até cerca de 10 mg/mL de polissorbato 80, de cerca de 100 milimolar até cerca de 400  
20 milimolar de trealose e de cerca de 0,01 milimolar até cerca de 1,0 milimolar de EDTA dissódico diidrato.

Um outro aspecto da presente invenção provê kits compreendendo um anticorpo anti-MAdCAM ou porção de anticorpo da invenção ou uma composição compreendendo tal anticorpo.  
25 po. Um kit pode incluir, além do anticorpo ou composição, agentes diagnósticos ou terapêuticos. Um kit também pode incluir instruções para uso em um método diagnóstico ou terapêutico. Em uma modalidade preferida, o kit inclui o anti-

corpo ou uma composição o compreendendo e um agente diagnóstico que pode ser usado em um método descrito abaixo. Em uma outra modalidade preferida, o kit inclui o anticorpo ou uma composição que o compreende e um ou mais agentes terapêuticos que podem ser usados em um método descrito abaixo.

#### *Terapia gênica*

Os anticorpos usados na invenção podem ser administrados a um paciente em necessidade destes através de terapia gênica. A terapia pode ser *in vivo* ou *ex vivo*. Em uma modalidade preferida, moléculas de ácido nucléico codificando tanto uma cadeia pesada como uma cadeia leve são administradas a um paciente. Em uma modalidade mais preferida, as moléculas de ácido nucléico são administradas tal que elas sejam integradas estavelmente em cromossomos de células B porque essas células são especializadas em produzir anticorpos. Em uma modalidade preferida, células B precursoras são transfectadas ou infectadas *ex vivo* e re-transplantadas em um paciente em necessidade destas. Em uma outra modalidade, células B precursoras ou outras células são infectadas *in vivo* usando um vírus recombinante conhecido por infectar o tipo celular de interesse. Vetores típicos para terapia gênica incluem lipossomos, plasmídeos e vetores virais. Vetores virais exemplares são retrovírus, adenovírus e vírus adeno-associados. Após infecção *in vivo* ou *ex vivo* níveis de expressão de anticorpo podem ser monitorados tomando uma amostra do paciente tratado e usando qualquer imunoenensaio conhecido na técnica ou discutido aqui.

Em uma modalidade preferida, o método de terapia

gênica compreende as etapas de administrar uma molécula de ácido nucléico isolada codificando a cadeia pesada ou uma porção de ligação a antígeno desta de um anticorpo anti-MAdCAM e expressar a molécula de ácido nucléico. Em uma outra modalidade, o método de terapia gênica compreende as etapas de administrar uma molécula de ácido nucléico isolada codificando a cadeia leve ou uma porção de ligação a antígeno desta de um anticorpo anti-MAdCAM e expressar a molécula de ácido nucléico. Em um método mais preferido, o método de terapia gênica compreende as etapas de administrar uma molécula de ácido nucléico isolada codificando a cadeia pesada ou uma porção de ligação a antígeno desta e uma molécula de ácido nucléico isolada codificando a cadeia leve ou uma porção de ligação a antígeno desta de um anticorpo anti-MAdCAM da invenção e expressar as moléculas de ácido nucléico. O método de terapia gênica também pode compreender a etapa de administrar um outro agente antiinflamatório ou imunomodulatório.

20 Inibição de adesão dependente de  $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM por anticorpo anti-MAdCAM

A invenção também provê o uso de um anticorpo anti-MAdCAM que se liga a MAdCAM e inibe a ligação e adesão de células que portam integrina  $\alpha_4\beta_7$  a MAdCAM ou outros ligantes cognatos, tal como L-selectina, a MAdCAM. Em uma modalidade preferida, a MAdCAM é humana e está na forma solúvel ou é expressada na superfície de uma célula. Em uma outra modalidade preferida, o anticorpo anti-MAdCAM é um anticorpo humano. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou porção deste

inibe a ligação entre  $\alpha_4\beta_7$  e MAdCAM com um valor de  $IC_{50}$  de não mais que 50 nM. Em uma modalidade preferida, o valor de  $IC_{50}$  não é mais que 5 nM. Em uma modalidade mais preferida, os valores de  $IC_{50}$  não são menos que 5 nM. Em uma modalidade mais preferida, o valor de  $IC_{50}$  não é menos que 0,05  $\mu\text{g/mL}$ , 0,04  $\mu\text{g/mL}$  ou 0,03  $\mu\text{g/mL}$ . Em uma outra modalidade preferida, o valor de  $IC_{50}$  é menos que 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , 0,4  $\mu\text{g/mL}$  ou 0,3  $\mu\text{g/mL}$ . O valor de  $IC_{50}$  pode ser medido por qualquer método conhecido na técnica. Tipicamente, um valor de  $IC_{50}$  pode ser medido por ELISA ou ensaio de adesão. Em uma modalidade preferida, o valor de  $IC_{50}$  é medido por ensaio de adesão usando células ou tecido que expresse MAdCAM de maneira nativa ou células ou tecido que tenha sido engenheirado para expressar MAdCAM.

A menos que definido de outro modo aqui, termos científicos e técnicos usados junto com a presente invenção terão os significados que são comumente entendidos por aqueles de conhecimento ordinário da técnica. Adicionalmente, a menos que requerido de outro modo pelo contexto, termos singulares incluirão plurais e termos plurais incluirão o singular. Geralmente, nomenclaturas usadas junto com, e técnicas de, cultura de células e tecidos, biologia molecular, imunologia, microbiologia, genética e hibridização e química de ácidos nucleicos e proteínas aqui descritas são aquelas bem conhecidas e comumente usadas na técnica. Os métodos e técnicas da presente invenção são geralmente realizados de acordo com métodos convencionais bem conhecidos na técnica e como descritos em várias referências gerais e mais específi-

cas que são citadas e discutidas durante toda a presente especificação a menos que indicado de outro modo. Veja, por exemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) e Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992) e Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1990), que são incorporados aqui como referência. Reações enzimáticas e técnicas de purificação são realizadas de acordo com especificações do fabricante, como comumente realizado na técnica ou como aqui descrito. Técnicas padrões são usadas para sínteses químicas, análises químicas, preparação, formulação e distribuição farmacêutica, e tratamento de pacientes.

15 O termo "polipeptídeo" abrange proteínas nativas ou artificiais, fragmentos protéicos e análogos polipeptídicos de uma seqüência protéica. Um polipeptídeo pode ser monomérico ou polimérico.

20 O termo "proteína isolada" ou "polipeptídeo isolado" é uma proteína ou polipeptídeo que em virtude de sua origem ou fonte de derivação (1) não está associado com componentes naturalmente associados que acompanham-no em seu estado nativo, (2) é livre de outras proteínas da mesma espécie, (3) é expressado por uma célula de uma espécie diferente, ou (4) não ocorre na natureza. Assim, um polipeptídeo 25 que é sintetizado quimicamente ou sintetizado em um sistema celular diferente da célula da qual ele se origina naturalmente estará "isolado" de seus componentes naturalmente as-

sociados. Uma proteína também pode ser conferida consideravelmente livre de componentes naturalmente associados por isolamento usando técnicas de purificação de proteína bem conhecidas na técnica.

5                   Uma proteína ou polipeptídeo é "consideravelmente puro", "consideravelmente homogêneo" ou "consideravelmente purificado" quando pelo menos cerca de 60 até 75% de uma amostra exibe uma única espécie de polipeptídeo. O polipeptídeo ou proteína pode ser monomérico ou multimérico. Um polipeptídeo ou proteína consideravelmente pura tipicamente compreenderá cerca de 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% p/p de uma amostra de proteína, mais geralmente cerca de 95% e de preferência terá mais de 99% de pureza. A pureza ou homogeneidade protéica pode ser indicada por vários meios bem conhecidos na técnica, tal como eletroforese em gel de poliacrilamida de uma amostra protéica, seguida por visualização de uma banda polipeptídica única ao corar o gel com um corante bem conhecido na técnica. Para certas finalidades, maior resolução pode ser provida pelo uso de HPLC ou de outros meios bem conhecidos na técnica para purificação.

10

15

20

O termo "fragmento polipeptídico" conforme aqui utilizado se refere a um polipeptídeo que tem uma deleção amino-terminal e/ou carbóxi-terminal, mas onde a seqüência de aminoácidos remanescente é idêntica às posições correspondentes na seqüência que ocorre naturalmente. Em algumas modalidades fragmentos possuem pelo menos 5, 6, 8 ou 10 aminoácidos de comprimento. Em outras modalidades, fragmentos possuem pelo menos 14 aminoácidos de comprimento, de maior

25

preferência pelo menos 20 aminoácidos de comprimento, geralmente pelo menos 50 aminoácidos de comprimento, ainda de maior preferência pelo menos 70, 80, 90, 100, 150 ou 200 aminoácidos de comprimento.

5 O termo "análogo polipeptídico" conforme aqui utilizado se refere a um polipeptídeo que compreende um segmento de pelo menos 25 aminoácidos que tem identidade considerável com uma porção de uma seqüência de aminoácidos e que tem pelo menos uma das seguintes propriedades: (1) ligação  
10 específica a MAdCAM sob condições de ligação adequadas, (2) habilidade para inibir a ligação de integrina  $\alpha_4\beta_7$  e/ou L-selectina a MAdCAM, ou (3) habilidade para reduzir a expressão em superfície celular de MAdCAM *in vitro* ou *in vivo*. Tipicamente, análogos peptídicos compreendem uma substituição  
15 de aminoácido conservativa (ou inserção ou deleção) em relação à seqüência que ocorre naturalmente. Análogos tipicamente possuem pelo menos 20 aminoácidos de comprimento, de preferência pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 ou 200 aminoácidos de comprimento ou maior e pode freqüentemente ser  
20 tão longo quanto um polipeptídeo que ocorre naturalmente completo.

Uma "imunoglobulina" é uma molécula tetramérica. Em uma imunoglobulina que ocorre naturalmente, cada tetrâmero é composto de dois pares idênticos de cadeias polipeptídicas, cada par tendo uma cadeia "leve" (cerca de 25 kDa) e  
25 uma "pesada" (cerca de 50-70 kDa). A porção amino-terminal de cada cadeia inclui uma região variável de cerca de 100 até 110 ou mais aminoácidos responsáveis primariamente pelo

reconhecimento de antígeno. A porção carbóxi-terminal de cada cadeia define a região constante responsável primariamente pela função efetora. As cadeias leves humanas são classificadas como cadeias leves  $\kappa$  e  $\lambda$ . Cadeias pesadas são classificadas como  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ , ou  $\epsilon$  e definem o isotipo do anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Nas cadeias leve e pesada, as regiões variáveis e constantes são unidas por uma região "J" de cerca de 12 ou mais aminoácidos, com a cadeia pesada também incluindo uma região "D" de cerca de 10 ou mais aminoácidos. Veja geralmente, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, NY (1989)) (incorporada como referência em sua totalidade para todos os fins). As regiões variáveis de cada par de cadeia leve/pesada formam o sítio de ligação de anticorpo tal que uma imunoglobulina intacta tem dois sítios de ligação.

Cadeias de imunoglobulina exibem a mesma estrutura geral de regiões estruturais conservadas (FR) unidas por três regiões variáveis, também chamadas regiões determinantes de complementaridade ou CDRs. As CDRs das duas cadeias de cada par são alinhadas pelas regiões estruturais para formar um sítio de ligação específico a epítipo. Da extremidade N-terminal até a C-terminal, tanto a cadeia leve como a pesada compreendem os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. A atribuição de aminoácidos a cada domínio é de acordo com as definições de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md (1987 e 1991)), ou Chothia & Lesk, *J Mol Biol* 196: 901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342: 877-883

(1989), cada uma das quais está incorporada aqui como referência em sua totalidade.

Um "anticorpo" se refere a uma imunoglobulina intacta ou a uma porção de ligação a antígeno deste que compete com o anticorpo intacto por ligação específica. Em algumas modalidades, um anticorpo é uma porção de ligação a antígeno deste. Porções de ligação a antígeno podem ser produzidas por técnicas de DNA recombinante ou por clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos. Porções de ligação a antígeno incluem, *inter alia*, fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, dAb e de região determinante de complementaridade (CDR), anticorpos de cadeia única (scFv), anticorpos quiméricos, diacorpos e polipeptídeos que contém pelo menos uma porção de uma imunoglobulina que é suficiente para conferir ligação a antígeno específica ao polipeptídeo. Um fragmento Fab é um fragmento monovalente que consiste dos domínios VL, VH, CL e CH1; um fragmento F(ab)<sub>2</sub> é um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobra; um fragmento Fd consiste nos domínios VH e CH1; um fragmento Fv consiste nos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo; e um fragmento dAb (Ward *et al.*, Nature 341: 544-546 (1989)) consiste em um domínio VH.

Conforme aqui utilizado, um anticorpo que é referido como, por exemplo, 1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4 ou 9.8.2, é um anticorpo monoclonal que é produzido pelo hibridoma do mesmo nome. Por exemplo, anticorpo 1.7.2 é produzido

pelo hibridoma 1.7.2. Um anticorpo que é referido como 6.22.2-mod, 6.34.2-mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod ou 7.26.4-mod é um anticorpo monoclonal cuja seqüência foi modificada a partir de seu parente correspondente por mutagênese sítio-  
5 dirigida.

Um anticorpo de cadeia única (scFv) é um anticorpo em que regiões VL e VH são pareados para formar uma molécula monovalente através de um ligante sintético que permite a eles serem feitos como uma cadeia protéica única (Bird et  
10 al., Science 242: 423-426 (1988) e Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-5883 (1988)). Diacorpos são anticorpos bivalentes, biespecíficos em que domínios VL e VH são expressados em uma única cadeia polipeptídica, mas usando um  
15 ligante que é muito curto para permitir pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia, forçando desse modo que os domínios se pareiem com domínios complementares de uma outra cadeia e criando dois sítios de ligação a antígeno (veja, por exemplo, Holliger, P. et al., Proc Natl Acad Sci USA 90: 6444-6448 (1993) e Poljak, R. J. et al., Structure 2: 1121-  
20 1123 (1994)). Uma ou mais CDRs de um anticorpo da invenção podem ser incorporadas em uma molécula covalentemente ou não covalentemente para torná-la uma imunoadesina que se liga especificamente a MAdCAM. Uma imunoadesina pode incorporar a(s) CDR(s) como parte(s) de uma cadeia polipeptídica maior,  
25 pode ligar covalentemente a(s) CDR(s) a uma outra cadeia polipeptídica, ou pode incorporar a(s) CDR(s) não covalentemente. As CDRs permitem que a imunoadesina se ligue especificamente a um antígeno particular de interesse.

Um anticorpo pode ter um ou mais sítios de ligação. Se houver mais de um sítio de ligação, os sítios de ligação podem ser idênticos um ao outro ou podem ser diferentes. Por exemplo, uma imunoglobina que ocorre naturalmente tem dois sítios de ligação idênticos, um anticorpo de cadeia única ou fragmento Fab tem um sítio de ligação, enquanto um anticorpo "biespecífico" ou "bifuncional" (diacorpo) tem dois sítios de ligação diferentes.

Um "anticorpo isolado" é um anticorpo que (1) não está associado com componentes naturalmente associados, incluindo outros anticorpos associados naturalmente, que acompanham-no em seu estado nativo, (2) é livre de outras proteínas da mesma espécie, (3) é expressado por uma célula de uma espécie diferente, ou (4) não ocorre na natureza. Exemplos de anticorpos isolados incluem um anticorpo anti-MAdCAM que foi purificado por afinidade usando MAdCAM, um anticorpo anti-MAdCAM que foi produzido por um hibridoma ou outra linhagem celular *in vitro* e um anticorpo anti-MAdCAM humano derivado de um mamífero transgênico ou planta.

Conforme aqui utilizado, o termo "anticorpo humano" significa um anticorpo em que as seqüências de região variável e constante são seqüências humanas. O termo abrange anticorpos com seqüências derivadas de genes humanos, mas que foram alterados, por exemplo, para diminuir possível imunogenicidade, aumentar afinidade, eliminar cisteínas ou sítios de glicosilação que podem causar enovelamento indesejado, etc. O termo abrange tais anticorpos produzidos recombinantemente em células não humanas que podem conferir gli-

cosilação não típica de células humanas. O termo também abrange anticorpos que foram criados em um camundongo transgênico que compreende alguma ou todos os loci de cadeia pesada e leve de imunoglobulina humana.

5           Em um aspecto, a invenção provê um anticorpo humanizado. Em algumas modalidades, o anticorpo humanizado é um anticorpo que é derivado de uma espécie não humana, em que certos aminoácidos nos domínios estruturais e constantes das cadeias pesada e leve foram mutados para evitar ou liquidar  
10 uma resposta imune em humanos. Em algumas modalidades, um anticorpo humanizado pode ser produzido pela fusão dos domínios constantes de um anticorpo humano com os domínios variáveis de uma espécie não humana. Exemplos de como fazer anticorpos humanizados podem ser encontrados em Patentes dos  
15 Estados Unidos Nos. 6.054.297, 5.886.152 e 5.877.293. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-MAdCAM humanizado da invenção compreende a seqüência de aminoácidos de uma ou mais regiões estruturais de um ou mais anticorpo anti-MAdCAM da invenção.

20           Em um outro aspecto, a invenção inclui o uso de um "anticorpo quimérico". Em algumas modalidades o anticorpo quimérico se refere a um anticorpo que contém uma ou mais regiões de um anticorpo e uma ou mais regiões de um ou mais outros anticorpos. Em uma modalidade preferida, uma ou mais  
25 das CDRs são derivadas de um anticorpo anti-MAdCAM humano da invenção. Em uma modalidade mais preferida, todas as CDRs são derivadas de um anticorpo anti-MAdCAM humano da invenção. Em uma outra modalidade preferida, as CDRs de mais de

um anticorpo anti-MAdCAM humano da invenção são misturadas e pareadas em um anticorpo quimérico. Por exemplo, um anticorpo quimérico pode compreender uma CDR1 de uma cadeia leve de um primeiro anticorpo anti-MAdCAM humano pode ser combinada com CDR2 e CDR3 da cadeia leve de um segundo anticorpo anti-MAdCAM humano e as CDRs da cadeia pesada podem ser derivados de um terceiro anticorpo anti-MAdCAM. Adicionalmente, as regiões estruturais podem ser derivadas de um dos mesmos anticorpos anti-MAdCAM, de um ou mais anticorpos diferentes, tal como um anticorpo humano, ou de um anticorpo humanizado.

Um "anticorpo de neutralização", "um anticorpo inibitório" ou anticorpo antagonista é um anticorpo que inibe a ligação de célula que expressam  $\alpha_4\beta_7$ , ou qualquer outro ligante cognato ou células que expressam o ligante cognato, a MAdCAM em pelo menos cerca de 20%. Em uma modalidade preferida, o anticorpo reduz, inibe a ligação de integrina  $\alpha_4\beta_7$  ou células que expressam  $\alpha_4\beta_7$  a MAdCAM em pelo menos 40%, de maior preferência em 60%, ainda de maior preferência em 80%, 85%, 90%, 95% ou 100%. A redução de ligação pode ser medida por quaisquer meios conhecidos por alguém versado na técnica, por exemplo, como medido em um ensaio de ligação competitiva *in vitro*. Um exemplo de medição da redução na ligação de células que expressam  $\alpha_4\beta_7$  a MAdCAM é apresentada no Exemplo I.

Fragmentos ou análogos de anticorpos podem ser prontamente preparados por aqueles de conhecimento ordinário da técnica seguindo os ensinamentos desta especificação. Extremidades amino- e carbóxi-terminais de fragmentos ou aná-

logos ocorrem próximos a limites de domínios funcionais. Domínios estruturais e funcionais podem ser identificados por comparação dos dados de seqüência nucleotídica e/ou de aminoácidos com banco de dados de seqüência públicos ou de proprietários. De preferência, métodos de comparação computadorizada são usados para identificar motivos de seqüência ou domínios de conformação protéica previstos que ocorrem em outras proteínas de estrutura e/ou função conhecidas. Métodos para identificar seqüências de proteínas que enovelam em uma estrutura tridimensional conhecida são conhecidos (Bowie *et al.*, Science 253: 164 (1991)).

O termo " $K_{off}$ " se refere à constante para dissociação de um anticorpo do complexo antígeno/anticorpo.

O termo " $K_d$ " se refere a constante de dissociação de uma interação antígeno/anticorpo particular. Diz-se que um anticorpo se liga a um antígeno quando a constante de dissociação é  $\leq 1 \mu M$ , de preferência  $\leq 100 \text{ nM}$  e da maior preferência  $\leq 10 \text{ nM}$ .

O termo "epítopo" inclui qualquer determinante protéico capaz de ligação específica a uma imunoglobulina ou receptor de célula T ou de interagir de outro modo com uma molécula. Determinantes de epítopo geralmente consistem em agrupamentos de moléculas de superfície quimicamente ativas tal como aminoácidos ou cadeias laterais de carboidrato e geralmente têm características estruturais tridimensionais específicas assim como características de carga específicas. Um epítopo pode ser "linear" ou "conformacional". Em um epítopo linear, todos os pontos de interação entre a proteína e

a molécula que interage (tal como um anticorpo) ocorrem linearmente ao longo da seqüência primária de aminoácidos da proteína. Em um epítipo conformacional, os pontos de interação ocorrem de resíduos de aminoácidos a outros na proteína que estão separados um do outro.

Conforme aqui utilizado, os vinte aminoácidos convencionais e suas abreviações seguem uso convencional. Veja Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub e D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), que é incorporado aqui como referência. Estereoisômeros (por exemplo, D-aminoácidos) dos vinte aminoácidos convencionais, aminoácidos artificiais tal como aminoácidos  $\alpha$ -dissubstituídos, aminoácidos N-alkil, ácido láctico e outros aminoácidos não convencionais também podem ser componentes adequados para polipeptídeos da presente invenção. Exemplos de aminoácidos não convencionais incluem:  $\gamma$ -hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato,  $\epsilon$ -N,N,N-trimetilisina,  $\epsilon$ -N-acetilisina e outros aminoácidos similares e iminoácidos (por exemplo, 4-hidroxiprolina). Na notação polipeptídica usada aqui, o sentido para o lado esquerdo é o sentido amino-terminal e o sentido para o lado direito é o sentido carbóxi-terminal, de acordo com uso e convenção padrões.

O termo "polinucleotídeo" como referido aqui significa uma forma polimérica de nucleotídeos de pelo menos 10 bases de comprimento, ribonucleotídeos ou desoxirribonucleotídeos ou uma forma modificada de qualquer tipo de nucleotídeo. O termo inclui formas de fita simples e fita dupla de DNA.

O termo "polinucleotídeo isolado", conforme aqui utilizado, significará um polinucleotídeo de origem genômica, cDNA ou sintética, ou alguma combinação desses, que devido a sua origem, o "polinucleotídeo isolado" (1) não está  
5 associado com todo ou uma porção de um polinucleotídeo com o qual o "polinucleotídeo isolado" é encontrado na natureza, (2) está ligado operacionalmente a um polinucleotídeo que não está ligado na natureza, ou (3) não ocorre na natureza como parte de uma seqüência maior.

10 O termo "oligonucleotídeo" referido aqui inclui nucleotídeos que ocorrem naturalmente e nucleotídeos modificados ligados por ligações oligonucleotídicas que ocorrem naturalmente e que não ocorrem naturalmente. Oligonucleotídeos são um subgrupo de polinucleotídeo que geralmente com-  
15 preendem um comprimento de 200 bases ou menos. De preferência, oligonucleotídeos têm 10 até 60 bases de comprimento. Oligonucleotídeos geralmente são de fita simples, por exemplo, para sondas; embora oligonucleotídeos possam ser de fita dupla, p. ex, para uso na construção de um mutante gênico.  
20 Oligonucleotídeos da invenção podem ser oligonucleotídeos de sentido ou anti-sentido.

O termo "nucleotídeos que ocorrem naturalmente" referido aqui inclui desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos. O termo "nucleotídeos modificados" referido aqui inclui nucleotídeos com grupos de açúcar substituídos ou modificados e semelhantes. O termo "ligações oligonucleotídicas" referido aqui inclui ligações oligonucleotídicas tal como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodi-

selenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforoamido e semelhantes. Veja por exemplo, 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  
5 (1988); Zon *et al.*, Anti-Cancer Drug Design 6: 539 (1991); Zon *et al.*, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991); Stec *et al.*, Patente US No. 5.151.510; Uhlman e Peyman, Chemical Reviews, 90: 543  
10 (1990), as divulgações das quais são incorporadas aqui como referência. Um oligonucleotídeo pode incluir um marcador para detecção, se desejado.

Seqüências "operacionalmente ligadas" incluem tanto seqüências de controle de expressão que são contíguas ao  
15 gene de interesse como seqüências de controle de expressão que agem *em trans* ou a uma distância para controlar o gene de interesse. O termo "seqüência de controle de expressão" como aqui utilizado se refere a seqüências polinucleotídicas que são necessárias para promover a expressão e processamento  
20 de seqüências codificantes às quais elas estão ligadas. Seqüências de controle de expressão incluem seqüências acentuadoras (enhancer), promotoras, de início e de término de transcrição apropriadas; sinais de processamento de RNA eficientes; seqüências que melhoram a eficiência de tradução  
25 (isto é, seqüência de consenso de Kozak); seqüências que melhoram a estabilidade protéica; e quando desejado, seqüências que melhoram a secreção protéica. A natureza de tais seqüências de controle difere dependendo do organismo hospedeiro.

deiro; em procariotos, tais seqüências de controle geralmente incluem promotor, sítio de ligação ribossomal e seqüência de término de transcrição; em eucariotos, geralmente, tais seqüências de controle incluem seqüências de promotores e de 5 término de transcrição. O termo "seqüências de controle" destina-se a incluir, no mínimo, todos os componentes cuja presença é essencial para expressão e processamento e também podem incluir componentes adicionais cuja presença é vantajosa, por exemplo, seqüências líder e seqüências de par de 10 fusão.

O termo "vetor", conforme aqui utilizado, destina-se a se referir a uma molécula de ácido nucléico capaz de transportar um outro ácido nucléico ao qual ele está ligado. Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que se refere a uma alça 15 de DNA de dupla fita circular em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Um outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados no genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira em que eles são introduzi- 20 dos (por exemplo, vetores bacterianos que tem uma origem de replicação bacteriana e vetores mamíferos epissomais). Outros vetores (por exemplo, vetores mamíferos não epissomais) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira na introdução na célula hospedeira e desse modo são replicados 25 junto com o genoma hospedeiro. Além disso, certos vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais eles estão operacionalmente ligados. Tais vetores são referidos aqui como "vetores de expressão recombinante" (ou sim-

plesmente, "vetores de expressão"). Em geral, vetores de expressão de utilidade em técnicas de DNA recombinante estão freqüentemente na forma de plasmídeos. Na presente especificação, "plasmídeo" e "vetor" podem ser usados alternadamente  
5 como o plasmídeo é a forma mais comumente usada de vetor. Entretanto, a invenção destina-se a incluir outras formas de vetores de expressão, tais como vetores virais (por exemplo, retrovírus de replicação defeituosa, adenovírus e vírus adeno-associados), que possuem funções equivalentes.

10 O termo "célula hospedeira recombinante" (ou simplesmente "célula hospedeira"), conforme aqui utilizado, destina-se a se referir a uma célula em que um vetor de expressão recombinante foi introduzido. Deve-se entender que tais termos destinam-se a se referir não apenas à célula  
15 submetida particular, mas à progênie de tal célula. Como certas modificações podem ocorrer em gerações sucedentes devido à mutação ou influências ambientais, tal progênie pode não, de fato, ser idêntica à célula parental, mas ainda estão incluídas no âmbito do termo "célula hospedeira",  
20 conforme aqui utilizado.

O termo "hibridiza seletivamente" referido aqui significa se ligar detectavelmente e especificamente. Polinucleotídeos, oligonucleotídeo e fragmentos destes de acordo com a invenção se hibridizam seletivamente a fitas de ácido  
25 nucléico sob condições de hibridização e lavagem que minimizam a quantidade apreciáveis de ligação detectável a ácidos nucléicos não específicos. Condições de "alta estringência" ou "altamente estringentes" podem ser usadas para obter con-

dições de hibridização seletiva como conhecido na técnica e discutido aqui. Um exemplo de condições de "alta estringência" ou "altamente estringentes" é um método para incubar um polinucleotídeo com um outro polinucleotídeo, em que um polinucleotídeo pode ser afixado a uma superfície sólida como uma membrana, em um tampão de hibridização de SSPE 6X ou SSC, formamida 50%, reagente de Denhardt's 5X, SDS 0,5%, DNA de esperma de salmão fragmentado, desnaturado 100 µg/mL em uma temperatura de hibridização de 42°C por 12-16 horas, seguido por lavagem duas vezes a 55°C usando um tampão de lavagem de SSC 1X, SDS 0,5%. Veja também Sambrook et al., *supra*, pp. 9.50-9.55.

O termo "identidade de seqüência porcentual" no contexto de seqüências nucleotídicas se refere aos resíduos em duas seqüências que são os mesmos quando alinhados para máxima correspondência. O comprimento de comparação de identidade de seqüência pode ser uma extensão de pelo menos cerca de nove nucleotídeos, geralmente pelo menos cerca de 18 nucleotídeos, mais geralmente pelo menos 24 nucleotídeos, tipicamente pelo menos cerca de 28 nucleotídeos, mais tipicamente pelo menos 32 nucleotídeos e de preferência pelo menos cerca de 36, 48 ou mais nucleotídeos. Há vários algoritmos conhecidos na técnica que podem ser usados para medir identidade de seqüência nucleotídica. Por exemplo, seqüências polinucleotídicas podem ser comparadas usando FASTA, Gap ou Bestfit, que são programas no Wisconsin Package versão 10.3, Accelrys, San Diego, CA. FASTA, que inclui, por exemplo, os programas FASTA2 e FASTA3, provê alinhamentos e

identidade de seqüência porcentual das regiões da melhor sobreposição entre as seqüências teste e de busca (Pearson, Methods Enzymol 183: 63-98 (1990); Pearson, Methods Mol Biol 132: 185-219 (2000); Pearson Methods Enzymol 266: 227-258 (1996); Pearson J Mol Biol 276: 71-84 (1998); incorporado aqui como referência). A menos que especificado de outro modo, parâmetros padrões para um programa ou algoritmo particular são usados. Por exemplo, identidade de seqüência porcentual entre seqüências nucleotídicas pode ser determinadas usando FASTA com seus parâmetros padrões (um tamanho de palavra de 6 o fator NOPAM para a matriz de pontuação) ou usando Gap como seus parâmetros padrões como provido no Wisconsin Package versão 10.3, aqui incorporado como referência.

Uma referência para uma seqüência nucleotídica abrange seu complemento a menos que especificado de outro modo. Assim, uma referência a uma molécula de ácido nucléico que tem uma seqüência particular, deve ser entendido como abrangendo sua fita complementar, com sua seqüência complementar.

Na técnica de biologia molecular, pesquisadores usam os termos "identidade de seqüência porcentual", "similaridade de seqüência porcentual" e "homologia de seqüência porcentual" alternadamente. Neste pedido, esses termos terão o mesmo significado em relação às seqüências nucleotídicas apenas.

O termo "similaridade considerável" ou "similaridade de seqüência considerável", quando se refere a um ácido

nucléico ou fragmento deste, indica que, quando alinhado otimamente com inserções ou deleções nucleotídicas com um outro ácido nucléico (ou sua fita complementar), há identidade de seqüência nucleotídica em pelo menos cerca de 85%, de preferência pelo menos cerca de 90% e de maior preferência pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% das bases nucleotídicas, como medido por algoritmo bem conhecido de identidade de seqüência, tal como FASTA, BLAST ou Gap, conforme discutido acima.

10           Como aplicado a polipeptídeos, o termo "identidade considerável" significa que duas seqüências peptídicas, quando otimamente alinhadas, tal como pelos programas GAP ou BESTFIT usando pesos de frestas padrões, compartilham pelo menos 75% ou 80% de identidade de seqüência, de preferência pelo menos 90% ou 95% de identidade de seqüência, ainda de maior preferência pelo menos 98% ou 98% de identidade de seqüência. De preferência, posições de resíduos que não são idênticas diferem por substituições de aminoácidos conservativas. Uma "substituição de aminoácido conservativa" é uma em que um resíduo de aminoácido é substituído por um outro resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral (grupo R) com propriedades químicas similares (por exemplo carga ou hidrofobicidade). Em geral, uma substituição de aminoácidos conservada não alterará consideravelmente as propriedades funcionais de uma proteína. Em casos em que duas ou mais seqüências de aminoácidos diferem uma da outra por substituições conservativas, a identidade de seqüência porcentual ou grau de similaridade pode ser ajustado para cima para corri-

gir a natureza conservativa da substituição. Meios para fazer este ajuste são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Veja, por exemplo, Pearson, *Methods Mol Biol* 24: 307-31 (1994), incorporado aqui como referência. Exemplos de grupos de aminoácidos que tem cadeias laterais com propriedade químicas similares incluem 1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadeias laterais alifática-hidroxila: serina e treonina; 3) cadeias laterais contendo amida: asparagina e glutamina; 4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina e triptofano; 5) cadeias laterais básicas: lisina, arginina e histidina; e 6) cadeias laterais contendo enxofre são cisteína e metionina. Grupos de substituição de aminoácidos conservativos preferidos são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato e asparagina-glutamina.

Senão, uma substituição conservativa é qualquer alteração que têm um valor positivo na matriz de log-probabilidade PAM250 em Gonnet *et al.*, *Science* 256: 1443-45 (1992), incorporada aqui como referência. Uma substituição "moderadamente conservativa" é qualquer alteração que tem um valor negativo na matriz de log-probabilidade PAM250.

A similaridade de seqüência para polipeptídeos é tipicamente medida usando programa de análise de seqüências. Programa de análise protéica parecia seqüências similares usando medidas de similaridade designadas para várias substituições, deleções e outras modificações, incluindo substituições de aminoácidos conservativas. Por exemplo, GCG contém

programas tal como "Gap" e "Bestfit" que podem ser usados com parâmetros padrão para determinar homologia de seqüência ou identidade de seqüência entre polipeptídeos intimamente relacionados, tal como polipeptídeos homólogos de espécies diferentes de organismos ou entre uma proteína selvagem e uma muteína desta. Veja, por exemplo, Wisconsin Package versão 10.3. Seqüências polipeptídicas também podem ser comparadas usando FASTA usando parâmetros padrões ou recomendados, um programa no Wisconsin Package versão 10.3. FASTA (por exemplo, FASTA2 e FASTA3) provê alinhamentos e identidade de seqüência porcentual das regiões da melhor sobreposição entre as seqüências teste e de busca (Pearson (1990); Pearson (2000)). Um outro algoritmo preferido quando comparando uma seqüência da invenção a um banco de dados contendo um grande número de seqüências de diferentes organismo é o programa de computador BLAST, especialmente blastp ou blastn, usando parâmetros padrões. Veja, por exemplo, Altschul *et al.*, J Mol Biol 215: 403-410 (1990); Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res 25: 3389-402 (1997); incorporadas aqui como referência.

O comprimento de seqüências polipeptídicas comparadas por homologia geralmente será pelo menos cerca de 16 resíduos de aminoácidos, geralmente pelo menos cerca de 20 resíduos, mais geralmente pelo menos cerca de 24 resíduos, tipicamente pelo menos cerca de 28 resíduos e de preferência mais de 35 resíduos. Quando se busca um banco de dados contendo seqüências de um grande número de diferentes organismos, é preferível comparar seqüências de aminoácidos.

Conforme aqui utilizado, os termos "marcador" ou "marcado" se refere à incorporação de uma outra molécula no anticorpo. Em uma modalidade, o marcador é um marcador detectável, por exemplo, incorporação de um aminoácido radio-

5 marcado ou adesão a um polipeptídeo de unidades de biotinila que podem ser detectadas por avidina marcada (por exemplo, estreptavidina contendo um marcador fluorescente ou atividade enzimática que possa ser detectada por métodos óticos ou colorimétricos). Em uma outra modalidade, o marcador pode

10 ser terapêutico, por exemplo, um conjugado a droga ou toxina. Vários métodos para marcar polipeptídeos e glicoproteínas são conhecidos na técnica e podem ser usados. Exemplos de marcadores para polipeptídeos incluem, mas não estão limitados a, os seguintes: radioisótopos ou radionucléons (por

15 exemplo,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), marcadores fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina, lantanídeo fósforos), marcadores enzimáticos (por exemplo, peroxidase de rabanete,  $\beta$ -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina); marcadores quimioluminescentes, grupos de biotinila, epí-

20 pos polipeptídicos pré-determinados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, seqüências de par de zíperes de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, marcadores de epítopo), agentes magnéticos, tal como quelatos de gadolínio, toxinas tal

25 como toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídeo, emetina, mitomicina, etoposídeo, tenoposídeo, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, diidrôxi antracina, mitoxantrona, mi-

tramicina, actinomicina D, 1-desidrotosterona, glicocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e puromicina e análogos ou homólogos destes. Em algumas modalidades, marcadores estão aderidos por braços espaçadores de 5 vários comprimentos para reduzir potencial impedimento estérico.

## REIVINDICAÇÕES

1. Uso, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser de um anticorpo anti-MAdCAM ou porção de ligação a antígeno deste para a fabricação de um medicamento para o tratamento de doença  
5 celiaca e/ou espru tropical.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato do medicamento ser para o tratamento de doença celiaca.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato do anticorpo anti-MAdCAM ser um anticorpo monoclonal humano.  
10

4. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato do anticorpo ou porção possuir pelo menos uma das seguintes propriedades:

15 (a) se liga a células humanas;

(b) tem uma seletividade por MAdCAM sobre VCAM ou fibronectina de pelo menos 100 vezes;

(c) se liga a MAdCAM humana com um Kd de  $3 \times 10^{-10}M$  ou menos; ou

20 (d) inibe a ligação de células que expressam  $\alpha_4\beta_7$  a MAdCAM humana;

(e) inibe o recrutamento de linfócitos para o tecido linfóide gastrintestinal.

5. Uso, de acordo com quaisquer das reivindicações de 1 até 4, **CARACTERIZADO** pelo fato do citado anticorpo ou porção de ligação a antígeno inibir a ligação de MAdCAM humana a  $\alpha_4\beta_7$  e em que o anticorpo ou porção deste tem pelo menos uma das seguintes propriedades:  
25

(a) compete de maneira cruzada com um anticorpo de referência para ligação a MAdCAM;

(b) compete com um anticorpo de referência para ligação a MAdCAM;

5 (c) liga-se ao mesmo epítopo de MAdCAM que um anticorpo de referência;

(d) liga-se a MAdCAM com consideravelmente o mesmo  $K_d$  que um anticorpo de referência;

(e) liga-se a MAdCAM com consideravelmente a mesma  
10 taxa de desligamento que um anticorpo de referência;

em que o anticorpo de referência é selecionado do grupo que consiste em: anticorpo monoclonal 1.7.2, anticorpo monoclonal 1.8.2, anticorpo monoclonal 6.14.2, anticorpo monoclonal 6.22.2, anticorpo monoclonal 6.34.2, anticorpo monoclonal 6.67.1, anticorpo monoclonal 6.73.2, anticorpo monoclonal 6.77.1, anticorpo monoclonal 7.16.6, anticorpo monoclonal 7.20.5, anticorpo monoclonal 7.26.4, anticorpo monoclonal 9.8.2, anticorpo monoclonal 6.22.2-mod, anticorpo monoclonal 6.34.2-mod, anticorpo monoclonal 6.67.1-mod, anticorpo monoclonal 6.77.1-mod e anticorpo monoclonal 7.26.4-mod.

6. Uso, de acordo com quaisquer das reivindicações de 1 até 5, **CARACTERIZADO** pelo fato da região variável de cadeia pesada, da região variável de cadeia leve ou ambas do anticorpo anti-MAdCAM possuírem pelo menos 90% de identidade em seqüência de aminoácidos com a região ou regiões correspondentes de um anticorpo monoclonal selecionado do grupo que consiste em: anticorpo monoclonal 1.7.2, anticorpo mono-

25

clonal 1.8.2, anticorpo monoclonal 6.14.2, anticorpo monoclonal 6.22.2, anticorpo monoclonal 6.34.2, anticorpo monoclonal 6.67.1, anticorpo monoclonal 6.73.2, anticorpo monoclonal 6.77.1, anticorpo monoclonal 7.16.6, anticorpo monoclonal 7.20.5, anticorpo monoclonal 7.26.4, anticorpo monoclonal 9.8.2, anticorpo monoclonal 6.22.2-mod, anticorpo monoclonal 6.34.2-mod, anticorpo monoclonal 6.67.1-mod, anticorpo monoclonal 6.77.1-mod e anticorpo monoclonal 7.26.4-mod.

10                   7. Uso, de acordo com quaisquer das reivindicações de 1 até 6, **CARACTERIZADO** pelo fato do anticorpo ser selecionado do grupo que consiste em:

(a) um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4, sem as seqüências sinais;

15

(b) um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 8, sem as seqüências sinais;

(c) um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 12, sem as seqüências sinais;

20

(d) um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 16, sem as seqüências sinais;

(e) um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 18 e SEQ ID NO: 20, sem as seqüências sinais;

25

(f) um anticorpo compreendendo as seqüências de a-

minoácidos expostas em SEQ ID NO: 22 e SEQ ID NO: 24, sem as seqüências sinais;

(g)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 26 e SEQ ID NO: 28, sem as  
5 seqüências sinais;

(h)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 30 e SEQ ID NO: 32, sem as seqüências sinais;

(i)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 34 e SEQ ID NO: 36, sem as  
10 seqüências sinais;

(j)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 38 e SEQ ID NO: 40, sem as seqüências sinais;

(k)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 44, sem as  
15 seqüências sinais;

(l)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 46 e SEQ ID NO: 48, sem as  
20 seqüências sinais;

(m)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 52 e SEQ ID NO: 54, sem as seqüências sinais;

(n)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 56 e SEQ ID NO: 58, sem as  
25 seqüências sinais;

(o)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 60 e SEQ ID NO: 62, sem as

seqüências sinais;

(p)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 64 e SEQ ID NO: 66, sem as seqüências sinais;

5 (q)um anticorpo compreendendo as seqüências de aminoácidos expostas em SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 68, sem as seqüências sinais.

8. Uso, de acordo com quaisquer das reivindicações de 1 até 7, **CARACTERIZADO** pelo fato da lisina C-terminal de  
10 cadeia pesada ser clivada do anticorpo anti-MAdCAM.

9. Uso, de acordo com quaisquer das reivindicações de 1 até 8, **CARACTERIZADO** pelo fato do anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno deste ser selecionado dos seguintes anticorpos:

15 (a)a cadeia pesada compreende as seqüências de aminoácidos CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada de um anticorpo de referência selecionado do grupo que consiste em:  
1.7.2, 1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2,  
6.77.1, 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-  
20 mod, 6.67.1-mod, 6.77.1-mod e 7.26.4-mod

(b)a cadeia leve compreende as seqüências de aminoácidos CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve de um anticorpo de referência selecionado do grupo que consiste em: 1.7.2,  
1.8.2, 6.14.2, 6.22.2, 6.34.2, 6.67.1, 6.73.2, 6.77.1,  
25 7.16.6, 7.20.5, 7.26.4, 9.8.2, 6.22.2-mod, 6.34.2-mod,  
6.67.1-mod, 6.77.1-mod e 7.26.4-mod

(c)o anticorpo compreende uma cadeia pesada de (a) e uma cadeia leve de (b); e

(d) o anticorpo de (c) em que as seqüências de aminoácidos de CDR de cadeia pesada e cadeia leve são selecionadas do mesmo anticorpo de referência.

10. Uso, de acordo com quaisquer das reivindicações de 1 até 9, **CARACTERIZADO** pelo fato do anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno compreender:

(a) uma cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácidos de região variável de cadeia pesada de um anticorpo selecionado do grupo que consiste em: 1.7.2 (SEQ ID NO: 2), 1.8.2 (SEQ ID NO: 6), 6.14.2 (SEQ ID NO: 10), 6.22.2 (SEQ ID NO: 14), 6.34.2 (SEQ ID NO: 18), 6.67.1 (SEQ ID NO: 22), 6.73.2 (SEQ ID NO: 26), 6.77.1 (SEQ ID NO: 30), 7.16.6 (SEQ ID NO: 34), 7.20.5 (SEQ ID NO: 38), 7.26.4 (SEQ ID NO: 42) e 9.8.2 (SEQ ID NO: 46), 6.22.2-mod (SEQ ID NO: 52), 15 6.34.2-mod (SEQ ID NO: 56), 6.67.1-mod (SEQ ID NO: 60), 6.77.1-mod (SEQ ID NO: 64) e 7.26.4-mod (SEQ ID NO: 42);

(b) uma cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácidos de região variável de cadeia leve de um anticorpo selecionado do grupo que consiste em: 1.7.2 (SEQ ID NO: 4), 1.8.2 (SEQ ID NO: 8), 6.14.2 (SEQ ID NO: 12), 6.22.2 (SEQ ID NO: 16), 6.34.2 (SEQ ID NO: 20), 6.67.1 (SEQ ID NO: 24), 6.73.2 (SEQ ID NO: 28), 6.77.1 (SEQ ID NO: 32), 7.16.6 (SEQ ID NO: 36), 7.20.5 (SEQ ID NO: 40), 7.26.4 (SEQ ID NO: 44) e 9.8.2 (SEQ ID NO: 48), 6.22.2-mod (SEQ ID NO: 54), 20 6.34.2-mod (SEQ ID NO: 58), 6.67.1-mod (SEQ ID NO: 62), 6.77.1-mod (SEQ ID NO: 66) e 7.26.4-mod (SEQ ID NO: 68); ou

(c) a cadeia pesada de (a) e a cadeia leve de (b).

11. Uso, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser de um an-

ticorpo anti-integrina  $\alpha_4\beta_7$  ou porção de ligação a antígeno deste para a fabricação de um medicamento para o tratamento de doença celíaca e/ou espru tropical.

RESUMO

"USO DE ANTICORPOS ANTI-MADCAM PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA CELÍACA E ESPRU TROPICAL"

Uso de anticorpos para o tratamento de doença ce-  
5 líaca e espru tropical. O pedido se relaciona ao uso de um  
anticorpo anti-MAdCAM para a fabricação de um medicamento  
para o tratamento de doença celíaca e/ou espru tropical. Mé-  
todos para tratamento de doença celíaca e/ou espru tropical  
usando uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticor-  
10 po anti-MAdCAM também estão incluídos.